

Université de Montréal

Études cinétiques par HPLC et purification de la
 γ -glutamyltranspeptidase recombinante humaine provenant des levures

par

Mylène Morin

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en chimie

Janvier 2007

© Mylène Morin, 2007



QD
3
U54
2007
v.022

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

Ce mémoire intitulé :

Études cinétiques par HPLC et purification de la
 γ -glutamyltranspeptidase recombinante humaine provenant des levures

présenté par :
Mylène Morin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Joelle Pelletier	Présidente-rapporteuse
Pr. Jeffrey W. Keillor	Directeur de recherche
Pr. Andreea Schmitzer	Membre du jury

RÉSUMÉ

La γ -glutamyltranspeptidase (GGT, EC 2.3.2.2) est une enzyme hétérodimérique qui est hautement glycosylée. Cette enzyme est liée à la membrane externe des cellules et se trouve en grande quantité dans les reins, le cerveau et le pancréas. Il semblerait que la GGT soit impliquée dans différents désordres physiologiques comme la maladie de Parkinson, l'inhibition de l'apoptose et le diabète.

La GGT peut catalyser autant la réaction d'hydrolyse que la réaction de transpeptidation en transférant un groupement γ -glutamyle à un acide aminé ou un dipeptide. La mesure de l'activité hydrolytique et de transpeptidation pour le substrat natif de cette enzyme est un défi, car le glutathion (GSH) est un substrat qui ne possède aucun groupement chromophore. C'est pour cette raison qu'une méthode HPLC en phase inverse permettant la détection quantitative de plusieurs substrats et produits a été développée. La détection des différentes substances est possible grâce à la dérivation précolonne au chlorure de dabsyle, ce qui permet d'ajouter un groupement chromophore.

L'application de cette méthode a permis de déterminer les données cinétiques de la réaction de transpeptidation de la GGT de reins de rat avec le substrat natif, GSH. Cette méthode a aussi été utilisée pour l'analyse de différents substrats analogues au glutathion. La courbe pH-vitesse effectuée, vient confirmer l'ionisation d'au moins deux résidus jouant le rôle d'acide général et de base générale. De plus, une courbe de Brønsted tracée à partir de substrats analogues au GSH a permis d'émettre l'hypothèse que l'interaction entre l'enzyme et le substrat n'est pas en relation avec la basicité du groupe partant durant l'étape d'acylation.

Ensuite, l'optimisation de l'expression de la GGT humaine recombinante a été effectuée afin d'obtenir une grande quantité d'enzyme qui permettrait d'étudier en profondeur son mécanisme et son importance au niveau physiologique. La GGT

humaine recombinante ne contient pas d'ancre transmembranaire, mais est liée à une séquence de six histidines («His-tag»). Un plasmide encodant cette enzyme a été transformé dans la levure *P. pastoris*. La GGT est sécrétée dans le milieu de culture et, finalement, à partir de 25 à 30 reins de rats la quantité de GGT obtenue est plus faible que la quantité de GGT humaine recombinante purifiée provenant d'un litre de culture par cette nouvelle méthode.

Mots-clés : enzyme, γ -glutamyltranspeptidase, glutathion, HPLC, chlorure de dabsyle, courbe pH-vitesse, levure, expression, purification.

SUMMARY

γ -Glutamyltranspeptidase (GGT, EC 2.3.2.2) is a highly glycosylated heterodimeric enzyme. It is bound to the external membrane of cells and is highly abundant in the kidney, brain and pancreas. It is implicated in various physiological disorders such as Parkinson's disease, inhibition of apoptosis and diabetes.

GGT can catalyse hydrolysis as well as transpeptidation by transferring a γ -glutamyl group to an amino acid or peptide. Measuring the hydrolytic and transpeptidation activity of this enzyme is challenging, since its native substrate glutathione (GSH) does not possess a chromophoric group. For this reason, an HPLC-based method was developed to allow the quantitative detection of several substrates and products. The detection of these different compounds is achieved through the pre-column derivatization with dabsylchloride, resulting in the addition of a chromophore.

The application of this method allowed kinetic data to be measured for the transpeptidation reaction of GGT with GSH, its native substrate. The method was also used to analyze several substrate analogues of GSH. A pH-rate profile was determined that confirms the ionisation of at least two residues. Furthermore, a Brønsted plot constructed for a series of substrate analogues led to the hypothesis that the interaction between the enzyme and the substrate during the acylation step is not related to the basicity of the leaving group.

Next, the optimisation of the expression of recombinant human GGT was carried out in order to obtain a large quantity of enzyme that would allow its mechanism and physiological importance to be studied in greater depth. The recombinant human GGT constructed does not contain a transmembrane anchor, but is linked to a sequence containing six histidines ("His-tag"). A plasmid encoding this enzyme was transformed into *P. pastoris* yeast. GGT was secreted into the culture and the amount of GGT isolated from 25-30 rat kidneys is inferior to that obtained from 1L of culture.

Key-words: enzyme, γ -glutamyltranspeptidase, glutathione, HPLC, dabsyl chloride, pH-rate profile, yeast, expression, purification

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES SCHÉMAS.....	xi
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
DÉDICACE	xvi
REMERCIEMENTS.....	xvii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 DÉCOUVERTE DES ENZYMES	2
1.2 LA γ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE	4
1.2.1 Généralités	4
1.2.2 Rôles physiologiques	5
1.2.3 Réactions catalysées.....	8
1.2.4 Substrats de la GGT.....	10
1.2.5 Sites de liaison et catalytique de la GGT.....	11
1.2.5.1 Site de liaison.....	13
1.2.5.2 Site catalytique de la GGT.....	14
1.3 OBJECTIFS DE RECHERCHE	16
1.3.1 Optimisation et validation d'une méthode d'analyse par HPLC.....	17
1.3.2 Synthèse d'un substrat analogue et études cinétiques de l'étape d'acylation.....	17
1.3.3Optimisation de l'expression et de la purification de la GGT recombinante humaine exprimée dans les levures.	18
CHAPITRE 2 : OPTIMISATION ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE PAR HPLC.....	19
2.1 INTRODUCTION	20
2.2 PRÉSENTATION DE LA MÉTHODE DÉVELOPPÉE EN PARTIE DANS NOTRE GROUPE ⁵⁴	22
2.3 OPTIMISATION DE LA MÉTHODE	26
2.4 ÉTUDES CINÉTIQUES	29
2.4.1 Courbe pH-vitesse du glutathion comme substrat donneur.....	29
2.4.2 Détermination des constantes cinétiques de L-Ala-Gly lors de la désacylation.....	32
2.4.2.1 Synthèse du L- γ -Glu-L-Ala-Gly	33
2.4.2.2 Courbe étalon et résultats cinétiques.....	35
2.5 CONCLUSION.....	37

CHAPITRE 3 : ÉTUDES CINÉTIQUES DE L'ÉTAPE D'ACYLATION CATALYSÉE PAR LA GGT À PARTIR DE SUBSTRATS SYNTHÉTISÉS ANALOGUES AU GLUTATHION	38
3.1 INTRODUCTION	39
3.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION	45
3.2.1 Synthèse de la L- γ glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide	45
3.2.2 Courbe de Bronsted comprenant le substrat L- γ glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide	47
3.3 CONCLUSION.....	53
CHAPITRE 4 : OPTIMISATION DE L'EXPRESSION ET DE LA PURIFICATION DE LA GGT DANS LES LEVURES <i>PICHA PASTORIS</i>	55
4.1 INTRODUCTION	56
4.1.1 Purification de GGT dans différents systèmes.....	56
4.1.2 Méthodes connues pour l'expression et la purification de GGT humaine recombinante	57
4.1.3 Clonage du gène de la GGT humaine dans un plasmide et transformation des bactéries <i>E.coli</i>	58
4.2 OPTIMISATION DE L'EXPRESSION	62
4.2.1 Linéarisation du plasmide purifié, transformation des levures <i>P.pastoris</i> et vérification de l'intégration du gène.....	62
4.2.2 Expression de la GGT dans <i>P.pastoris</i>	65
4.2.3 Expression à plus grande échelle de la GGT dans <i>P.pastoris</i>	67
4.2.4 Concentration de la GGT humaine recombinante.....	68
4.2.5 Purification de la GGT humaine recombinante	70
4.3 CONCLUSION.....	76
CHAPITRE 5 : CONCLUSION.....	78
CHAPITRE 6 : PARTIE EXPÉRIMENTALE	82
6.1 SYNTHÈSE DE SUBSTRATS ANALOGUES	83
6.1.1 Matériel	83
6.1.2 Méthode expérimentale.....	84
6.2 MÉTHODE PAR HPLC EN PHASE INVERSE COUPLÉE À LA DÉRIVATION CHIMIQUE PAR LE CHLORURE DE DABSYLE	94
6.2.1 Matériel	94
6.3 EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA GGT HUMAINE DANS LA LEVURE <i>P.PASTORIS</i>	99
6.3.1 Matériel	99
6.3.2 Méthode expérimentale.....	101
6.3.2.1 Linéarisation du plasmide purifié, transformation des levures <i>P. pastoris</i> , purification de l'ADN génomique et vérification de l'intégration du gène.....	101
6.3.2.2 Expression à grande échelle de la GGT dans <i>P.pastoris</i>	101
6.3.2.3 Test d'activité et de concentration	103
6.3.2.4 Concentration du surnageant.....	103
RÉFÉRENCES.....	106

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de divers inhibiteurs pour la GGT.....	15
Figure 2. Influence du pH sur la réaction de dérivation de la glutamine (l'étalon interne) par le chlorure de dabsyle.	27
Figure 3. Influence du temps de dérivation de la glutamine (l'étalon interne) par le chlorure de dabsyle.	29
Figure 4. Profil pH-vitesse obtenu pour la transpeptidation du glutathion par la GGT en présence de 20 mM de glycylglycine à 37 °C.	30
Figure 5. Courbe étalon de la L- γ -glutamylalanyl glycine (L-Glu-Ala-Gly).....	36
Figure 6. Substrats analogues L- γ -glutamylanilides-p-substitués synthétisés dans le passé dans notre groupe pour l'étude de l'étape d'acylation de la GGT	39
Figure 7. Courbe de Brønsted pour évaluer l'effet de la basicité sur les vitesses de libération des amines primaires lors de la réaction de transpeptidation effectuée par la GGT avec les dérivés L- γ -glutamylamides en présence de 20 mM glycylglycine à pH 8,0 et à 37 °C.	43
Figure 8. Courbe de Brønsted pour la transpeptidation des substrats donneurs L- γ -glutamylamides combinée à celles des substrats L- γ -glutamylanilides para-substitués dans des conditions saturantes du substrat accepteur glycylglycine ..	44
Figure 9. Courbe de Brønsted pour la transpeptidation des substrats donneurs L- γ -glutamylanilides para-substitués dans des conditions saturantes du substrat accepteur glycylglycine.....	49
Figure 10. Courbe de Brønsted pour la transpeptidation des substrats donneurs L- γ -glutamylanilides para-substitués dans des conditions saturantes du substrat accepteur glycylglycine.....	51
Figure 11. Modèle de la construction de l'intermédiaire tétraédrique formé du GSH et du cristal de l'intermédiaire acyl-enzyme.	52
Figure 12. Caractéristiques du plasmide pPICZ α A	59
Figure 13 Appareil «Stirred cell» d'Amicon pour la concentration.....	69

Figure 14. Gel d'électrophorèse de protéine d'échantillons de la purification de la GGT humaine recombinante par concentration au «Stirred cell» et chromatographie d'affinité avec une colonne de Ni-NTA.76

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1. Représentation du cycle du γ -glutamyle dans une cellule.	6
Schéma 2. Représentation des différentes réactions catalysées par la GGT	8
Schéma 3. Mécanisme ping-pong modifié proposé pour la GGT.	9
Schéma 4. Structure de la GGT bactérienne <i>E.coli</i>	12
Schéma 5. Structure acyl-enzyme de la GGT <i>E.coli</i>	13
Schéma 6. Méthode de dérivation par diazotation de la <i>p</i> -nitroaniline libérée par la GGT. R représente l'entité γ -glutamyle.	21
Schéma 7. Cinétique discontinue pour l'étude de l'étape d'acylation de la GGT.	23
Schéma 8. Méthode de dérivation au DABS-Cl des différentes amines libérées par la GGT.....	25
Schéma 9. Synthèse du L- γ -Glu-Ala-Gly	34
Schéma 10. Synthèse des dérivés γ -glutamylamides	42
Schéma 11. Synthèse de la L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide	45
Schéma 12. Étapes pour effectuer le sous-clonage de la GGT tronquée dans le plasmide pPICZ α A et la transformation dans les bactéries <i>E.coli</i>	61
Schéma 13. Étapes pour effectuer la transformation des levures <i>P.pastoris</i> et l'intégration de l'ADN plasmidique dans leur génome	63
Schéma 14. Étapes pour l'expression de la GGT humaine tronquée à partir de la levure <i>P.pastoris</i> transformée avec le plasmide pPICZ α A-hGGT Δ	65
Schéma 15. Étapes pour l'expression et la purification de la GGT humaine.	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Pourcentage d'identité entre les séquences primaires de la GGT de différentes espèces.....	4
Tableau II. Paramètres cinétiques des substrats testés comme substrat donneur dans la réaction de transpeptidation en présence de 20 mM Gly-Gly à pH 8,0 et à 37°C.....	48
Tableau III. Concentration de la GGT humaine recombinante par le «Stirred cell» et purification par Ni-NTA.....	72
Tableau IV. Concentration de la GGT humaine recombinante par sulfate d'ammonium et purification par Ni-NTA.....	73
Tableau V. Conditions chromatographiques utilisées pour obtenir une séparation complète	98

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	Groupement acétyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Ala	Alanine
Asp	Acide aspartique
Arg	Arginine
ATP	Adénosine triphosphate
AOX1	Oxydase d'alcool
AOX2	Oxydase d'alcool mutée
Bn	Groupement protecteur Benzyle
BMGY	« Buffered Glycerol-complex Medium »
BMMY	« Buffered Methanol-complex Medium »
Boc	Groupement protecteur <i>tert</i> -butoxycarbonyle
CHES	Acide 2-[N-cyclohexylamino]éthane sulfonique
cm	Centimètre
Cys	Cystéine
d	Doublet
D	Isomère de configuration absolue D
Da	Dalton
DABITC	4-N,N-diméthylaminoazobenzène-4'-isothiocyanate
DABS-Cl	Chlorure de dabsyle
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DON	6-diazo-5-oxonorleucine
E	Enzyme
EC	Enzyme Commission (numéro de classification des enzymes)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
éq.	Équivalent
Et	Groupement éthyle
EtOAc	Acétate d'éthyle
Fmoc-Cl	Chloroformate de 9-fluorénylméthyle
g	Gramme
GGT	γ -Glutamyltranspeptidase
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
GluGlyGly	Glutamylglycylglycine
Gly	Glycine
GlyGly	Glycylglycine
GSH	Glutathion

HEPES	<i>N</i> -[2-hydroxyéthyl] pipérazine- <i>N'</i> -[acide 2-éthane sulfonique]
His	Histidine
hGGT	γ -Glutamyltranspeptidase humaine
hGGT Δ	γ -Glutamyltranspeptidase humaine tronquée
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de couplage
<i>k_{cat}</i>	Constante de vitesse de premier ordre d'une réaction enzymatique
kDa	Kilodalton
<i>K_M</i>	Constante Michaelis
<i>K_b</i>	Constante Michaelis pour le substrat accepteur
L	Isomère de configuration absolue L
M	Molaire
Me	Méthyle
Met	Méthionine
m	Multiplet
M	Molaire
MAB	« Metastable atom bombardment » (en spectrométrie de masse)
MES	Acide 2-morpholinoéthanesulfonique
MHz	Mégahertz
mL	Millilitre
mg	Milligramme
mM	Millimolaire
MOPS	Acide 3-[<i>N</i> -morpholino] propanesulfonique
nm	Nanomètre
Ni-NTA	Chromatographie d'affinité Nickel-acide nitrilotriacétique
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neissera meningitidis</i>
<i>Norm</i>	Normalisé
Ntn	« <i>N</i> -terminal nucleophile »
<i>o</i>	Substitution en ortho sur un cycle aromatique
OPA	<i>o</i> -phtaldéhyde
<i>p</i>	Substitution en para sur un cycle aromatique
psi	« pound square inch »
<i>P_i</i>	Phosphate inorganique
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
p.f.	Point de fusion
pH	Logarithme négatif de la concentration de proton
PITC	phénylthiocyanate
p <i>K_a</i>	Logarithme de la constante d'acidité d'un acide
PMSF	Fluorure de phénylméthanesulfonyle
<i>P.pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>

ppm	Partie par million
q	Quadruplet
R, R', R''	Chaîne alkyle
R _f	Mobilité relative
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ser	Sérine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SMHR	Spectre de masse haute résolution
t	Triplet
TBTU	Tétrafluoroborate de benzotriazol-1-yl-oxy-1,1,3,3-tétraméthyluronium
TCA	Acide trichloroacétique
TFA	Acide trifluoroacétique
Thr	Thréonine
TMOSOTF	Triméthylsilyltrifluorométhanesulfonate
U	Unité d'enzyme
UV-Vis	Longueur d'onde Ultra-violet et visible
V	Volt
V _{Max}	Vitesse maximale
YPD	Milieu de culture « Yeast Peptone Dextrose »
δ	Déplacement chimique
ε	Coefficient d'extinction molaire
λ	Longueur d'onde
σ	Paramètre sigma de Hammet, relié au pK _a
μg	Microgramme
μm	Micromètre
μM	Micromolaire

À mes parents,
pour leur soutien,
leur générosité et
pour m'avoir transmis
le désir d'élargir
mes connaissances

REMERCIEMENTS

Mes plus sincères et profonds remerciements s'adressent d'abord à Pr. Jeffrey Keillor, mon directeur de recherche. Grâce à lui j'ai pu accéder et réaliser ainsi mes études supérieures au sein de son groupe.

Je lui dois toute ma gratitude de m'avoir confié des projets de recherches à la fois très intéressants et instructifs qui ont contribué à mon développement personnel.

De plus, je ne voudrais oublier de souligner tout le soutien généreux que j'ai reçu de ce mentor si avisé et disponible.

À ce sujet, je termine ici en remerciant Pr. Keillor de nous avoir si bien démontré que l'on pouvait être un érudit de la chimie tout en étant une merveilleuse personne humaine.

Il y a aussi tous les membres du groupe à qui je dois adresser mes remerciements. L'entraide, l'esprit d'équipe et le soutien de ces consœurs et confrères m'ont été des plus importants tout au long de ces deux années d'études.

Parmi eux, je réserve une pensée toute spéciale envers Dr. Roselyne Castonguay dont les conseils et son travail de correction pour ce mémoire m'ont été fort utiles.

D'autre part, je ne peux omettre l'aide que m'ont offert les étudiants du Pr. Joëlle Pelletier quant à l'aspect biochimique de mon projet, entre autres Jordan Volpato et Nicolas Doucet.

Outre mes parents qui m'ont toujours soutenu, il y a certes mon mari François dont les encouragements et la patience ont contribué à me donner le courage de me rendre au bout de ce défi, ma maîtrise en chimie.

CHAPITRE 1

Introduction

1.1 Découverte des enzymes

La découverte des enzymes a été un moment clé de l'histoire de la science de la vie puisqu'elle a permis de comprendre plusieurs réactions chimiques du métabolisme des vivants. En fait, les enzymes sont des protéines qui permettent entre autres la catalyse de ces réactions. Par ailleurs, il est à noter qu'elles sont hautement spécifiques à la nature des substrats, ce qui est un avantage, car très peu de produits secondaires sont observés à la fin d'une réaction.¹ De plus, les enzymes sont de puissants catalyseurs, car elles accélèrent en moyenne 10^6 fois une réaction non catalysée et de plusieurs fois les réactions catalysées chimiquement.¹

C'est au début du XIX^{ème} siècle que les théories vitalistes sont à leur apogée. À cette époque, plusieurs chercheurs croyaient que les substances organiques, celles qui proviennent des vivants, relevaient d'une mystérieuse force vitale. Cette dernière conception fut annihilée par la découverte de Friedrich Wöhler en 1828.² Ce dernier réussit à synthétiser pour la première fois une substance organique du vivant, l'urée, et cela en l'absence de tout être vivant. À la même époque, Berzélius suggère la présence d'une force catalytique chez les êtres vivants.³ On découvre que certaines substances sont reconnues comme étant capables d'accélérer des réactions chimiques sans être elles-mêmes modifiées par la réaction. En fait, ces substances sont des catalyseurs. Les catalyseurs connus étaient alors des métaux comme le platine et ne se trouvaient pas chez les vivants.⁴ Enfin, c'est en 1835 que Berzélius, dans la première étude théorique générale sur la catalyse chimique, remarqua qu'un extrait de malt appelé diastase catalysait l'hydrolyse de l'amidon dans des conditions compatibles avec la vie; cette réaction est faite dans des conditions assez douces de pH et de température, à une vitesse bien supérieure à celle obtenue par l'acide sulfurique.¹ Cette première enzyme, la diastase, ouvrit les portes sur la découverte de nombreuses autres diastases provenant de tissus végétaux et animaux.

Par la suite, E. Fisher suggéra un modèle qui permet encore aujourd'hui de mieux comprendre la spécificité des enzymes. Ce modèle propose que le substrat agisse

comme une clé alors que l'enzyme correspond à la serrure. Ainsi, seule la clé complémentaire à la serrure peut entrer dans cette dernière.¹

Toutefois, les réactions enzymatiques étudiées à la fin du XIX^{ième} siècle étaient en général, encore relativement simples comparativement à l'ensemble des phénomènes vitaux existants. Soulignons par contre, qu'en 1897, E. Büchner démontra un processus vital complexe, la fermentation alcoolique.³ Il réalisa cette expérience en présence de sucre et d'un extrait acellulaire de levures.

À ces découvertes plusieurs prix Nobel sont attachés. Par exemple, G. Beadle et E. Tatum (prix Nobel 1958)⁵ démontrèrent que chaque enzyme est encodée par un seul gène. Puis les trois chercheurs français, A. Lwoff, J. Monod et F. Jacob (prix Nobel 1965)⁶ ont fait des recherches sur la manière dont l'expression des enzymes est régulée au niveau des gènes. Ils ont expliqué la transcription de l'ADN à travers l'ARN messenger durant la synthèse de la protéine. Plus près de nous, W. Aber, D. Nathans et H. Smith (prix Nobel 1978)⁷ ont fait la découverte des enzymes de restriction et de leurs applications aux problèmes de la génétique moléculaire. En 1990, l'ADN-polymérase avait été élue molécule de l'année, suite à la découverte d'une nouvelle technique en 1985, par K.B. Mullis et F. Faloona, qui permet d'amplifier l'ADN, soit la polymérisation en chaîne (PCR).⁸

Finalement, ce qui a été énoncé précédemment n'est qu'une petite partie de l'histoire des enzymes, car encore aujourd'hui une multitude de découvertes sur ce sujet sont réalisées.

1.2 La γ -glutamyltranspeptidase

1.2.1 Généralités

La γ -glutamyltranspeptidase (GGT) (EC 2.3.2.2) est une enzyme hétérodimérique hautement glycosylée d'environ 68 kDa. Elle est composée normalement de deux sous-unités dont une grande ayant un poids moléculaire de 46 kDa et une petite d'environ 22 kDa⁹ et est liée à la surface externe des cellules par une ancre transmembranaire située sur la grande sous-unité.^{9,10} Les sous-unités sont retenues ensemble par une interaction non-covalente. De plus, elles proviennent d'un unique précurseur inactif, qui une fois clivé, permet d'obtenir l'enzyme active.^{11,12} Ces caractéristiques sont perçues chez la GGT de mammifère.

La GGT se retrouve chez plusieurs autres organismes vivants dont les bactéries, par exemple *Escherichia coli*¹³ et *Neissera meningitidis*,¹⁴ chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*¹⁵ et les plantes.^{3,16} La comparaison des pourcentages d'identité des séquences primaires de la GGT provenant de différents organismes est présentée au tableau I.

Tableau I. Pourcentage d'identité entre les séquences primaires de la GGT de différentes espèces.^{14, 17, 18}

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

La GGT de mammifères se retrouve dans plusieurs organes, principalement dans les reins. Cette enzyme se situe également au niveau du foie,^{16,19} du pancréas,¹⁶ du cerveau,²⁰ du sérum,²¹ des cellules lymphoïdes²² et dans plusieurs autres organes. La

GGT provenant des reins de rat est l'une des plus étudiées. Cependant, la première et seule structure cristalline obtenue avec une bonne résolution provient de la GGT de *E. coli*, suite aux études du groupe de Fukuyama.²³

1.2.2 Rôles physiologiques

La GGT est au cœur de plusieurs rôles physiologiques. D'abord, certaines études laissent croire qu'elle permettrait la dégradation et la formation du glutathion (γ -glutamylcystéinyglycine, GSH), son substrat naturel, chez les mammifères en suivant le cycle de γ -glutamyle qui est représenté au schéma 1.^{18,24,25}

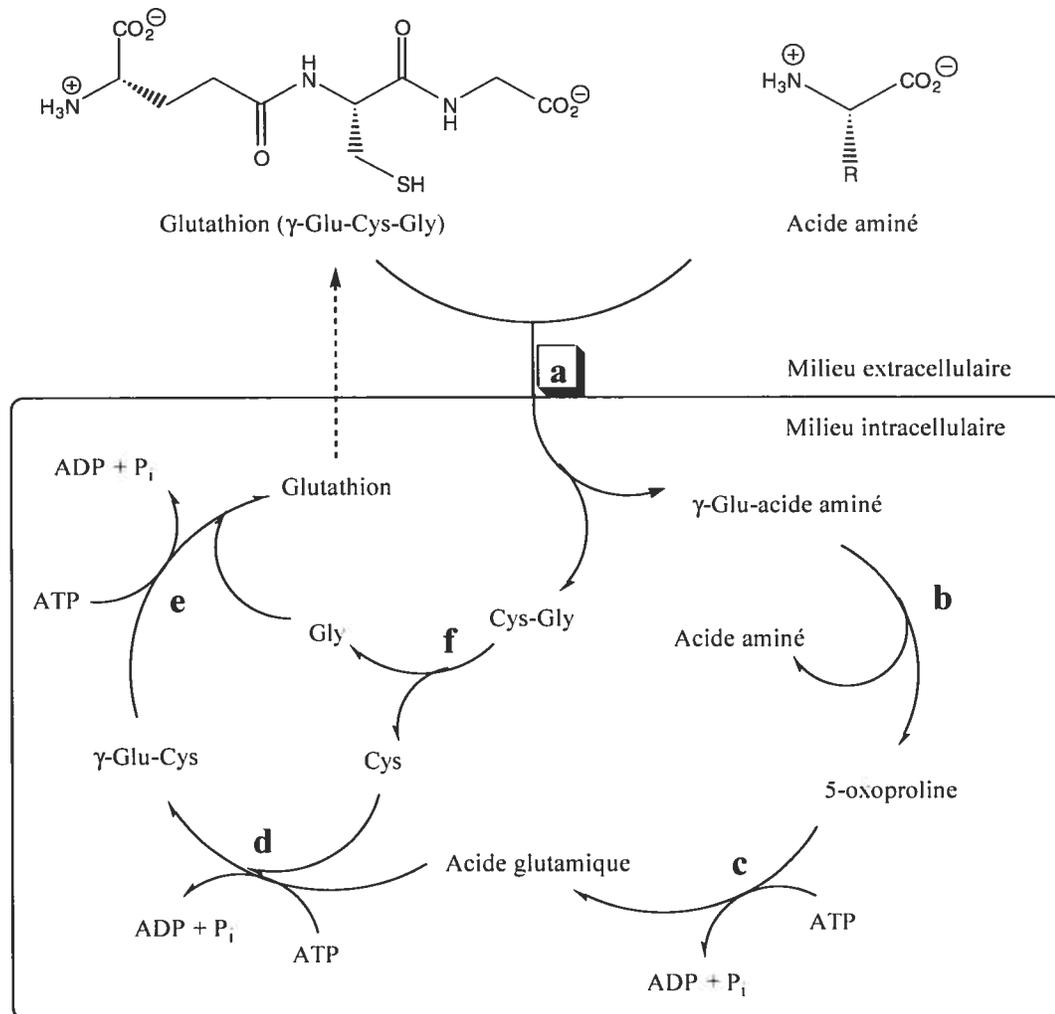


Schéma 1. Représentation du cycle du γ -glutamyle dans une cellule. Les enzymes sont la γ -glutamyltranspeptidase (a), la γ -glutamyl cyclotransférase (b), la 5-oxoprolinase (c), la γ -glutamylcystéine synthétase (d), la glutathion synthétase (e) et une protéase intracellulaire (f). R représente une chaîne latérale d'un acide aminé.¹⁸

La GGT (a) effectue la dégradation du glutathion, à l'extérieur de la cellule, en clivant la partie γ -glutamyle qui sera transférée sur un acide aminé. Cette première réaction génère alors le dipeptide Cys-Gly et un composé γ -Glu-acide aminé. Ceux-ci entrent ensuite dans la cellule, ce qui entraînera la dégradation par une protéase (f) du dipeptide pour donner la Cys et la Gly alors que le γ -Glu-acide aminé est transformé par l'action des γ -glutamyl transférase (b) et 5-oxoprolinase (c) pour donner le Glu et l'acide aminé.

Par la suite, la γ -glutamylcystéine synthétase (d) et la glutathion synthétase (e) permettent la synthèse du GSH. Le glutathion peut donc jouer son rôle au niveau intracellulaire ou bien sortir à l'extérieur de la cellule. Ainsi, certains chercheurs ont émis l'hypothèse que le cycle du γ -glutamylo permettrait le transport d'acides aminés à l'intérieur des cellules grâce à la dégradation du glutathion par la GGT.²⁴

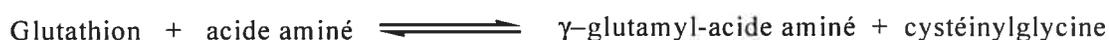
L'activation de prodrogues tels que la dermorphine²⁶ et certains dérivés du phénol²⁷ est possible par la GGT. Cette dernière est également impliquée dans la détoxification cellulaire puisqu'elle permet l'élimination d'acides mercapturiques.¹⁰ Ce sont les isoenzymes du glutathion-S-transférase qui permettent le couplage du GSH à d'autres composés chimiques pour former ces acides qui seront éliminés du corps.¹⁰ Ainsi, la partie γ -glutamylo du composé glutathion S-conjugué formé est clivé par la GGT. Par la suite, le dipeptide Cys-Gly est dégradé. La glycine est clivée et la cystéine à la position N-terminale est acétylée provoquant alors l'élimination, via les voies urinaires, de l'acide mercapturique ainsi formé. De plus, la conversion des leucotriènes C₄ et D₄ peut être effectuée par ce même processus impliquant la GGT.²⁸

La GGT est également en cause dans certains désordres physiologiques. Entre autres, elle se retrouve en grande quantité dans le cerveau des personnes atteintes de la maladie de Parkinson.²⁹ Elle crée aussi une résistance aux médicaments¹⁰ en hydrolysant les complexes formés entre le glutathion et la cisplatine; ceux-ci sont alors rapidement éliminés du corps humain ce qui est une preuve de cette résistance.³⁰ De plus, en présence de fer, la GGT est directement impliquée dans la formation de peroxydes causant l'inhibition de l'apoptose, ce qui peut donc mener à la prolifération des tumeurs.³¹ Enfin, elle peut agir dans certains cas comme marqueur hépatique pour le diagnostic du cancer du foie,³² mais aussi pour la détection de l'alcoolémie.²¹

1.2.3 Réactions catalysées

La GGT est capable de catalyser trois différentes réactions avec son substrat naturel, le glutathion.³³ Ces réactions sont toutes caractérisées par le bris du lien amide du groupement carboxamide de la chaîne latérale du substrat dit donneur. Par la suite, la portion γ -glutamyle est transférée à un autre substrat dit accepteur. Ces trois réactions sont représentées au schéma 2.

Transpeptidation



Autotranspeptidation



Hydrolyse



Schéma 2. Représentation des différentes réactions catalysées par la GGT³³

Dans la réaction de transpeptidation la GGT effectue le transfert de l'entité γ -glutamyle du substrat donneur, le GSH, à un substrat accepteur qui est soit un acide aminé ou un dipeptide.³⁴ Cette réaction libère dans un premier temps le produit Cys-Gly et forme, ensuite, un produit de type γ -glutamyl-acide aminé contenant un nouveau lien amide du groupement carboxamide de la chaîne latérale. À une plus haute concentration, le GSH peut réagir autant comme substrat donneur que substrat accepteur ce qui donne lieu au second type de réaction catalytique, l'autotranspeptidation.³³ Pour éviter l'autotranspeptidation lors de l'étude de la transpeptidation, une concentration élevée en substrat accepteur ou un substrat donneur de configuration D doit être utilisé. Finalement, l'hydrolyse s'effectue lorsque le substrat accepteur est une molécule d'eau.³² Cette troisième réaction est irréversible et forme l'acide glutamique. La GGT reconnaît aussi bien les substrats donneurs de configuration L ou D.³⁵ Notons ici que

seuls les substrats accepteurs de configuration L sont reconnus.¹⁰ Il en résulte donc qu'en utilisant des substrats donneurs de configuration D, en présence d'eau comme substrat accepteur, seule la réaction d'hydrolyse peut avoir lieu.

Le modèle mécanistique proposé dans la littérature et qui est le plus probable pour la GGT, est de type ping-pong modifié,^{10,33} tel qu'illustré au schéma 3.

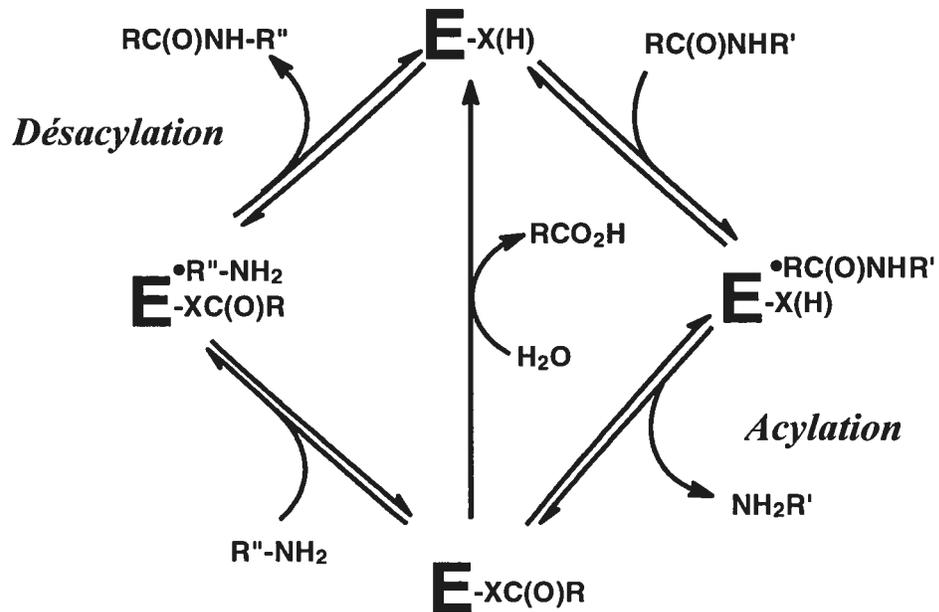


Schéma 3. Mécanisme ping-pong modifié proposé pour la GGT. E représente la GGT libre. X est le nucléophile non identifié. R, R' et R'' sont des chaînes alkyles.

Dans un premier temps, selon ce modèle, l'enzyme libre se lie au substrat donneur (le glutathion) pour former un complexe Michaelis. L'enzyme clive le lien amide de ce premier substrat et forme dans une étape d'acylation, un intermédiaire γ -glutamyl-enzyme. À cet instant, il y a également libération d'un premier produit (Cys-Gly). Par la suite, un substrat accepteur, soit un acide aminé ou un dipeptide, se lie à l'acyl-enzyme pour former un nouveau complexe Michaelis. Ensuite, lors de la transamidation, un deuxième produit est libéré (γ -glutamyl-acide aminé) et l'enzyme libre est régénérée. Par contre, si l'acyl-enzyme réagit avec l'eau comme substrat accepteur, il y aura la formation de l'acide glutamique, lors d'une étape d'hydrolyse

irréversible, ainsi que la régénération de l'enzyme libre. Cette étape d'hydrolyse est en fait la modification du mécanisme ping-pong. Des études effectuées dans notre groupe³⁶ en état pré-stationnaire grâce au mélangeur à inhibition rapide («rapid-mix quench») ont montré que les deux substrats, donneur et accepteur, ne se lient pas en même temps à l'enzyme libre puisqu'un graphique biphasique a été obtenu. Cela a donc confirmé que le mécanisme est de type ping-pong et qu'une modification covalente de l'enzyme est impliquée. Ces résultats ont également été confirmés grâce au mélangeur à flux rapide («stopped-flow») puisqu'une courbe biphasique a également été obtenue par cette méthode.³⁶

1.2.4 Substrats de la GGT

Jusqu'à ce point, dans ce mémoire, le seul substrat donneur qui a été présenté est le glutathion. Cependant, plusieurs autres substrats donneurs ont été étudiés dans différents groupes. Enfin, tous les substrats donneurs de la GGT doivent contenir une partie γ -glutamyle pour être reconnus par cette enzyme. Entre autres, le composé L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide est l'un des plus employés puisque la catalyse libère la *p*-nitroaniline, un composé de couleur jaune, qui est facilement détectable par la spectrophotométrie UV-Vis.³⁷ De plus, ce composé possède des caractéristiques cinétiques comparables à celles du GSH.³⁸ Dans notre groupe, des études ont également été menées à partir de substrats donneurs γ -glutamylanilide-*p*-substitués.³⁹ Les résultats cinétiques obtenus sont également similaires à ceux du GSH. La catalyse d'autres substrats comme le γ -glutamyl-7-amino-4-(trifluorométhyl) coumarine⁴⁰ et le γ -glutamyl- α -naphtylamide⁴¹ se suivent facilement grâce à la fluorimétrie dû à la libération de composés fluorescents. Il y a donc plusieurs méthodes de suivi de la réaction enzymatique, chacune avec ses qualités et ses défauts.

Pour être reconnu par la GGT, le substrat donneur doit, comme dit précédemment, avoir une entité γ -glutamyle. Cependant, l'enzyme n'est pas stéréospécifique envers ces substrats. Les substrats donneurs peuvent donc avoir la configuration L ou D sans qu'il y ait une grande différence dans les valeurs de constantes cinétiques³⁵. La chaîne latérale

des substrats ne peut être modifiée à l'exception de la position α qui permet la présence d'un groupement méthyle.⁴² Des études menées par des collègues de notre équipe, ont démontré que le groupement α -ammonium devait rester libre alors que le groupement α -carboxylique pouvait être changé par un méthyl ester ou un amide primaire.⁴³ D'autre part, les substrats accepteurs reconnus sont les acides aminés ou les dipeptides.⁴⁴ Les tripeptides sont quant à eux difficilement reconnus.⁴⁴ La configuration absolue des substrats accepteurs doit être L.⁴⁵ La majorité des acides aminés sont reconnus comme substrats accepteurs, mais les meilleurs sont la L-cystine, la L-glutamine et la L-méthionine.⁴⁵ En ce qui concerne les dipeptides, le meilleur substrat est la L-Met-Gly.⁴⁵ Ajoutons que le Gly-Gly est également un efficace substrat accepteur lors de la réaction de transpeptidation.^{17, 33} Finalement, pour étudier l'étape de désacylation, une série de substrats de type L-Met-amide a été synthétisée et testée dans notre groupe.⁴⁶ Cependant, leur constante Michaelis pour le substrat accepteur (K_b) se situe en général aux alentours de 30 mM ce qui est beaucoup moins reconnu que le Gly-Gly ou la L-méthionine (4.7 mM).⁴⁷ De plus, des études provenant de notre groupe ont montré que mettre un hétéroatome à la position γ de la chaîne principale de l'entité γ -glutamyle permettait d'avoir des composés qui agissent uniquement comme substrats accepteurs.⁴⁸

1.2.5 Sites de liaison et catalytique de la GGT

Encore aujourd'hui, la structure de la GGT humaine reste incertaine, car aucune structure par rayon X pour ce type de GGT a été obtenue. Cependant, le groupe de recherche de Sakai a obtenu une structure cristalline par rayons-X de la GGT bactérienne *E. coli*, en 1993, mais comme la résolution n'a pas été suffisamment bonne, soit 3 Å, la position des résidus catalytiques n'a pu être définie de manière précise.^{49,50} Ce n'est que récemment que le groupe de recherche de Fukuyama²³ a réussi à définir la structure cristalline de la GGT de *E. coli* avec une assez bonne précision, soit 1,95 Å. (Schéma 4) Malgré tout, plusieurs études précédentes ont permis de proposer la nature des acides aminés impliqués dans la catalyse enzymatique et dans la reconnaissance des substrats.

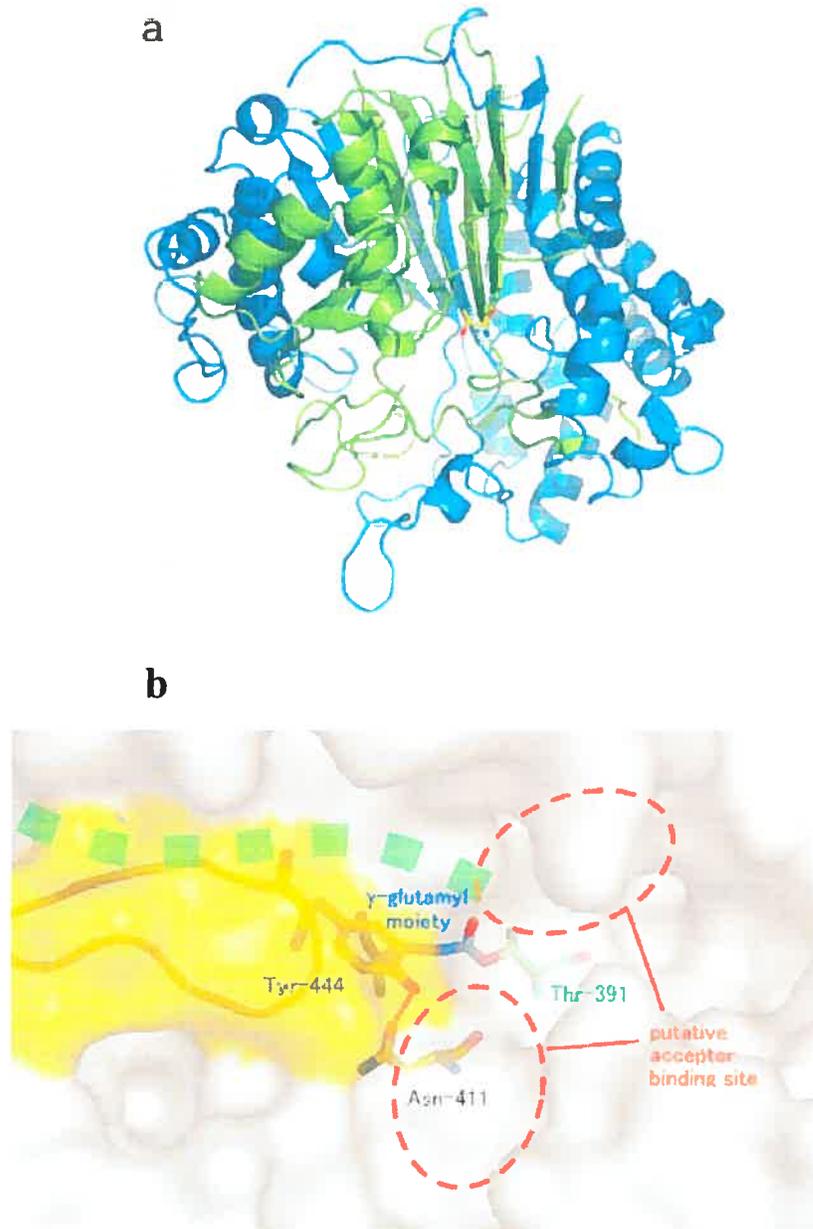


Schéma 4. Structure de la GGT bactérienne *E.coli* a) Structure de l'enzyme libre. La grande sous-unité est colorée en bleu alors que la petite sous-unité est colorée en vert. (PDB : 2DBU) b) Structure de l'enzyme liée. La partie γ -glutamyle est en bleu, le nucléophile (Thr-391) en vert et le tunnel formé des résidus Asn-411 et Tyr-444 est en jaune.²³ (PDB : 2DBW)

1.2.5.1 Site de liaison

Des études de mutagenèse ont permis d'identifier quelques acides aminés importants dans le site de liaison du substrat donneur de la GGT humaine.

Parmi eux, les résidus Asp-422 et Asp-423 de la petite sous-unité semblent importants au niveau de la liaison du substrat donneur chez la GGT humaine.⁵¹ En mutant Asp-423, l'affinité de la GGT pour le substrat donneur a considérablement diminué. Le même phénomène a également été observé, mais avec une diminution moins marquée de l'activité enzymatique, suite à la mutation de l'Asp-422. Un autre résidu provenant de la GGT humaine, l'Arg-107, semble aussi présent dans la liaison du substrat donneur^{10,52} car la mutation de ce résidu par la glutamine montre une baisse d'affinité pour ce substrat. Le groupement guanidinium pourrait interagir avec l'entité α -carboxylique de la chaîne principale du substrat donneur à partir d'interactions électrostatiques et de ponts hydrogènes.⁹

En fait, les études de cristallographie à partir de la GGT de *E. coli*²³ (schéma 5) ont permis de confirmer certaines études de mutagenèse énoncées précédemment, car il faut noter que les résidus impliqués dans la liaison du substrat donneur chez *E. coli* sont conservés chez tous les types de GGT.

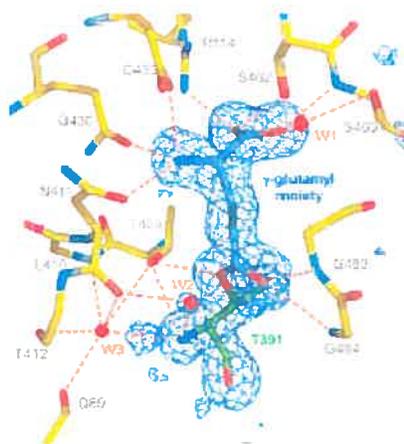


Schéma 5. Structure acyl-enzyme de la GGT *E.coli*.²³ (PDB : 2DBW)

Tout d'abord, les résidus de la GGT bactérienne *E. coli* responsables de lier le groupe α -amino du substrat donneur sont l'Asn-411, la Gln-430 et l'Asp-433. Ce qui permet de croire que l'Asp-423 est responsable de lier le substrat donneur chez l'humain, puisque le résidu Asp-433 chez *E. coli* correspond en fait à ce dernier chez l'humain.

Ensuite, ces études²³ démontrent que les résidus responsables de lier le groupement carboxylique du substrat donneur chez la GGT *E. coli* sont l'Arg-114, la Ser-462 et la Ser-463. Encore une fois, l'étude de cristallographie concorde celle de mutagenèse, car l'Arg-107 chez l'humain correspond à l'Arg-114 chez *E. coli*.

Il a été montré, par ces études,²³ que l'oxygène du carbonyle appartenant au groupement γ -glutamyle est lié par un pont hydrogène avec les chaînes principales des groupements aminés Gly-483 et Gly-484. Encore une fois, ces résidus sont conservés chez la GGT de mammifères et ils semblent former le trou oxyanionique chez la GGT de *E. coli*.

Finalement, une mutation du résidu Glu-108 provenant de la grosse sous-unité de la GGT humaine en glutamine a aussi été effectuée. Ces études portent à croire que ce résidu serait plutôt impliqué dans la liaison du substrat accepteur en liant au niveau du groupement α -aminé.⁵² Par contre, Fukayama²³ a démontré qu'il est peu probable que ce résidu fixe le substrat accepteur, car le Glu-115 (chez l'humain, Glu-108) est situé à l'intérieur de l'enzyme et est lié à l'Arg-114 par une molécule d'eau et à Gln-430. En fait, il contribuerait plutôt à fixer la chaîne latérale de ces derniers résidus à la bonne position, car Arg-114 et Gln-430 sont liés respectivement par des ponts hydrogènes au groupement α -carboxylique et α -amino du substrat donneur²³.

1.2.5.2 Site catalytique de la GGT

Le nucléophile de la GGT n'étant pas encore identifié chez les mammifères avec certitude, des études à partir d'inhibiteurs montrés à la figure 1 ont dû être menées afin d'obtenir des indices sur la nature réelle de ce dernier.²⁵

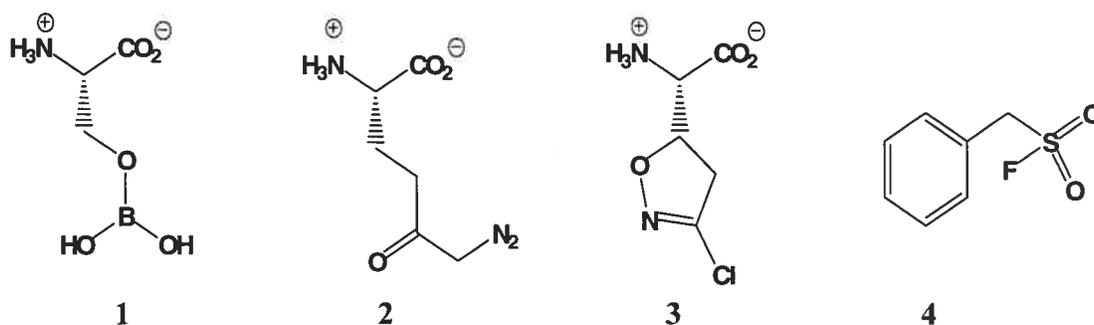


Figure 1. Structure de divers inhibiteurs pour la GGT. Dans l'ordre, (1) complexe L-sérine-borate, (2) le 6-diazo-5-oxonorleucine (DON), (3) l'acivicine, (4) fluorure de phénylméthane sulfonyle (PMSF)

Des études à partir du complexe L-sérine borate (1),³¹ un inhibiteur réversible, ont montré que la sérine se liait probablement à l'endroit où la partie γ -glutamyle se fixe alors que l'anion de borate forme un complexe entre le groupe hydroxyle de la sérine et celui du site actif de l'enzyme. Les inhibiteurs irréversibles 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) (2), ainsi que la L-diazoacétylsérine (L-azasérine) ont permis la localisation du site d'inhibition sur la petite sous-unité.⁵³ Mais, c'est grâce à l'acivicine (acide (α S, 5S)- α -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacétique, AT-125) (3), un autre inhibiteur irréversible, qui a été marqué avec un radio-isotope ^{14}C que le résidu Thr-523 de la petite sous-unité a pu être identifié comme un nucléophile potentiel de la GGT⁵⁴. Le fluorure de phénylméthane sulfonyle (PMSF) (4)^{31, 55} est reconnu pour inhiber les protéases à sérine dans certaines conditions. En présence de maléate, l'inhibition par PMSF pour la GGT de rein de rat a été accélérée. Encore une fois, cet inhibiteur semble modifier le même groupement hydroxyle du site actif que les inhibiteurs DON et L-azasérine. Il est à noter que toutes ces études portent à croire que le nucléophile serait une sérine ou une thréonine, mais aucune d'entre elles permettent de confirmer le nucléophile.

Grâce à la spectroscopie de masse, des chercheurs ont réussi à identifier le résidu nucléophile de la GGT de *E. coli*.⁵⁶ Ainsi, les études de spectroscopie de masse à partir de l'inhibiteur irréversible, l'acide 2-amino-4-(fluorophosphono)butanoïque ont

démontré que la Thr-391 est le nucléophile de cette GGT bactérienne.⁵⁶ Conservé chez toutes les espèces de GGT dont la séquence est connue, ce résidu est situé à la position N-terminale de la petite sous-unité.⁵⁶ Suite à ces résultats, les chercheurs ont suggéré que la GGT soit un membre potentiel de la famille des Ntn-hydrolase. Ainsi, les membres de cette famille possèdent tous leur nucléophile catalytique soit la sérine, la thréonine ou la cystéine, à la position N-terminale d'une de leurs sous-unités.

La GGT possède également d'autres caractéristiques retrouvées chez les membres de la famille des Ntn-hydrolases. Parmi elles, l'auto-activation d'un précurseur par le nucléophile, qui permet chez tous ces membres d'obtenir l'enzyme active.⁵⁷ La structure cristalline préliminaire de la GGT de *E. coli* a présenté une autre caractéristique à cette famille, soit la présence de deux feuillets β plissés antiparallèles.⁵⁰

Le groupe de Fukuyama a permis de confirmer grâce à la cristallographie que le nucléophile de la GGT de bactérie est bel et bien la Thr-391. De plus, ils ont montré que le résidu Thr-409 est important dans le site actif, car il forme un pont hydrogène avec la Thr-391 O γ . Le nucléophile forme également des ponts hydrogène avec la Gly-483 et Gly-484 ; comme dit précédemment, ces derniers résidus formeraient le trou oxyanionique. Il est important de mentionner que ces résidus du site actif sont tous retrouvés chez la GGT de bactérie et celle de mammifères.

Finalement, des études cinétiques effectuées dans notre groupe ont montré l'importance d'un acide général dans le site actif pour assurer la protonation du groupement partant. Il a été supposé que le résidu en question soit probablement une amine.³⁹ Les études de Fukuyama²³ à partir de la structure de la GGT de *E. coli* ont montré que le pK_a obtenu concordait à celui de l'amine de la thréonine en N-terminal de la petite sous-unité ce qui est en accord avec les mesures de ΔH_a obtenues dans notre groupe.

1.3 Objectifs de recherche

Jusqu'à maintenant, de nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre le mécanisme catalytique, les acides aminés impliqués dans la catalyse et la liaison des

substrats de la GGT. Ainsi, de nouvelles informations sur le sujet permettraient d'accroître notre connaissance de son rôle physiologique favorisant de ce fait la conception d'inhibiteurs puissants pour contrer les désordres physiologiques causés par la GGT. C'est dans ce but que les objectifs de recherches suivants permettront d'approfondir les connaissances sur cette enzyme, surtout pour le type humain, nous l'espérons.

1.3.1 Optimisation et validation d'une méthode d'analyse par HPLC

Il existe plusieurs méthodes de suivi des réactions enzymatiques afin de mieux connaître le cycle catalytique de la GGT. Une méthode HPLC a déjà été développée dans notre groupe.⁵⁸ Cette méthode s'avère très utile pour suivre la réaction de manière discontinue de plusieurs substrats analogues de la GGT qui comme le glutathion, ne possèdent pas de groupements chromophores pouvant être directement détectés par la spectrophotométrie. Ainsi, le premier objectif de cette recherche a été d'optimiser la méthode de détection par analyse chromatographique (HPLC) des amines primaires dérivées chimiquement par le chlorure de dabsyle et de vérifier les applications possibles de celle-ci. Ainsi, à partir du substrat accepteur L-Ala-Gly, la méthode pourra être validée et cela permettra d'étudier l'étape de transamidation au niveau de la désacylation. Pour y arriver, il faut nécessairement effectuer la synthèse du L- γ -glutamyl-L-Ala-Gly pour tracer la courbe étalon permettant de corriger les valeurs obtenues suite à l'analyse par HPLC. De plus, une courbe pH-vitesse pour la réaction de transpeptidation du glutathion a été effectuée pour la première fois. La méthode, son optimisation, la courbe pH-vitesse et les études cinétiques à partir du substrat accepteur L-Ala-Gly seront présentées au chapitre 2.

1.3.2 Synthèse d'un substrat analogue et études cinétiques de l'étape d'acylation

Une étude a déjà été réalisée dans notre groupe avec des dérivés γ -glutamylanilides-*p*-substitués.³⁹ Ainsi, des études cinétiques à partir de substrats analogues au substrat naturel, soit une série de dérivés γ -glutamylamides, permettraient une meilleure

compréhension du mécanisme physiologique. La méthode HPLC développée permet de réaliser ces études. Pour compléter les études préalablement commencées dans notre groupe,⁵⁸ un autre substrat de type γ -glutamylamide a été synthétisé : le L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthane. Un graphique de type Brønsted (graphique de la vitesse de catalyse de la réaction en fonction du pK_a de l'amine primaire libérée) a été par la suite tracé. La synthèse de ces produits et les résultats cinétiques seront présentés au chapitre 3.

1.3.3 Optimisation de l'expression et de la purification de la GGT recombinante humaine exprimée dans les levures.

Jusqu'à maintenant, peu de méthodes ont été développées afin d'obtenir une bonne quantité de GGT recombinante de mammifère ayant, de plus, les mêmes caractéristiques que celle purifiée de l'organe. Aussi, les études préalablement effectuées dans notre laboratoire ont été réalisées avec de la GGT purifiée de reins de rats. Pour cela, un système permettant d'obtenir la GGT en bonne quantité de manière efficace doit être développé. À cet effet, un système d'expression dans les levures a été développé par Dr. Roselyne Castonguay.¹⁸ Ainsi, le clonage du gène de la GGT humaine dans un vecteur, suivi de l'expression et de la purification de la protéine, a permis, à partir d'un système de levures, d'obtenir une très bonne alternative à l'enzyme purifiée directement des organes. L'objectif ultime de cette recherche est d'optimiser ce système au niveau de l'expression et de la purification. Les étapes suivies et les résultats obtenus seront présentés au chapitre 4.

Les résultats présentés dans les chapitres deux et trois ont fait l'objet de l'article suivant : *Org. Biomol.Chem.* **2006**, *4*, 3790-3801.

Les résultats présentés dans le chapitre quatre ont fait l'objet d'un manuscrit qui a été soumis.

CHAPITRE 2

Optimisation et validation d'une méthode d'analyse par HPLC

2.1 Introduction

L'étude cinétique de différents substrats permet de comprendre davantage le mode d'action de la γ -glutamyltranspeptidase. Comme il a été montré au chapitre 1, le mécanisme proposé pour cette enzyme est de type ping-pong modifié. Ainsi, pour mieux analyser les différentes étapes de ce dernier, des études ont été menées au sein de notre groupe.^{36,39,46} Il est à noter que ces études ont été réalisées en général par l'utilisation de la spectrophotométrie ou d'une méthode de dosage indirecte à l'aide de la réaction de diazotation des anilines.

Soulignons que la spectrophotométrie est une méthode utilisée pour suivre une réaction enzymatique lorsque les substrats le permettent. En outre, plusieurs tests d'activité de la GGT ont été réalisés par cette méthode grâce au composé γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide.^{32,39,58} Comme discuté au chapitre 1, ce composé, analogue au glutathion, libère un groupement *p*-nitroaniline qui se détecte facilement à 410 nm. Par cette méthode l'hydrolyse a aussi été étudiée ainsi que la transamidation toujours par l'utilisation du γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide, comme substrat donneur.⁴⁶ Dans le cas de la transamidation, l'étude de ces réactions requiert que le substrat donneur soit en concentration saturante afin d'effectuer rapidement l'étape d'acylation et d'accumuler l'intermédiaire acyl-enzyme. Ainsi, en utilisant un substrat accepteur en faible concentration, la dégradation de cet intermédiaire sera plus lente que sa formation. La transamidation ou l'hydrolyse seront alors les étapes limitantes dépendamment du substrat accepteur. La *p*-nitroaniline est libérée par la GGT à la même vitesse que la réaction la plus lente, ainsi des données cinétiques peuvent être obtenues soit pour l'hydrolyse ou la transamidation.

De plus, l'optimisation d'une méthode de dosage indirecte à l'aide de la réaction de diazotation des anilines a permis à notre groupe d'étudier l'acylation de la GGT.³⁹ Cette méthode a été appliquée à une série de substrats γ -glutamylanilide-*p*-substitués puisqu'ils ne sont pas détectables dans la région du visible contrairement à la *p*-nitroaniline. Le suivi de cette réaction se fait de manière discontinue, car l'aniline

libérée doit d'abord être dérivée pour former un complexe coloré qui est observable par spectrophotométrie. Le schéma 6 montre la méthode de dérivation par diazotation.¹⁷

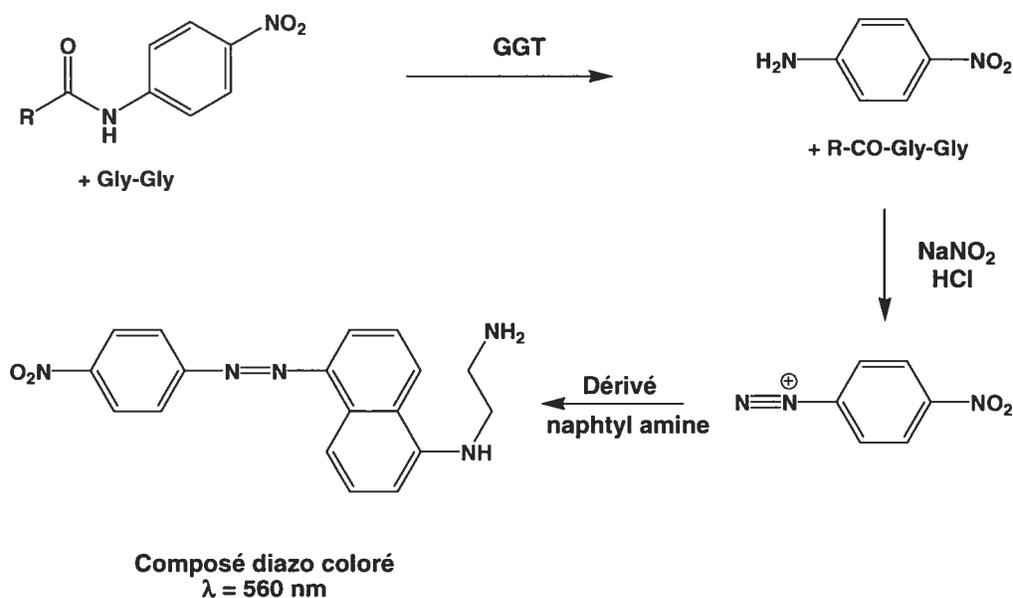


Schéma 6. Méthode de dérivation par diazotation de la *p*-nitroaniline libérée par la GGT. R représente l'entité γ -glutamyle.

La littérature sur ce sujet nous apprend qu'il y a aussi d'autres méthodes permettant de suivre des réactions cinétiques pour différentes enzymes. La fluorescence permet de suivre une cinétique enzymatique en utilisant, par exemple, la γ -glutamyl-4-méthyl-7-amino coumarine comme substrat donneur puisqu'elle possède un groupement chromophore fluorescent.⁵⁹ Par contre, encore une fois, cette méthode ne peut s'appliquer qu'à une gamme de substrats ayant un chromophore. Ainsi, la méthode couramment utilisée pour détecter des composés non chromogènes est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse.⁶⁰ C'est une méthode souvent employée pour la séparation d'acides aminés ou de peptides et qui permet d'étudier les réactions catalysées par des enzymes reconnaissant ce type de substrat. Elle offre de plus les avantages suivants: simple, reproductible, peu coûteuse, très sensible et permet la détection de composés ayant une concentration de l'ordre du

picomolaire.⁶¹ Aussi, la chromatographie par HPLC permet de détecter autant les produits impliqués dans une réaction que les produits formés. Cette méthode combinée à la dérivation pré-colonne par *o*-phtalaldéhyde (OPA) a déjà été utilisée pour détecter la formation de certains composés formés par la GGT,⁶² mais pour la présente recherche, il servira à l'étude de son mécanisme. De plus, ce réactif forme un dérivé pouvant être détecté seulement par fluorescence alors que le détecteur qui est à notre disposition est un détecteur de barette de photodiode, donc à l'UV.⁶¹

Une méthode de détection par analyse chromatographique en phase inverse (HPLC) a déjà été développée en partie dans notre groupe. Cependant, il a été nécessaire d'effectuer quelques optimisations permettant de rendre la méthode plus reproductible. Cette méthode a aussi permis de tracer la première courbe pH-vitesse pour le substrat natif de la GGT, le glutathion. De plus, les données cinétiques du substrat accepteur Ala-Gly ont été déterminées afin de valider la méthode. Cela est possible en effectuant la comparaison des constantes cinétiques obtenues à l'aide de cette méthode avec celles présentées dans la littérature. (Ces résultats seront présentés et discutés dans le présent chapitre.)

2.2 Présentation de la méthode développée en partie dans notre groupe⁶⁰

Tout d'abord, les cinétiques effectuées par cette méthode se font de manière discontinue, afin de dériver chacun des substrats et produits obtenus.

La méthode suit les étapes suivantes :

1. Prélever des portions

Pour cela, le mélange réactionnel qui contient le substrat donneur et le substrat accepteur est mis en présence d'une certaine quantité de la GGT purifiée de reins de rats. Ainsi, à divers moments entre 0 et 60 minutes, des portions sont prélevées et mises dans de l'acide trichloroacétique (TCA) qui a une concentration finale de 10 % afin de dénaturer l'enzyme et de ce fait, arrêter la réaction enzymatique. L'enzyme est ensuite précipitée par une centrifugation et le surnageant est transféré dans un autre vial. La procédure est illustrée au schéma 7.

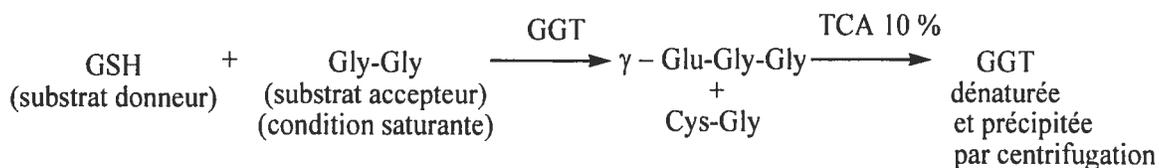


Schéma 7. Cinétique discontinue pour l'étude de l'étape d'acylation de la GGT. Des portions de cette réaction sont prélevées entre 0 et 60 min. Ces portions sont mises dans le TCA 10 % pour dénaturer l'enzyme.

Il est possible de suivre plusieurs produits et substrats de la réaction. Cependant le γ -Glu-Gly-Gly est celui suivi, car il est facilement détectable par HPLC et parce que ce produit est formé pour toutes les cinétiques faites avec le substrat accepteur Gly-Gly. De plus, la Gly-Gly est en condition saturante afin d'étudier l'étape d'acylation. Ainsi, l'étape la plus lente sera l'acylation, ce qui permet de suivre la vitesse de réaction entre le substrat donneur et l'enzyme.

Ensuite, une dérivation précolonne des échantillons doit être effectuée afin d'ajouter un chromophore aux différents composés de la réaction et de plus, les rendre davantage hydrophobes et assurer alors une meilleure séparation.⁶³ Cette dérivation chimique des composés est possible à partir du chlorure de dabsyle qui est détectable à une longueur d'onde de 436 nm.⁶³ Ce composé offre certains avantages comparativement à d'autres réactifs permettant aussi la dérivation chimique. Parmi ces réactifs outre le chlorure de

dabsyle, on retrouve aussi le chloroformate de 9-fluorénylméthyle (Fmoc-Cl), l'*o*-phthalaldéhyde (OPA) et le chlorure de dansyle. Ces derniers requièrent un détecteur de fluorescence, ce qui représente un désavantage pour nous.^{64.65}

Le développement de la technique de dérivation grâce au chlorure de dabsyle a été basé sur le protocole de Stocchi *et al.*⁶⁶ ainsi que sur le protocole de Chang *et al.*⁶³. Aussi, ces deux protocoles ont été modifiés afin de pouvoir les appliquer aux réactions cinétiques catalysées par la GGT.

Cependant, avant la dérivation, les deux étapes énoncées ici-bas doivent être réalisées.

2. Mettre un étalon interne dans les surnageants

Avant l'ajustement des pH, un étalon interne est ajouté afin d'assurer la reproductibilité des données; en effet, des variations de volume lors des injections sur la colonne peuvent entraîner des différences entre chaque échantillon analysé. L'utilisation de l'étalon interne assure donc une meilleure précision et diminue les risques d'erreurs expérimentales. En cette expérience, le choix de l'étalon interne s'est arrêté sur la L-glutamine (Gln) puisque son temps de rétention n'interfère pas avec celui des autres produits de l'analyse et également parce qu'elle n'allonge pas le temps d'analyse.

3. Ajuster le pH des surnageants

L'ajustement des pH est par la suite effectué grâce à l'addition de NaOH afin d'obtenir un pH de 9.0. Ce pH correspond à celui où la réaction de dabsylation est la plus efficace.

4. Ajouter la solution de dabsyle

Un volume de dabsyle dissout dans l'acétone égal à celui de l'échantillon est ajouté dans le tube contenant la portion prélevée et l'étalon interne à un pH 9.0. Un excès deux fois plus grand de dabsyle permet la dérivation complète des différents composés présents dans le mélange. En fait, il y a environ 2 moles de dabsyle pour 1 mole d'amine primaire provenant de tous les substrats et produits présents. La réaction de dabsylation se fait à une température de 70 °C jusqu'à ce que le dabsyle soit complètement dissout, ce qui prend entre 10 et 15 minutes. Les échantillons sont finalement dilués, jusqu'à l'obtention d'un volume final de 2 mL, par un mélange (v/v 1:1) de tampon 40 mM phosphate de sodium pH 6.5/éthanol avant d'être injecté sur une colonne C-18 en phase inverse. Les échantillons sont alors très stables et peuvent même être conservés durant une année à une température de -20°C.⁶⁷ Le schéma 6 est un résumé de la méthode de dérivation par le DABS-Cl.

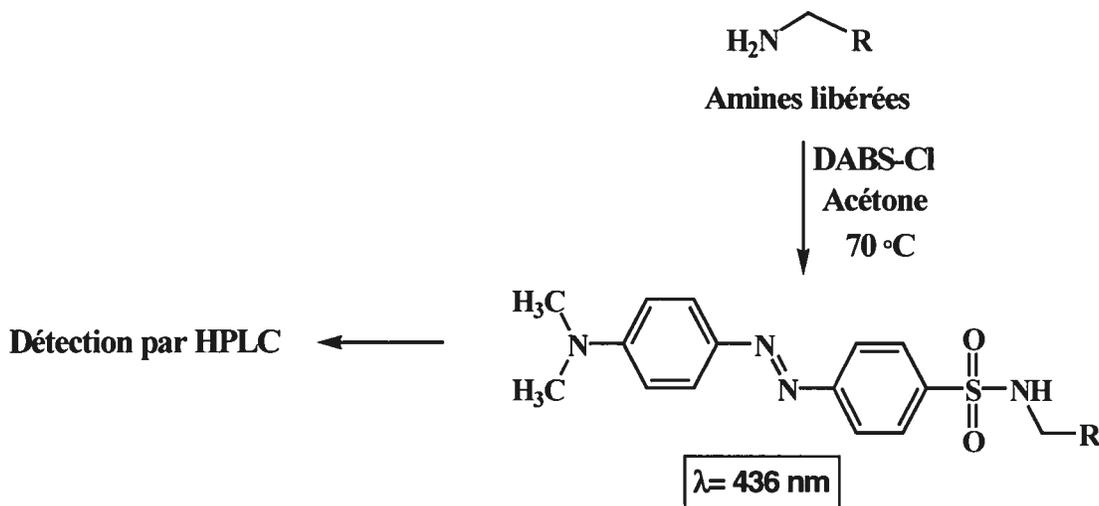


Schéma 8. Méthode de dérivation au DABS-Cl des différentes amines libérées par la GGT. R représente une chaîne d'atomes quelconque d'un produit libéré ayant une amine primaire dérivable.

Puisque le dabsyle est un produit commercial, une recristallisation doit en être faite avant son utilisation, afin de le rendre pur pour accomplir la dabsylation.⁶³ Cette précaution favorise la reproductibilité des analyses. D'autre part, le dabsyle doit être dissout dans un solvant organique avant d'être ajouté pour effectuer la réaction de dabsylation. Ce composé est peu ou même pas du tout soluble dans certains solvants tels que le DMF, le DMSO et l'eau. Par contre, dans l'acétone, le chlorure de dabsyle se dissout parfaitement, mais l'acétone s'évapore lors de la réaction puisque son point d'ébullition est de 56 °C. L'utilisation de contenant bouchonné et vissé est donc nécessaire afin d'éviter la perte d'acétone par l'évaporation. L'acétonitrile aurait aussi pu être une alternative, car son point d'ébullition est de 81 °C, cependant, à haute concentration, la dissolution du dabsyle est plus difficile. Les concentrations de substrats utilisées étant assez élevées, l'utilisation de l'acétonitrile a donc été rejetée. Il faut noter qu'avec l'acétone la vitesse de dérivation est plus rapide, ce qui permet d'avoir une plus haute concentration de DABS-Cl.

Donc, comme discuté précédemment, l'analyse des échantillons se fait par HPLC. Les conditions d'élutions ont aussi été élaborées en fonction du protocole de Stocchi *et al.*⁶⁶. Des modifications ont été effectuées par ailleurs pour favoriser une meilleure séparation des composés. Un gradient entre l'acétonitrile et le tampon dihydrogène phosphate de potassium permet l'élution et la séparation des différents produits; précisons ici que le gradient ne doit pas excéder 40 % en solvant organique puisqu'il risque de faire précipiter le tampon dans la colonne et causer des dommages irréversibles.^{67, 58}

2.3 Optimisation de la méthode

La première étape qui a été optimisée est l'ajustement des pH. En fait, la dérivation de la glutamine à différents pH entre 8,3 et 10,1 a été faite afin de vérifier l'effet du pH lors de la réaction de dabsylation. On peut voir que ce facteur peut avoir un grand effet sur l'efficacité de la dabsylation, car une amine primaire ne sera pas protonée de la même manière puisque son pK_a est aux alentours de ces pH. Le résultat obtenu est présenté à la figure 2 qui suit.

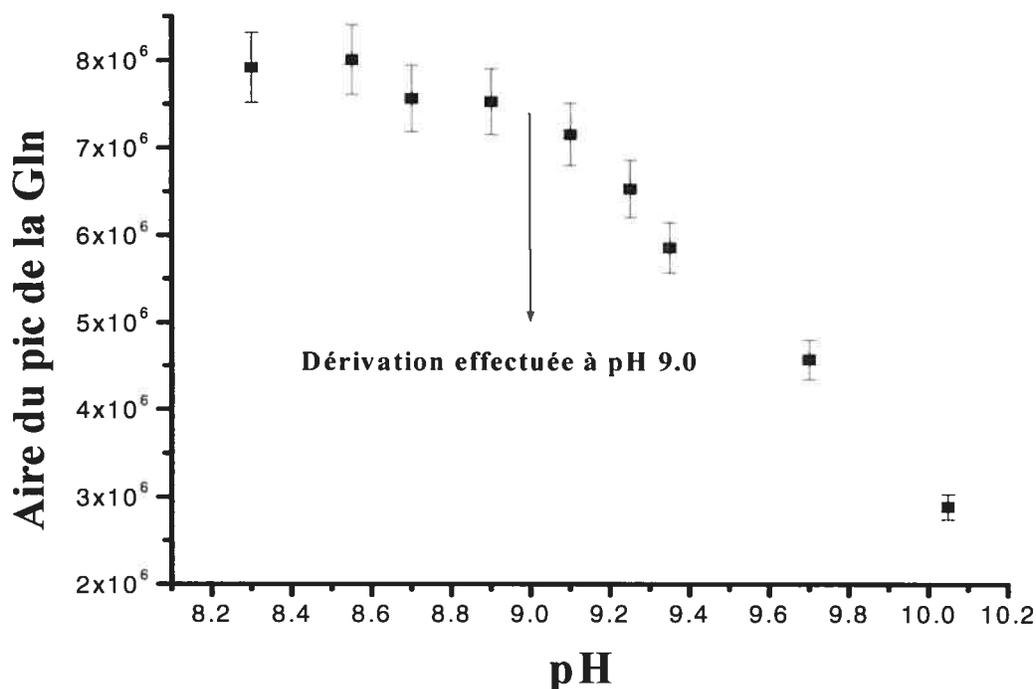


Figure 2. Influence du pH sur la réaction de dérivation de la glutamine (l'étalon interne) par le chlorure de dabsyle. (0,1 mL d'une solution mère de 6,8 mM de L-Gln ont été dérivés par 0,1 mL d'une solution de dabsyle de 20 mM).

Les résultats présentés à la figure 2 proviennent d'une expérience qui a été faite en entier une seule fois. Cependant, certaines mesures ont été répétées ce qui a permis de déterminer une incertitude générale d'environ 5 %. Le résultat obtenu est en congruence avec ceux montrés dans la littérature.^{60, 61, 68} La dérivation est effectivement optimale à pH 9.0. Cependant, il ne semble pas y avoir trop de variation dans la réaction entre les pH 8.6 à 9.0. L'amine primaire permettant la réaction est probablement complètement sous sa forme basique dans ces conditions ce qui permet une dérivation optimale. Donc, une variation de pH entre 8.6 et 9.0 est acceptable, bien qu'il soit préférable de fixer un seul pH pour assurer la reproductibilité et l'exactitude des données. Par contre, à partir du pH 9.2 une diminution dans l'efficacité de la réaction est remarquée. Cette diminution est possiblement causée par l'hydrolyse des composés dabsylés à pH plus élevé. Suite à cette optimisation, les pH sont ajustés à 9.0 ± 0.1 . La L-Gln a été choisie

comme composé type, car c'est un produit commercial et parce que son pK_a n'est pas bien différent des autres composés comme la L-Gly-Gly et la L- γ -Glu-Gly-Gly. Donc leur comportement devrait ressembler à celui de la L-Gln, ainsi, il s'agit d'un bon test.

Deux autres modifications mineures ont également été apportées au protocole de dérivation. L'une d'elles consiste à ajuster les échantillons au même volume suite à l'ajustement des pH par l'addition d'eau milli-Q. Alors, une quantité identique de la solution de dabsyle est additionnée dans tous les tubes. La concentration est donc la même et cette étape et les suivantes, au point de vue des manipulations, sont un peu accélérées puisque les volumes ajoutés sont tous identiques. La seconde modification est la préparation d'une solution fraîche pour l'étalon interne, la glutamine; il a en effet été remarqué que l'aire sous la courbe de la glutamine est plus petite suite à l'utilisation d'une solution ayant été préparée quelques semaines auparavant. Ainsi, la dégradation possible de la glutamine par l'hydrolyse peut expliquer cette valeur d'aire plus petite, c'est pourquoi l'utilisation d'une solution fraîche aide à la reproductibilité des analyses.

Finalement, un test pour vérifier l'effet du temps sur la dérivation a été réalisé. À ce sujet, selon la méthode de Chang *et al.*, un temps de 10 minutes est recommandé pour la dérivation.⁶³ Nous avons remarqué de notre côté que le temps de dissolution pouvait varier entre 10 et 20 minutes, selon les réactifs utilisés. La figure 3, ci-après, montre que le temps n'influence pas cette réaction et que l'évaporation de l'acétone est empêchée grâce au type de tube utilisé: il est muni d'un couvercle qui se visse et d'un anneau en caoutchouc, ce qui le rend plus hermétique que les tubes usuels dont les couvercles se ferment seulement par une légère pression. Il n'est donc pas nécessaire d'attendre un temps précis lors de la réaction de dérivation, mais il ne suffit que les composés soient totalement dissous.

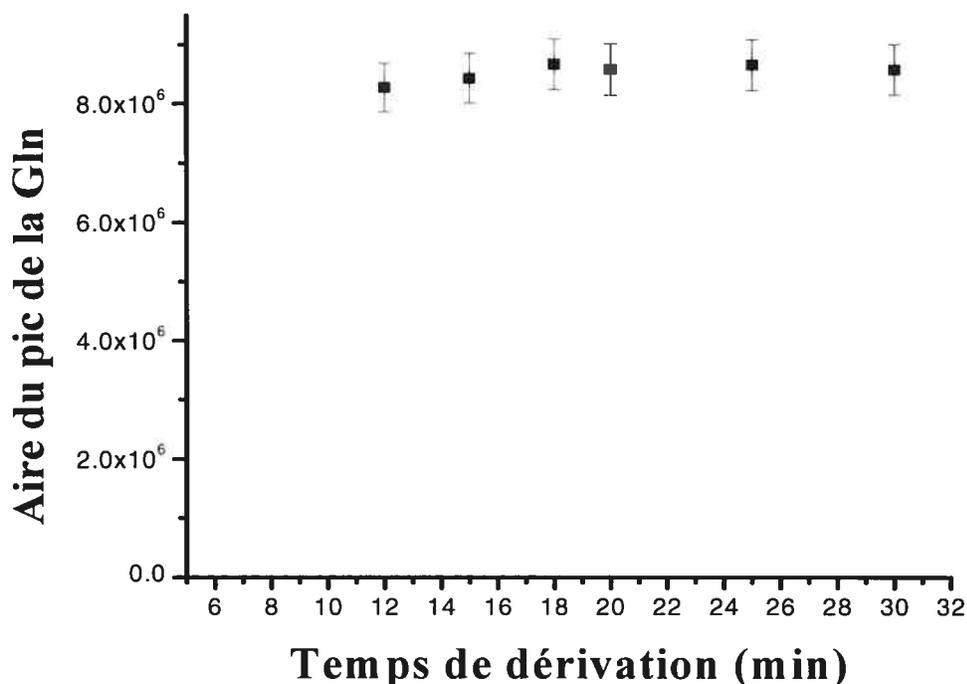


Figure 3. Influence du temps de dérivation de la glutamine (l'étalon interne) par le chlorure de dabsyle. 0,1 mL d'une solution mère de 6,8 mM de L-Gln ont été dérivés par 0,1 mL d'une solution de dabsyle de 20 mM à pH 9,0. L'expérience a été faite en monocata.

2.4 Études cinétiques

2.4.1 Courbe pH-vitesse du glutathion comme substrat donneur

La méthode développée pour l'analyse de différents substrats n'ayant pas de groupements chromophores a permis d'effectuer pour la première fois une courbe pH-vitesse à partir du substrat natif de la GGT, le glutathion. Cela est intéressant, car la courbe pH-vitesse permet obtenir des informations quant à la présence d'acides aminés jouant un rôle dans la catalyse. Ainsi, la réaction de transpeptidation entre le GSH et le substrat accepteur Gly-Gly a été étudiée à différents pH grâce à la méthode de dérivation et d'analyse par HPLC optimisée plus tôt. Le choix du substrat donneur

est le GSH, car c'est le substrat naturel de la GGT, ce qui en fait un substrat de premier ordre lors d'études cinétiques.

La courbe pH-vitesse obtenue est illustrée, ci-dessous, à la figure 4.

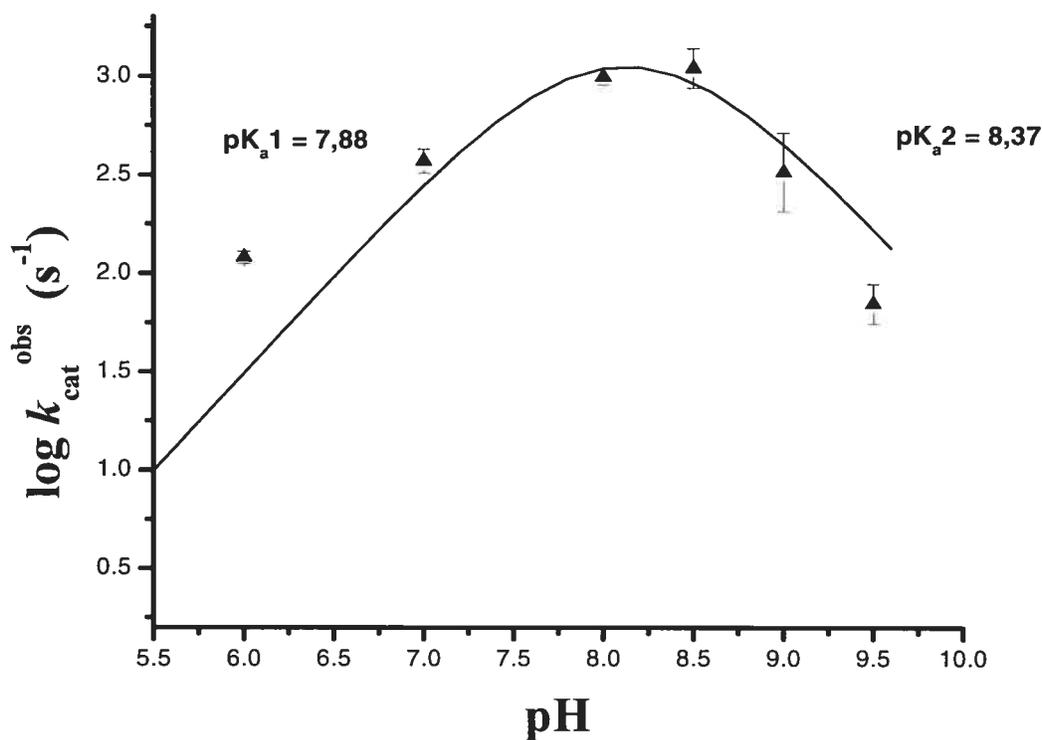


Figure 4. Profil pH-vitesse obtenu pour la transpeptidation du glutathion par la GGT en présence de 20 mM de glycylcystéine à 37 °C. Les triangles représentent les données expérimentales en monocata; la ligne est la courbe théorique tracée par ordinateur selon le modèle proposé dans le chapitre 6. L'incertitude du k_{cat} provient de la courbe théorique de Michaelis-Menten tracée par ordinateur pour chaque pH.

Donc, la courbe pH-vitesse à partir du glutathion présente une forme de cloche. Les valeurs de pK_a obtenues pour la courbe du glutathion sont de 7.9 et de 8.4. Ces mesures ont été calculées à l'aide d'une régression non-linéaire (avec une formule pour l'ionisation de deux acides aminés dans l'enzyme) des différentes valeurs de k_{cat} observées. Cette courbe illustre que le mécanisme catalytique dépend de l'état

d'ionisation d'un minimum de deux résidus. Un de ces résidus agit sous sa forme basique ($pK_a \sim 7.9$) alors que l'autre est actif sous sa forme acide ($pK_a \sim 8.4$). La plus petite valeur de pK_a coïncide avec celui d'un groupement amine ce qui concorde avec les études de Fukuyama²³ à partir de la structure de la GGT de *E. coli* et avec les études faites dans notre groupe permettant d'obtenir une courbe de van't Hoff identifiant la possibilité qu'un groupement amine soit impliqué comme acide/base général.³³

Une courbe pH-vitesse également effectuée à partir de Gly-Gly comme substrat accepteur, mais d'un autre substrat donneur, le γ -glutamyl-4-méthyl-7-aminocoumarine, a présenté un profil similaire à celui obtenu avec le glutathion comme substrat donneur⁵⁹. Ces chercheurs proposent que l'allure de la courbe du côté descendant est influencée par le $pK_a \sim 8,13$ du Gly-Gly. En effet, le substrat accepteur est commun à toutes ces études offrant une courbe de cette allure^{39,59} et le pK_a de 8,4 de la courbe à la figure 4 provient possiblement de la déprotonation du Gly-Gly jouant le rôle du substrat accepteur. Cette courbe permet également de conclure que la méthode développée pour des substrats n'ayant pas de groupements chromogènes est fiable pour l'étude de la GGT et pourra être appliquée à une large gamme de composés similaires au glutathion.

Suite à la réaction enzymatique de la GGT à partir du GSH et de Gly-Gly à pH 8.0, les valeurs obtenues pour les constantes cinétiques sont de $990 \pm 80 \text{ s}^{-1}$ pour le k_{cat} et de $0.7 \pm 0.2 \text{ mM}$ pour le K_m . La valeur de K_m est comparable à celle trouvée par un membre de notre groupe grâce à «isothermal calorimetry» (ITC). La valeur de K_M obtenue par ITC est égale à 0.4 mM pour la GGT.⁶⁹ Cette valeur se rapproche de la valeur obtenue grâce au HPLC, ce qui ajoute une preuve de plus quant à la validité de la méthode pour la détermination de différents paramètres cinétiques.

De plus, la courbe pH-vitesse permet encore une fois de confirmer qu'au pH 8.0-8.5 l'activité de l'enzyme est à son maximum puisque ces pH correspondent aux points supérieurs de la courbe. La quantité d'enzyme utilisée a été également plus petite pour les pH permettant une meilleure activité de l'enzyme, car la réaction s'effectue plus

rapidement à ces pH, mais ce facteur a été pris en compte au cours de la normalisation des données, ce qui explique la présence de k_{cat}^{norm} sur le graphique. Ensuite, une incertitude beaucoup plus élevée est observable sur le côté basique. En fait, cette incertitude peut provenir d'un mauvais choix de tampon pour les réactions cinétiques à pH 8.5, 9.0 et 9.5. Le tampon choisi est le CHES (acide 2-[N-cyclohexylamino]éthane sulfonique]). En fait, ce tampon contient une amine secondaire qui peut probablement être dabsylée. Malgré cela, les composés désirés ont été dérivés puisque le chlorure de dabsyle est mis en excès et que la concentration de CHES reste du même ordre que les autres composés. Les courbes faites en utilisant ce tampon ont été un peu plus difficiles à faire dû, car les résultats n'étaient pas aussi reproductibles, surtout à plus petite concentration de substrats donneurs ce qui est normal puisque la proportion de cette amine secondaire provenant du tampon est plus importante qu'à hautes concentrations de substrats donneurs. Malgré tout, les résultats obtenus semblent être ceux attendus.

Cependant, pour le futur, l'utilisation d'un autre tampon est recommandée pour des études se situant entre les pH 8.5 et 9.5. Entre autre, le tampon bicarbonate de sodium aurait été un meilleur choix, il faut quand même mentionner qu'il y a peu de tampons possédant une zone tampon entre les pH 9,0 et 9,5.

2.4.2 Détermination des constantes cinétiques de L-Ala-Gly lors de la désacylation

Toutes les réactions ont été effectuées en présence de la glycylglycine comme substrat accepteur en conditions saturantes jusqu'à maintenant pour ce mémoire. Ce dernier est souvent utilisé dans la littérature pour l'étude de l'étape d'acylation. Il est également très intéressant de vérifier l'importance du choix de ce substrat accepteur en le substituant par un autre dipeptide. Ainsi, la méthode HPLC développée et optimisée dans ce chapitre peut être vérifiée avec un autre substrat accepteur L-Ala-Gly et peut être utilisée dans l'étude de l'étape de désacylation.

Pour ce faire, la réaction enzymatique a été effectuée à partir du GSH comme substrat donneur (en excès) et du L-Ala-Gly comme substrat accepteur. Donc, pour suivre la désacylation, la concentration du substrat accepteur a été variée alors que la concentration du glutathion est restée constante pour toutes les études. Ainsi, en ajoutant 4 mM, presque 6 fois le K_M du GSH, l'étape d'acylation s'effectue très rapidement provoquant alors une accumulation de l'intermédiaire acyl-enzyme. En présence de faibles concentrations de substrats accepteurs, la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme devient plus rapide que la dégradation par l'attaque nucléophile du dipeptide, ce qui permet d'avoir la désacylation comme étape limitante. La réaction peut se suivre par la formation du composé L- γ -Glu-L-Ala-Gly dans la réaction de transpeptidation.

2.4.2.1 Synthèse du L- γ -Glu-L-Ala-Gly

Comme énoncé précédemment, la réaction de désacylation peut se suivre par la formation du L- γ -Glu-L-Ala-Gly. La valeur des pentes tracées dans le graphique de la libération du L- γ -Glu-L-Ala-Gly en fonction du temps est divisée par le coefficient d'extinction molaire afin d'obtenir des vitesses de réaction. Le coefficient d'extinction molaire est déterminé par la courbe étalon du L- γ -Glu-L-Ala-Gly.

Pour obtenir la courbe étalon, il a fallu dans un premier temps effectuer la synthèse du L- γ -Glu-L-Ala-Gly.

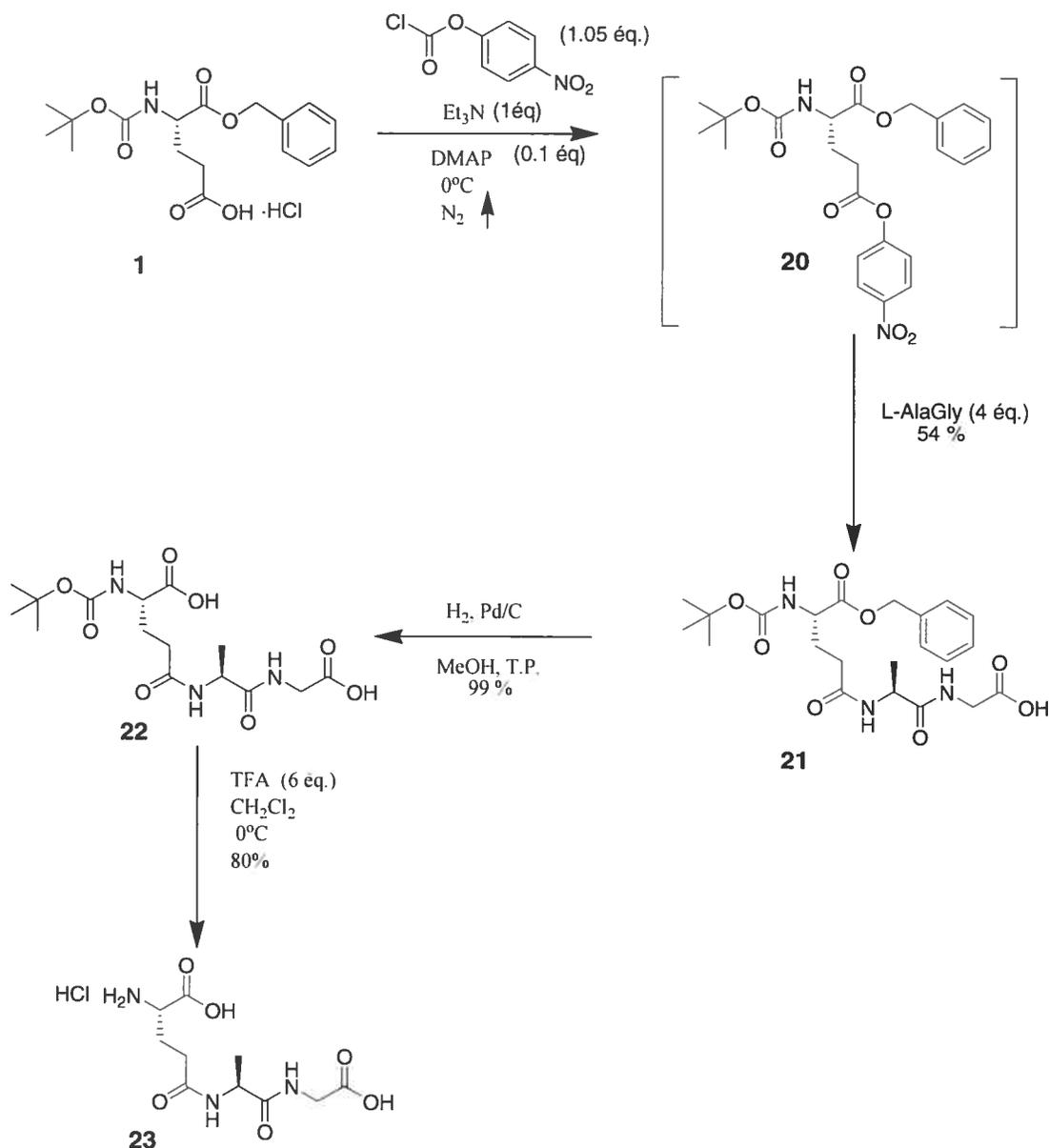


Schéma 9. Synthèse du L-γ-Glu-Ala-Gly

Tout comme la synthèse de la L-γ-glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide, le produit de départ utilisé est l'acide *N*-Boc-L-glutamique α-benzyl ester **1**. La première étape est un couplage peptidique⁷⁰ selon une méthode développée précédemment dans notre groupe. Ainsi, en activant le composé **1** par le chloroformate de *p*-nitrophényle, le couplage peptidique peut avoir lieu sans avoir besoin de protéger l'acide

carboxylique du dipeptide L-Ala-Gly, ce qui est très avantageux. Ensuite, la déprotection du Boc et du Bn se fait par les voies classiques. Dans un premier temps l'hydrogénolyse permet d'enlever efficacement le groupement benzyle dans un rendement de 99% alors que le TFA permet de retirer le Boc et d'obtenir le produit final dans un rendement de 80%. Encore une fois ces produits sont caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C ainsi que par la spectroscopie de masse et par détermination de son pouvoir rotatoire.

2.4.2.2 Courbe étalon et résultats cinétiques

La courbe étalon permet de déterminer le coefficient d'extinction molaire du composé dérivé par le chlorure de dabsyle et qui est mesuré lors de l'analyse. Cette courbe a une bonne linéarité comme montré à la figure 11 (pente : $8,54 \times 10^{-4} \mu\text{M}^{-1}$, R^2 : 0,999). Cependant, la courbe étalon correspond à la hauteur du pic de L- γ -Glu-Ala-Gly en fonction de sa concentration, car lors de l'analyse des chromatogrammes de la réaction enzymatique le pic d'un des produits chevauchait légèrement celui du L- γ -Glu-Ala-Gly. Les conditions d'élution ont été changées, mais sans réussir à séparer ces deux pics. Ainsi, la manière de prendre les mesures pour la courbe étalon doit être la même que celle utilisée lors de l'analyse des données. L'optimisation de la méthode aurait pu être poursuivie, mais la technique de la hauteur des pics étant bonne, il a été décidé de l'utiliser pour l'étude de ce composé. Entre 10 et 500 μM , les valeurs de L- γ -Glu-Ala-Gly mesurées sont fiables, car entre ces concentrations la pente obtenue est linéaire.

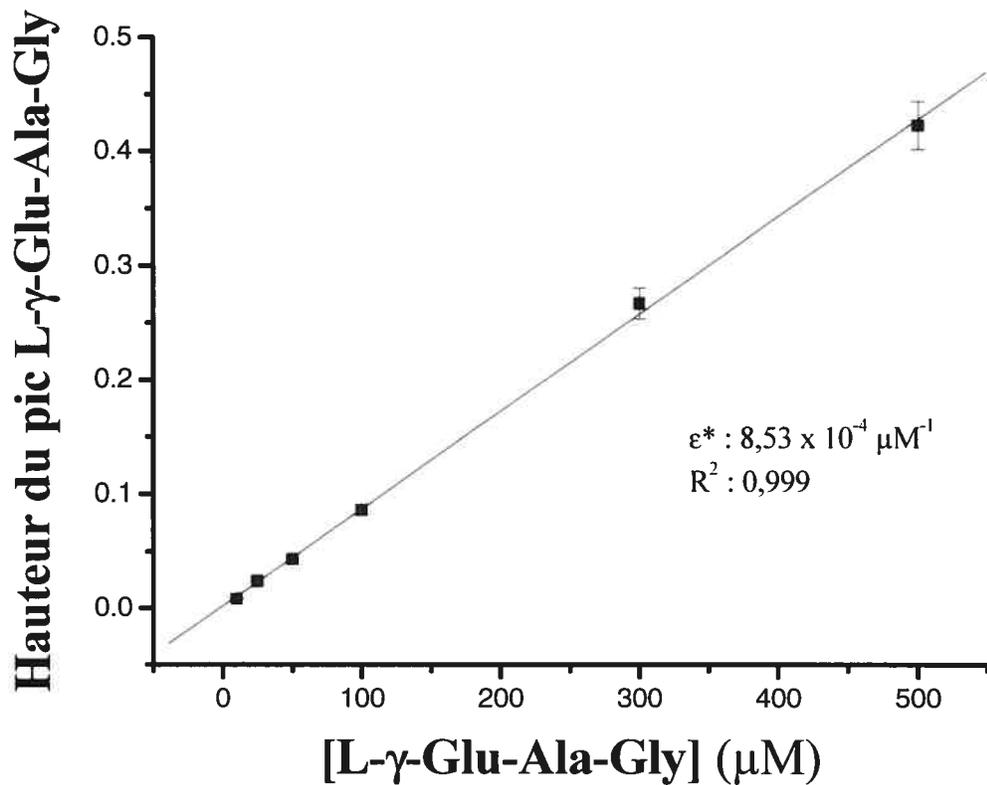


Figure 5. Courbe étalon de la L-γ-glutamylalanyl glycine (L-Glu-Ala-Gly). L'expérience a été faite en monocata

Suite à l'obtention de la courbe étalon, les tests cinétiques peuvent être faits. Donc, des pentes de la hauteur du pic L-γ-Glu-Ala-Gly en fonction du temps sont tracées à différentes concentrations de L-Ala-Gly. Ces pentes permettent par la suite de tracer une courbe Michaelis-Menten qui donne la valeur du k_{cat} ainsi que du K_M .

Le graphique de Michaelis-Menten indique que le k_{cat} est de 250 s^{-1} alors que le K_M est de 1.2 mM.

Cette valeur de K_M coïncide avec celle de 1.3 mM^{71} déterminée par Tate et Meister pour la transpeptidation entre le substrat accepteur S-pyruvoylglutathion et L-Ala-

Gly. L'étape de désacylation peut, donc, également être étudiée grâce à cette méthode que nous avons développée, ce qui démontre que cette dernière est encore plus versatile.

2.5 Conclusion

La méthode analytique basée sur la dérivation chimique, à partir du chlorure de dabsyle, des composés possédant une portion amine a été optimisée et validée. Maintenant, une plus grande diversité de substrats, dont ceux qui ne possèdent pas de groupements chromogènes, pourra être analysée. De plus, la première courbe pH-vitesse pour le glutathion a pu être obtenue par cette méthode. Cette méthode ouvre aussi la porte à d'autres études cinétiques qui permettront l'analyse d'une gamme de substrats analogues au glutathion. L'obtention de renseignements supplémentaires quant au mécanisme physiologique de l'enzyme pourra être possible grâce à cette méthode.

De plus, les tests effectués avec le GSH comme substrat donneur en concentration saturante et L-Ala-Gly comme substrat accepteur ont montré que l'étape de désacylation peut être étudiée grâce à la méthode analytique développée, car la valeur du K_M trouvée pour L-Ala-Gly concorde avec celle trouvée dans la littérature.⁷¹ Cependant, la synthèse du L- γ -Glu-Ala-Gly était nécessaire afin de tracer une courbe étalon donnant le coefficient d'extinction molaire permettant la normalisation des résultats cinétiques. Ainsi, cette expérience montre les grandes possibilités qu'offre cette méthode.

CHAPITRE 3

Études cinétiques de l'étape d'acylation catalysée par la GGT à partir de substrats synthétisés analogues au glutathion

3.1 Introduction

Plusieurs aspects du mécanisme de la GGT ont été étudiés jusqu'à maintenant dans notre groupe. Entre autre, des études ont démontré qu'un intermédiaire acyl-enzyme covalent pourrait être impliqué dans le mécanisme, ce qui coïncide avec le mécanisme de type ping-pong modifié.³⁶ Des études par rapport à l'étape de désacylation ont permis de démontrer que dans le mécanisme de la désacylation, par aminolyse, il y a une attaque concertée de l'intermédiaire acyl-enzyme par un acide aminé ou un dipeptide et il y a la déprotonation de l'amine qui attaque.⁴⁶ Quant à l'étape d'acylation, cette dernière a été étudiée grâce à l'utilisation de substrats donneurs de type L- γ -glutamylanilide *para* substitué par des groupements électrodonneurs et électroattracteurs représentés à la figure 6.³⁹

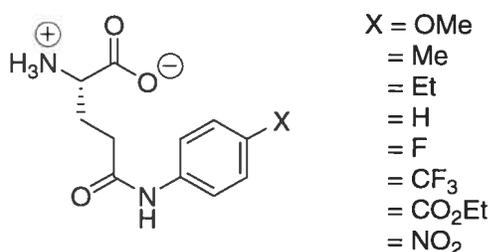


Figure 6. Substrats analogues L- γ -glutamylanilides-*p*-substitués synthétisés dans le passé dans notre groupe pour l'étude de l'étape d'acylation de la GGT.³⁹

La présence du groupement électrodonneur ou électroattracteur permet de changer la force du lien clivé par la GGT au cours de l'étape d'acylation. Il est donc possible de corréler la vitesse de catalyse de ces substrats donneurs en fonction du pK_a de l'aniline substituée libérée au cours de la réaction. Un graphique de Hammett représente la corrélation entre la vitesse de catalyse et le facteur σ , relié au pK_a. Cette dernière étude a montré que l'étape d'acylation peut être accélérée par des substrats possédant un groupement électrodonneur comme par des substrats possédant un groupement électroattracteur puisque la courbe de Hammett est biphasique.^{39,58,72} En

effet, une courbe de cette allure indique un changement de géométrie à l'état de transition de la réaction d'acylation (étape limitante). En fait, l'étape limitante correspond au bris du lien amide de l'intermédiaire tétraédrique formé du complexe Michaelis entre l'enzyme et le substrat donneur concerté avec la protonation de l'aniline substituée en position para. Cela provoque alors le départ d'un premier produit protoné par l'acide général. Cela a été déterminé grâce à des études par rapport à l'effet du pH, de température et aux effets isotopiques.^{39,72}

Cette étude a été réalisée à partir de substrats ayant des pK_a entre 1 et 5 pour leur groupe partant, les anilines.^{39,58} Ainsi, des études au niveau de l'étape d'acylation, à partir de substrats ayant des pK_a aux alentours du premier produit libéré lors de la réaction de la GGT et du glutathion permettraient d'étudier le mécanisme dans des conditions semblables à celles retrouvées physiologiquement.⁵⁸ Les substrats choisis sont tous des dérivés L- γ -glutamylamides analogues au glutathion. En fait, il s'agit du 2,2,2-trifluoroéthylamine, la glycine méthyle ester, la glycinamide, la 2-(éthylthio)éthylamine et la propylamine dont les structures sont illustrées au tableau II ici-bas et qui sont couplés à un groupement γ -glutamyle.

Ces substrats donneurs possèdent des liens amides de différentes forces. Il sera possible de corréler la vitesse de catalyse du lien amide en fonction du pK_a de l'amine libérée au cours de la réaction en réalisant une courbe de Brønsted. Ainsi, selon l'allure de la pente, cette courbe donne une bonne indication quant à la charge développée sur l'azote à l'état de transition.

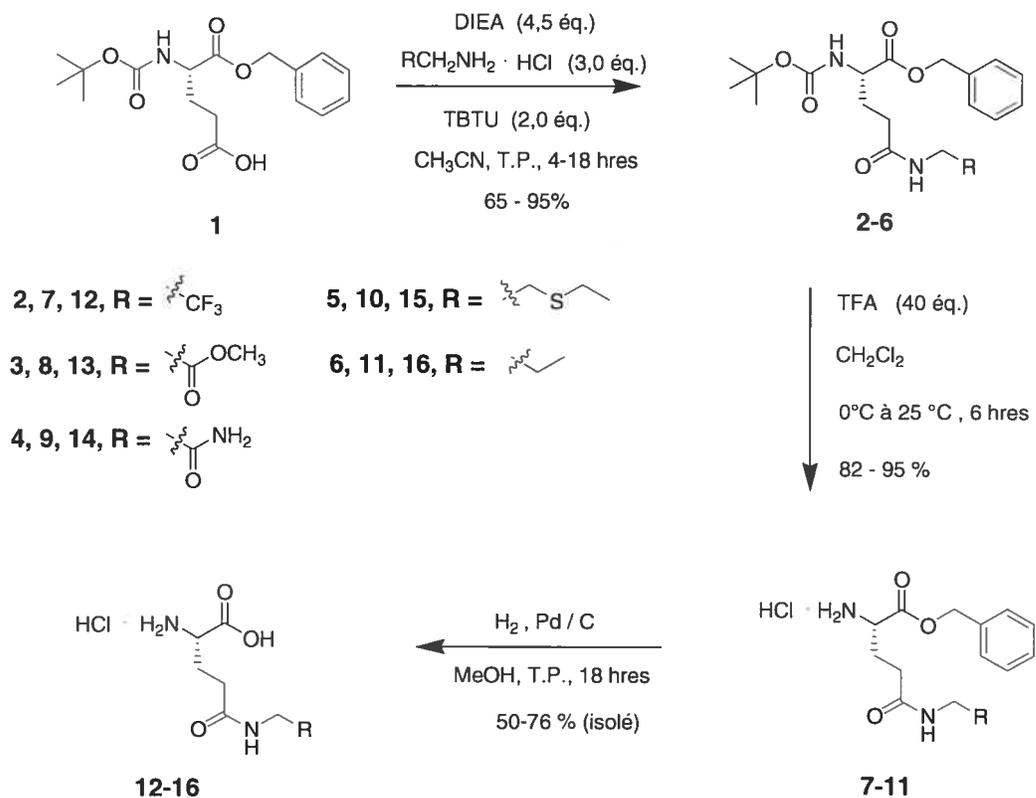
Si la pente observée est nulle, cela signifie que la différence de basicité ou d'acidité du groupe partant présent dans le substrat donneur n'influence pas la vitesse de libération du produit par l'enzyme et que l'état de transition ressemble plutôt aux réactifs. Le clivage du lien amide et la libération du premier produit n'est donc pas des étapes limitantes dans l'étape d'acylation.

Une pente descendante indique que la réaction de libération est plus efficace en présence de substrats dont le produit libéré est plus acide (électroattracteur) et qu'une charge partiellement négative est formée sur le groupe partant durant l'état de transition. La protonation par un acide général permet ensuite le départ du groupement. Une pente ascendante indique qu'il y a formation d'une charge partiellement positive sur l'amine du groupe partant durant l'état de transition.

Une pente de Brønsted égale à 1 signifie qu'une charge complète est formée durant l'état de transition. Cependant, une pente plus petite que 1 indique généralement la présence de deux phénomènes tels que le clivage du lien C-N ainsi que sa protonation par l'acide général.

Avant de procéder aux tests cinétiques, la synthèse des substrats analogues énumérés ci-haut doit être faite. Ces substrats possèdent les caractéristiques énumérées au chapitre 1 qui sont nécessaires à la reconnaissance du substrat par l'enzyme. Ainsi, ces substrats analogues au glutathion sont tous des dérivés ayant une entité γ -glutamyle et dont le produit libéré après avoir réagi avec la GGT est une amine primaire. Donc, grâce à la méthode de dérivation au chlorure de dabsyle et la méthode d'analyse par HPLC présentées au chapitre précédent, ces substrats pourront être quantifiés.

Ces substrats ont été synthétisés selon des voies décrites précédemment dans le groupe⁵⁸ à l'exception de la L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide. La voie de synthèse utilisée pour ces substrats est la suivante.



Sch\u00e9ma 10. Synth\u00e8se des d\u00e9riv\u00e9s γ -glutamylamides⁵²

Donc, par cette proc\u00e9dure, le compos\u00e9 15 n'a pu \u00eatre synth\u00e9tis\u00e9, car il est connu dans la litt\u00e9rature que le soufre se lie aux m\u00e9taux, ce qui rend inefficace le catalyseur.^{58,73} Donc, la d\u00e9protection du groupement benzyle ne peut se faire pour ce substrat par hydrog\u00e9nation en pr\u00e9sence de palladium sur carbone puisque c'est un catalyseur m\u00e9tallique. La nouvelle voie de synth\u00e8se de la L- γ -glutamyl-2-(\u00e9thylthio)\u00e9thylamine sera pr\u00e9sent\u00e9e \u00e0 la section 3.2.1.

Ces compos\u00e9s ont \u00e9t\u00e9 utilis\u00e9s afin d'\u00e9tudier l'\u00e9tape d'acylation de la GGT et de tracer une courbe de Br\u00f4nsted.⁵⁸ Les r\u00e9sultats obtenus sont repr\u00e9sent\u00e9s aux figures 7 et 8. En effet, la courbe de Br\u00f4nsted ne semble pas avoir une corr\u00e9lation lin\u00e9aire que ce soit en utilisant les valeurs de $\log(k_{\text{cat}}/K_M)$ ou de $\log k_{\text{cat}}$ sur l'axe-y. Donc, la premi\u00e8re hypoth\u00e8se soutient que la pente est nulle. Ainsi, la vitesse de r\u00e9action de lib\u00e9ration du groupe partant n'est pas influenc\u00e9e par la nature de celui-ci puisque la

vitesse maximale de l'acylation semble être atteinte. La présence d'un acide général très fort peut expliquer ce résultat, car dans ce cas, la protonation du premier produit libéré serait très rapide et n'influencerait pas la vitesse de la réaction. Le graphique ci-dessous est en concordance avec cette première hypothèse.⁵⁸

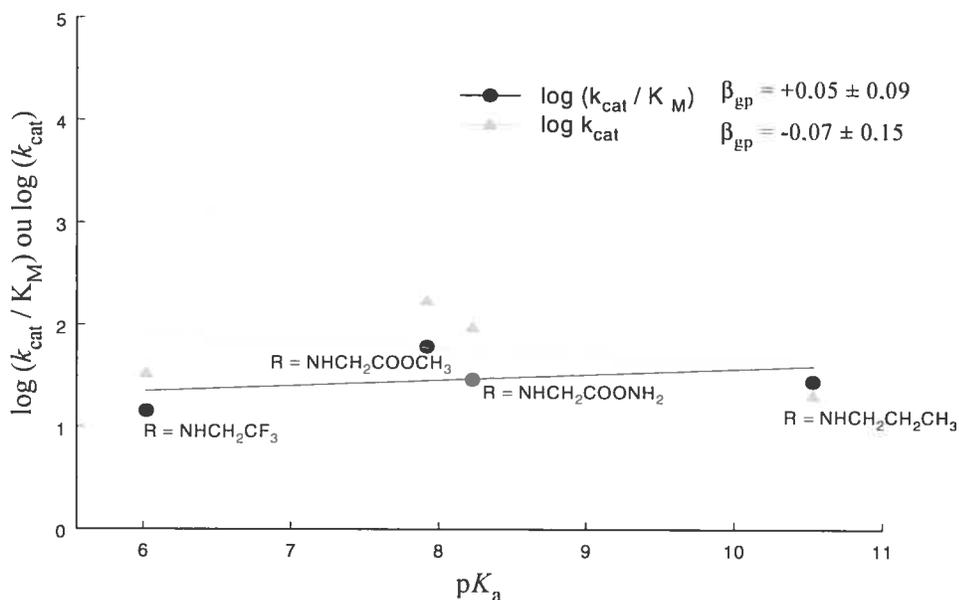


Figure 7. Courbe de Brønsted pour évaluer l'effet de la basicité sur les vitesses de libération des amines primaires lors de la réaction de transpeptidation effectuée par la GGT avec les dérivés L- γ -glutamylamides en présence de 20 mM glycylglycine à pH 8,0 et à 37 °C. R représente l'amine couplée en position γ de l'acide glutamique.⁵⁸

La deuxième hypothèse soulève que les substrats de type L- γ -glutamylamide soient divisés en sous-groupe, ce qui expliquerait qu'ils ne réagissent pas de la même façon. Parmi ces trois classes, il y a celle dont le groupe partant est de type acide aminé (L- γ -glutamylglycine méthyl ester, L- γ -glutamylglycinamide) et celle dont le groupe partant est de type amine (L- γ -glutamyl-2,2,2-trifluoroéthylamide, L- γ -

glutamylpropylamide). Finalement, le glutathion semble également former une autre classe à part, les dipeptides. La figure 8 appuie cette deuxième hypothèse.

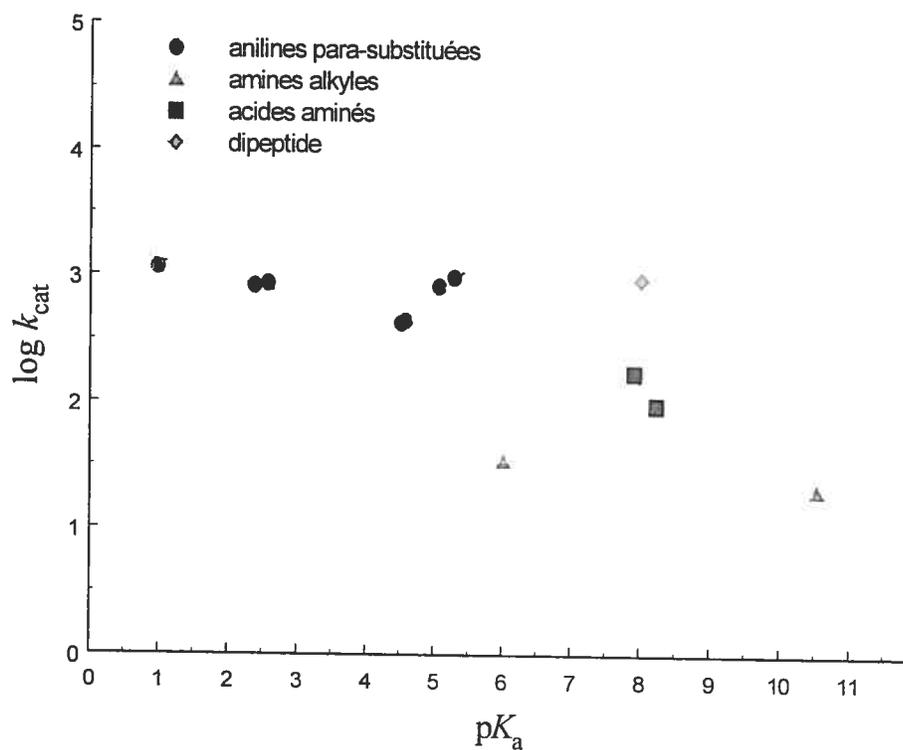


Figure 8. Courbe de Brønsted pour la transpeptidation des substrats donneurs L- γ -glutamylamides combinée à celles des substrats L- γ -glutamylanilides *para*-substitués dans des conditions saturantes du substrat accepteur glycylglycine.⁵⁸

Ces études ont été poursuivies et présentées ci-dessous dans le but de vérifier laquelle des deux hypothèses est la meilleure et ainsi atteindre l'objectif de cette recherche.

3.2 Résultats et discussion

3.2.1 Synthèse de la L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide

La synthèse du substrat L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide a été faite selon la méthode illustrée au schéma 7. Cependant, comme expliqué précédemment, cette voie de synthèse ne fonctionne pas pour ce substrat dû à la dernière étape qui est une hydrogénation en présence de palladium sur carbone activé. Ce dernier se trouve empoisonné par le soufre, ce qui ne permet pas de compléter cette synthèse. Donc, la voie utilisée pour obtenir ce produit est celle montrée dans le schéma 11.

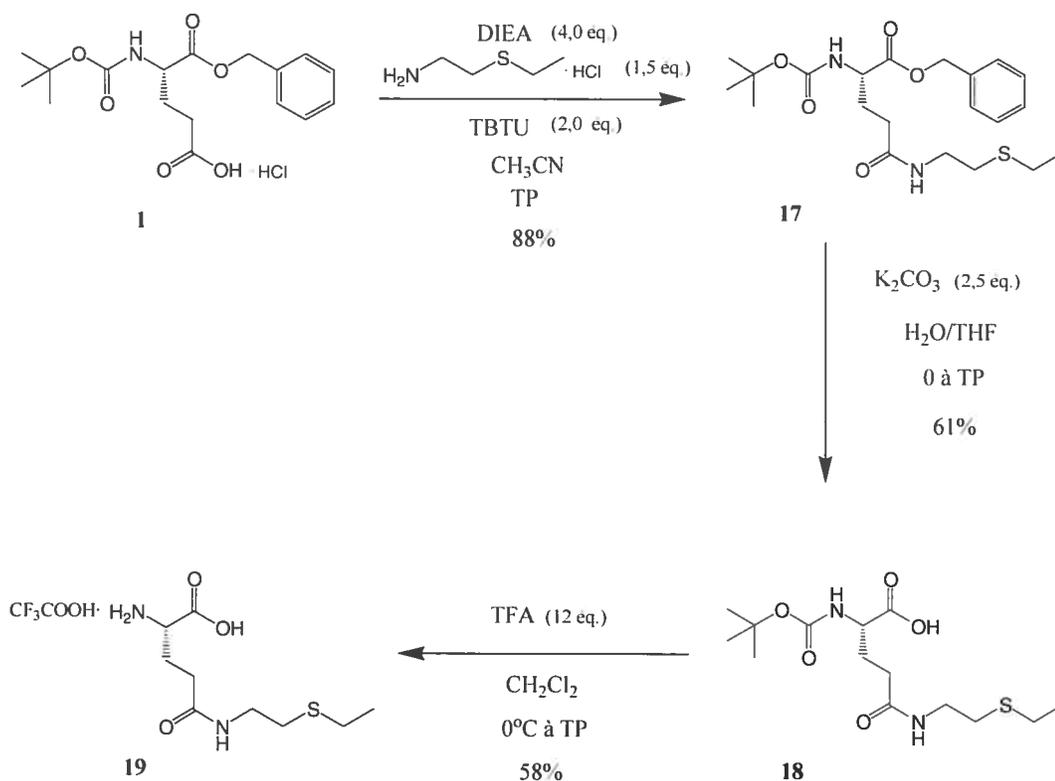


Schéma 11. Synthèse de la L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide

Donc, tout comme avant, la première étape de la synthèse est un couplage peptidique qui s'effectuera sur la chaîne latérale. Cependant, pour effectuer ce couplage les deux

fonctions de la chaîne principale doivent être protégées. L'acide *N*-Boc-L-glutamique α -benzyl ester **1** qui est un composé commercial a été choisi, car c'est le produit de départ utilisé pour la synthèse des autres substrats analogues. Donc, la première étape est un couplage entre l'acide glutamique di-protégé **1** et la 2-(éthylthio)éthylamine. La méthode utilisée provient d'un protocole grandement utilisé pour effectuer un couplage peptidique.^{74, 75} Cette première étape s'effectue avec un bon rendement (88 %) et consiste à dissoudre le composé **1** dans l'acétonitrile anhydre, sous atmosphère inerte, à température ambiante. Par la suite, la base diisopropylamine (DIEA) est additionnée pour la déprotonation de l'acide glutamique di-protégé, la 2-(éthylthio)éthylamine est aussi ajoutée suivi du TBTU qui est l'agent de couplage.

La deuxième étape est la déprotection du groupement benzyle. L'ordre de déprotection influence probablement peu la voie de synthèse. Donc, pour la déprotection du groupement benzyle quelques méthodes outre l'hydrogénation sont proposées. Entre autres, l'utilisation du AlCl_3 dans le nitrométhane avec de l'anisole est souvent utilisée.⁷⁶ La déprotection à partir du TMSOTf, TFA et thioanisole⁷⁷ permettrait la déprotection simultanée des deux groupements, cependant, cette voie a été testée sans trop de succès, car la molécule a été dégradée. L'étape de déprotection du groupement benzyle a été faite dans des conditions beaucoup plus douces, soit en dissolvant le produit du couplage **17** dans un mélange 1:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ avec la base faible K_2CO_3 .⁷⁸ Cette réaction est, cependant, un peu longue, soit deux jours pour qu'elle soit complète. Le rendement de cette étape (61 %) est acceptable pour notre projet puisque le but est d'obtenir le produit en quantité suffisante pour faire des tests cinétique et non optimiser le rendement.

Finalement, la dernière étape consiste à enlever le groupement Boc. L'utilisation de l'acide trifluoroacétique (TFA) est une bonne méthode pour y accéder.⁷⁹ Par contre, la purification est plus difficile, car le R_f des sous produits formés est assez près du R_f du produit désiré. Une petite colonne de chromatographie flash où l'élution se fait en

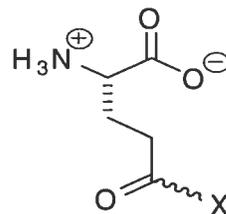
augmentant graduellement la polarité des solvants utilisés a permis de purifier le produit désiré.

Les détails expérimentaux sont décrits au chapitre 6. Ainsi, chacun de ces composés a été caractérisé par spectroscopie de masse, par RMN- ^1H et ^{13}C ainsi que par son point de fusion et son pouvoir rotatoire.

3.2.2 Courbe de Brønsted comprenant le substrat L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide

Jusqu'à maintenant, les résultats obtenus et représentés par la courbe de Brønsted ont permis d'établir les deux hypothèses citées ci-haut à la section 3.1. Par le tableau suivant, les valeurs cinétiques de chaque composé, comprenant le nouveau composé synthétisé dans la section précédente, y sont présentées. Par la suite, la nouvelle courbe de Brønsted ayant l'amine primaire 2-(éthylthio)éthylamine est illustrée.

Tableau II. Paramètres cinétiques des substrats testés comme substrat donneur dans la réaction de transpeptidation en présence de 20 mM Gly-Gly à pH 8,0 et à 37 °C.



Substrats	X	pK _a ^a	k _{cat} ^b (s ⁻¹)	K _M ^c (mM)	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ mM ⁻¹)
L-γ-glutamyl-L-cystéinylglycine (glutathion, GSH)		8,01	990	0,67	1478
L-γ-glutamylglycinemethylester		7,92	172	2,78	61,87
L-γ-glutamylglycinamide		8,23	95,9	3,30	29,06
L-γ-glutamylpropylamide		10,53	20,2	0,71	28,45
L-γ-glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide		9,57	11,6	0,49	23,67
L-γ-glutamyl-2,2,2-trifluoroéthylamide		6,02	33,9	2,35	14,43

a: référence⁸⁰ et⁸¹

b: erreur relative pour $k_{cat} \leq 6\%$ (SD) provenant d'une régression non-linéaire

c: erreur relative pour $K_M \leq 15\%$ (SD) provenant d'une régression non-linéaire

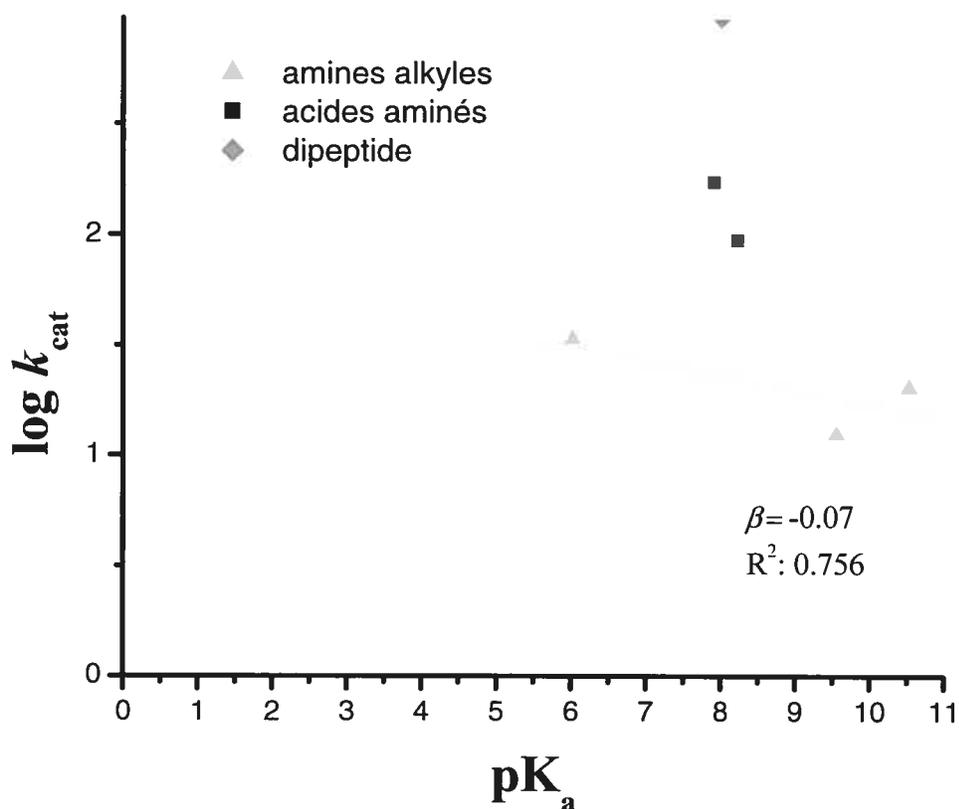


Figure 9. Courbe de Brønsted pour la transpeptidation des substrats donneurs L- γ -glutamylanilides *para*-substitués dans des conditions saturantes du substrat accepteur glycylglycine. En fonction du k_{cat} des substrats donneurs.

La nouvelle courbe de Brønsted, illustrée ci-dessus, dont la L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamine a été ajoutée, permet de croire que la deuxième hypothèse est la plus probable. En effet, il semble y avoir plusieurs classes de produits, car la 2-(éthylthio)éthylamine étant un groupe partant de la classe des alkyl amines se situe près des deux autres composés de sa catégorie. Donc, si l'on s'en tient à cette hypothèse, la basicité du groupe partant des alkyl amines n'influencerait pas la vitesse de réaction à l'état de transition. Cependant, d'autres composés faisant partie des autres catégories devraient être utilisés comme substrat donneur. De plus, la première hypothèse ne peut être complètement rejetée, car il aurait fallu ajouter d'autres points également dans les autres classes et comme le projet a pris une

nouvelle direction, ce qui sera énoncé dans le chapitre 4, ces substrats n'ont pas été synthétisés.

Par contre, on peut quand même supposer qu'il n'y a pas seulement une corrélation avec la nucléofugalité du groupe partant durant l'acylation. Il semble que l'efficacité est en relation avec des interactions qui ne sont pas identifiables, mais qui sont en lien avec la structure et l'affinité du substrat et non seulement avec la basicité de l'amine partante. De plus, les substrats ayant un groupe partant davantage similaire au Cys-Gly ont une vitesse de réaction plus élevée, ce qui ajoute du poids à l'importance de l'affinité entre le groupe partant et le site de liaison de cette partie du substrat donneur.

Dans le cas de la courbe de Brønsted tracée à partir du rapport k_{cat}/K_M une meilleure corrélation linéaire est observée.

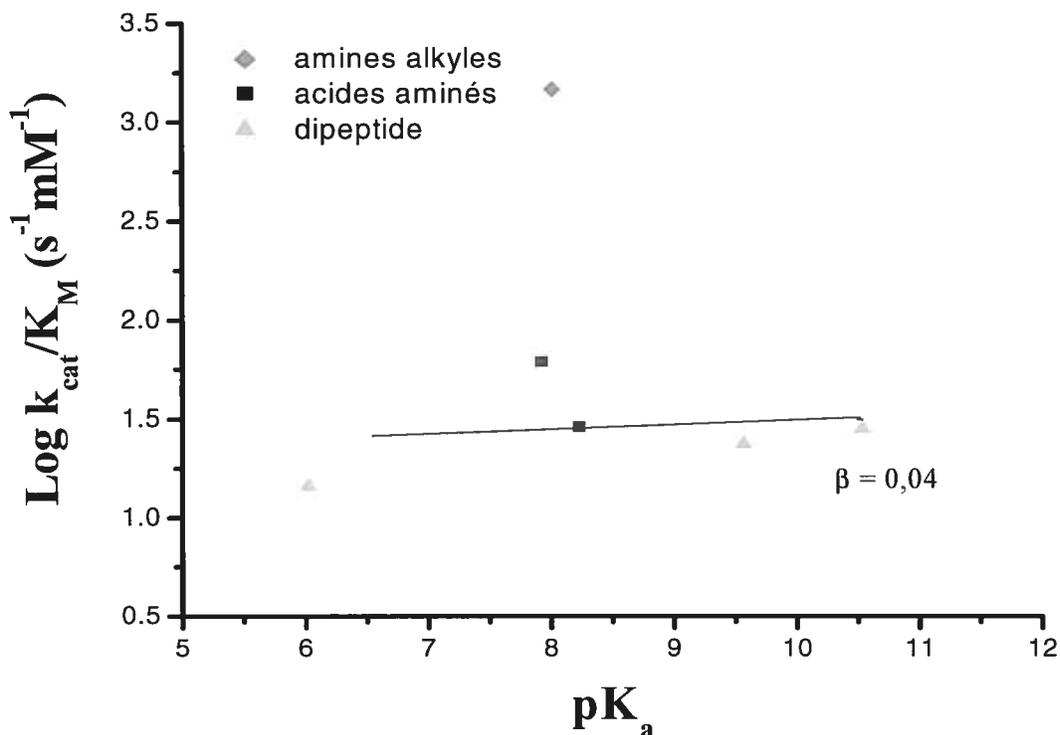


Figure 10. Courbe de Brønsted pour la transpeptidation des substrats donneurs L- γ -glutamylanilides *para*-substitués dans des conditions saturantes du substrat accepteur glycylglycine. En fonction du $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ des substrats donneurs

Cette courbe permet d'émettre l'hypothèse que l'étape limitante est la réaction de l'enzyme libre avec le substrat plutôt que la décomposition de l'intermédiaire covalent et tétraédrique comme postulé pour les anilides. Encore une fois cette courbe laisse voir la possibilité que les substrats donneurs soient divisés en plusieurs catégories, les mêmes que précédemment.

Les deux figures 9 et 10 permettent de poser l'hypothèse suivante. La valeur des pentes observées étant près de zéro laisse croire que l'azote du groupe partant à l'état de transition de l'étape limitante possède peu de charge développée. Donc, l'étape

limitante est en fait l'attaque nucléophile de la GGT sur les substrats donneurs suivie d'une protonation rapide de l'amine provoquant l'expulsion du groupe partant amine et la formation de l'acyle-enzyme.

En utilisant le modèle de structure cristalline de l'acyle-enzyme de Fukuyama (PDB : 2DBW) pour la GGT de *E. coli*²³ l'intermédiaire tétraédrique formé suite à l'attaque nucléophile sur le GSH a été reconstruit manuellement. Par la suite, le groupe partant Cys-Gly a été inséré manuellement dans la cavité du site de liaison et cela démontre les dimensions potentielles de la cavité.

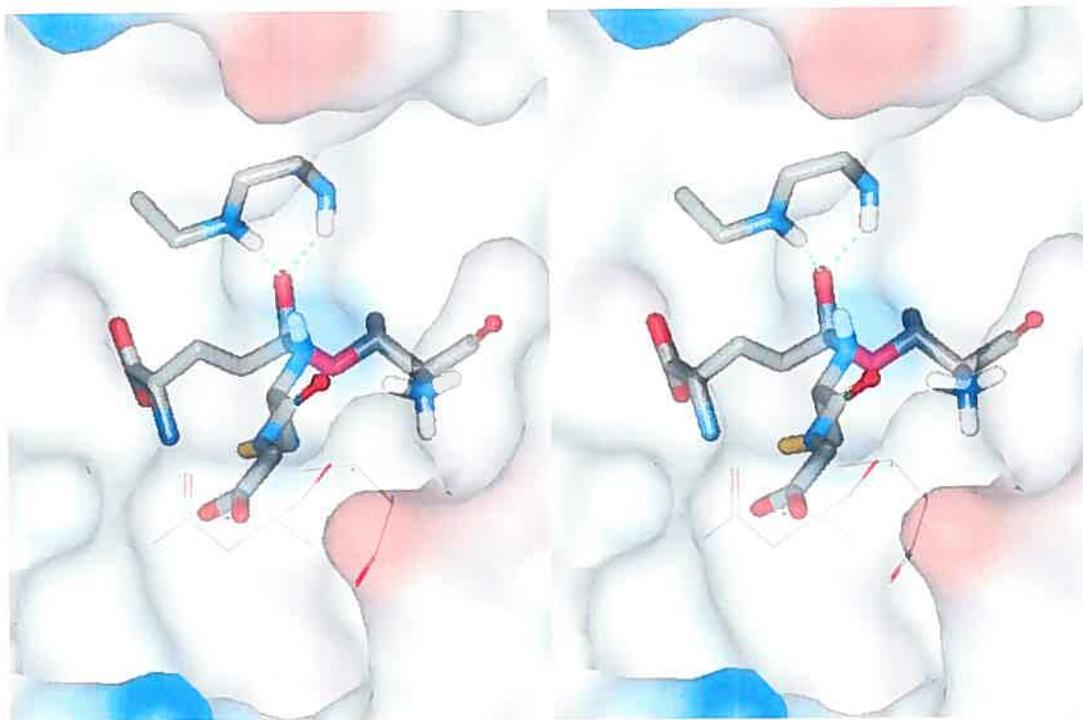


Figure 11. Modèle de la construction de l'intermédiaire tétraédrique formé du GSH et du cristal de l'intermédiaire acyl-enzyme. Le groupe partant Cys-Gly occupe le site de liaison modélisé et interagit avec la Thr-409 et Asn-411. L'image est générée en utilisant «Accelrys Discovery Studio Visualizer».

À partir de ce modèle il est apparent que les dimensions de la cavité sont appropriées à la liaison du Cys-Gly et que l'azote de la cystéine est bien positionné pour être

protoné par le groupement ammonium du nucléophile qui est le résidu Thr 391. De plus, dans le modèle, la Thr-409 forme une interaction avec le soufre de la cystéine pendant que Asn-411 pourrait former un pont hydrogène avec la glycine (NH) du groupe partant. Le groupement carboxylate de la glycine s'étend sur les bords du site de liaison où de potentielles interactions avec le solvant peuvent contribuer à orienter le groupe partant Cys-Gly dans la cavité. Par contre, il faudrait étudier plus rigoureusement ces dernières interactions à partir de la modélisation ou de la cristallographie. L'existence et la nature de la cavité permettent d'interpréter plus significativement les résultats cinétiques présentés précédemment.

Le site de liaison identifié par Fukuyama montre que les substrats peptidiques ont plus de facilité à se lier par des interactions spécifiques à celui-ci. Ceci explique pourquoi les substrats qui ressemblent davantage au Cys-Gly sont plus efficaces. Il semble que les interactions peuvent aider la distorsion du groupe γ -glutamyle amide perturbant la résonance entre N-C=O et rendant le carbonyle plus susceptible à l'attaque nucléophile. Cette forme d'activation est beaucoup plus importante que l'effet inductif provenant de l'électron retiré du groupe partant amine. Cela peut expliquer également la pente près de zéro à la figure 10.

3.3 Conclusion

En conclusion, de nouveaux composés ont été synthétisés. La L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide a permis d'appuyer la deuxième hypothèse émise précédemment qui spécule que la courbe de Brønsted observée à la figure 8 est en fait le résultat de différentes classes de composés. Ainsi, la L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide ferait partie de la famille des alkyles amines où la nature du groupe partant influence très peu l'état de transition puisque la pente observée est pratiquement nulle.

En bref, les deux figures 9 et 10 s'accordent pour montrer que l'attaque nucléophile de la GGT sur les substrats donneurs est l'étape limitante suivie d'une protonation

rapide de l'amine provoquant l'expulsion du groupe partant amine et la formation de l'acyle enzyme.

De plus, les études de Fukuyama laissent supposer qu'il y a un lien avec la structure et l'affinité du substrat et non avec la basicité de l'amine partante, car les substrats étant davantage similaires au groupe partant Cys-Gly ont une vitesse de réaction plus grande.

CHAPITRE 4

Optimisation de l'expression et de la purification de la GGT dans les levures *Pichia Pastoris*

4.1 Introduction

Jusqu'à maintenant très peu d'informations concernant la structure de la GGT humaine sont disponibles. En fait, la nature du nucléophile de la GGT de mammifère n'a pas encore été vérifiée. Cependant, le nucléophile de la GGT de bactérie s'avère être la Thr 391²³, ce qui laisse présumer que celui de la GGT de mammifère est son homologue. Le nucléophile de la GGT de bactérie (*E. coli*) a pu être identifié grâce à des études d'inhibition⁵⁶, de spectroscopie de masse⁵⁶ et dernièrement grâce à la cristallographie²³. Ainsi, des études permettant d'étudier la GGT humaine doivent être poursuivies, mais pour cela une quantité plus élevée de ce type de GGT doit être obtenue. Jusqu'à récemment, la GGT utilisée dans notre groupe était celle purifiée de reins de rats. Cette dernière procurait suffisamment d'enzyme pour différentes études mécanistiques, mais pour obtenir des quantités de GGT plus importantes, l'enzyme humaine a été exprimé dans les levures *Pichia pastoris*.¹⁸ Une grande quantité d'enzyme permettrait d'effectuer des études de spectroscopie de masse, ce qui pourrait permettre d'élucider les résidus responsables de la catalyse.

4.1.1 Purification de GGT dans différents systèmes

Dans la littérature, la GGT de reins de rat est la plus souvent utilisée, ce qui n'est pas surprenant puisqu'elle est retrouvée en abondance dans cet organe¹⁰. Dans notre groupe, les études mécanistiques ont été réalisées par ce type d'enzyme et la purification découle du protocole de Tate and Meister^{38,39} alors que la préparation des reins suit la méthode de Malathi *et al.*⁸². Ainsi, la GGT est récupérée dans le cortex du rein à la suite d'une série de manipulations dont des homogénéisations et centrifugations pour dégager les membranes cellulaires du cortex. Ensuite, l'ancre transmembranaire extracellulaire est clivée par la papaïne. Pour isoler la GGT, une précipitation des protéines est faite par le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille. Avec cette méthode, la GGT est récupérée avec un rendement de 52 %³⁹ et une activité spécifique de 840 U/mg.³³ Cette dernière valeur mesure en fait la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer un

μmol du premier produit libéré par minute et par milligramme d'enzyme. Ainsi, à partir de 25-30 reins de rats, il est possible d'obtenir 1,5 mg d'enzyme.³⁹ La solubilisation de l'ancre peut également se faire par le Triton X-100^{38,39}, un détergent, mais le rendement et l'activité spécifique sont inférieurs, soit 16 % et 652 U/mg après purification par chromatographie échangeuse d'ions et d'affinité³⁹.

Certains chercheurs ont essayé de purifier la GGT provenant d'organismes unicellulaires tel que la bactérie *E. coli*¹³ et la levure *S. cerevisiae*⁸³, cependant, leurs efforts n'ont pas été concluants. Ainsi, notre groupe a voulu développer une méthode pour l'expression et la purification de GGT recombinante, car elle représente une option intéressante qui est simple et offre souvent de bons rendements. De plus, cette méthode facilitera les éventuelles études de mutagenèse dirigée.

4.1.2 Méthodes connues pour l'expression et la purification de GGT humaine recombinante

Habituellement, les rendements obtenus suite à une purification directe d'organes sont moins élevés que ceux provenant de l'expression d'une enzyme recombinante à travers un autre organisme. Ainsi, pour cette étude, c'est la GGT humaine recombinante que nous essayerons d'obtenir. Une grande quantité d'enzyme permettra d'effectuer un grand nombre de recherches afin de mieux connaître cette enzyme et produire les inhibiteurs nécessaires pour contrer les différents effets physiologiques négatifs causés par la GGT.

Jusqu'à maintenant, la GGT humaine a entre autre été exprimée dans des fibroblastes de poumon de hamsters qui sont appelés cellules V79^{84,85}. Les résultats d'activité spécifique montrent une très grande efficacité et pureté de l'enzyme. L'activité spécifique que ces chercheurs ont obtenue est très bonne et correspond à 1100U/mg⁸⁵. Cependant, cette méthode n'est pas simple, car plusieurs cellules stables contenant le gène doivent être préparées, ce qui est un désavantage à considérer.

L'expression de la GGT recombinante dans des cellules d'insectes⁸⁶ a aussi permis d'obtenir la GGT humaine avec une bonne activité spécifique de 440 U/mg et avec un rendement de 0,36 mg pour 2×10^8 cellules d'insectes. Ce sont des cellules d'insectes Sf9 (ou Sf21) qui ont été infectées par des baculovirus ayant le gène de la GGT et qui procèdent aux modifications post-traductionnelles. Finalement, la purification à partir de différentes chromatographies, hydroxylapatite, isoélectrique et exclusion de taille ont grandement contribuées à obtenir cette activité spécifique. Malgré les bons résultats obtenus, cette méthode demande beaucoup de travail et de minutie afin d'éviter les contaminations. De plus, le temps de croissance de ces cellules pour une nouvelle génération est de 18-24 heures.⁸⁷

Le système d'expression choisi par notre groupe est la levure *Pichia pastoris*, car cette levure peut effectuer des modifications post-traductionnelles tout comme les eucaryotes plus complexes.¹⁸ Notamment, la levure permet d'effectuer la glycosylation des protéines,⁸⁸ ce qui est un grand avantage pour l'expression de la GGT puisqu'elle est hautement glycosylée. Donc, pour cette raison, la levure est un meilleur choix que les bactéries. La levure *S. cerevisiae* est un système qui a déjà été utilisé pour l'expression de la GGT de reins de rat, mais l'activité spécifique obtenue était plutôt très faible, 0,25 U/mg.⁸⁹ De plus, la quantité de protéine recombinante est de 10 à 100 fois supérieure, pour la levure *P. pastoris* que pour les levures *S. cerevisiae*⁹⁰. Ainsi, cette levure procure de nombreux avantages comme système d'expression.

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

Le plasmide choisi est le pPICZ α A et provient de la compagnie Invitrogen.¹⁸ Ce dernier est illustré ci-dessous à la figure 12. Ce plasmide qui est en fait un double brin d'ADN est introduit dans la levure *P. pastoris* pour permettre ensuite l'expression de la GGT désirée. Donc, les caractéristiques du vecteur sont les suivantes : absence d'ancre transmembranaire pour faciliter la purification, enzyme

sécritée dans le milieu de culture pour faciliter l'isolation et qui possède un «His-Tag», c'est-à-dire six histidines à la fin de la petite sous-unité, soit en C-terminale de l'enzyme. Ces six histidines ont la propriété de se fixer aux atomes de nickel liés à une matrice pour assurer en majeure partie la purification de l'enzyme grâce à la chromatographie d'affinité.

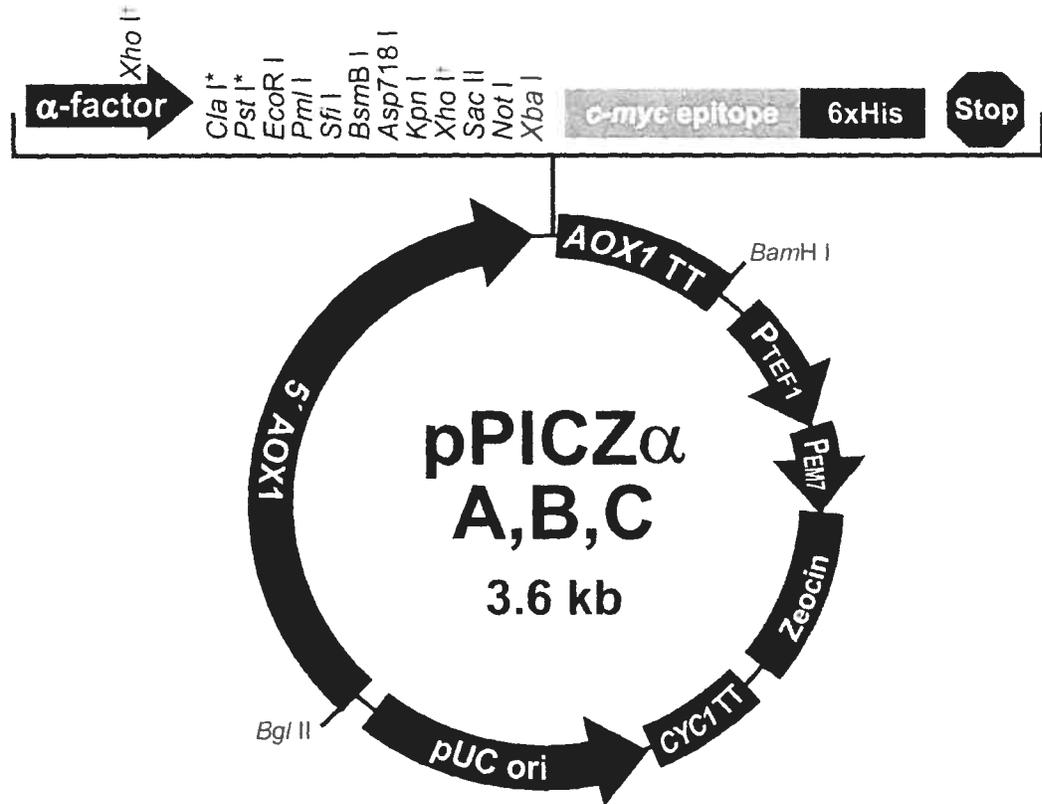


Figure 22. Caractéristiques du plasmide pPICZ α A⁹¹.

Donc, un résumé portant sur le clonage du gène de la GGT humaine dans ce plasmide ainsi que sur la transformation des bactéries *E. coli* sera rapporté que brièvement dans cet ouvrage, car cela représente le travail de Dr. Roselyne Castonguay. Ce sujet a été expliqué en détail dans la section 4.2 de sa thèse¹⁸.

Pour assurer la réplication de l'enzyme humaine recombinante dans la bactérie, le plasmide doit posséder des éléments importants. Parmi ces éléments, il y a le

«facteur α » qui est une séquence d'ADN comprenant 266 paires de bases. Le peptide résultant sera ajouté à la GGT exprimée et permettra à celle-ci d'être excrétée dans le milieu de culture, ce qui aidera pour l'étape de purification. Par contre, ce peptide sera clivé par une enzyme de la levure *P. pastoris*, la GGT recombinante ne contiendra donc pas ce peptide à la fin. Après le «facteur α » suit une séquence de bases (dans un site de multi-clonage) qui peut être coupé par toute une série d'enzymes de restriction afin d'y insérer le gène de la GGT humaine à l'endroit désiré. Il y a également l'épitope *c-myc* qui permet d'identifier la protéine recombinante parmi d'autres protéines de la levure, car les 10 acides aminés qu'il contient peuvent être détectés par un anticorps contrairement aux autres protéines. Suite à l'épitope *c-myc*, se trouve le «His-tag». Comme discuté précédemment, cette partie permettra une purification efficace de la protéine recombinante. Enfin, un codon «stop» permet de marquer la fin de la séquence d'ADN de la GGT humaine. Donc, ces éléments sont ceux apparaissant dans l'agrandissement du plasmide à la figure 12.

Sur ce plasmide se trouve également un bout d'ADN appelé 5' AOX1 illustré par une flèche. AOX1 est en fait une enzyme, l'oxydase d'alcool, qui permet de métaboliser le méthanol présent dans le milieu de culture des levures *P. pastoris*⁸⁸. Ce type de levure est en fait méthylotrope.

Il est également important de mentionner que l'antibiotique utilisé pour vérifier l'efficacité de la transformation est l'antibiotique Zeocin. Ainsi, pPICZ α A contient une séquence d'ADN de 347 paires de bases pour une enzyme étant résistante à cet antibiotique.

Le schéma 12 représente les étapes suivies lors du sous-clonage de la GGT tronquée dans le plasmide et la transformation dans les bactéries *E.coli*. Le plasmide pVL1392-hGGT contenant le gène de la GGT humaine provient du groupe de N. Taniguchi du Japon.¹⁸⁻⁹²

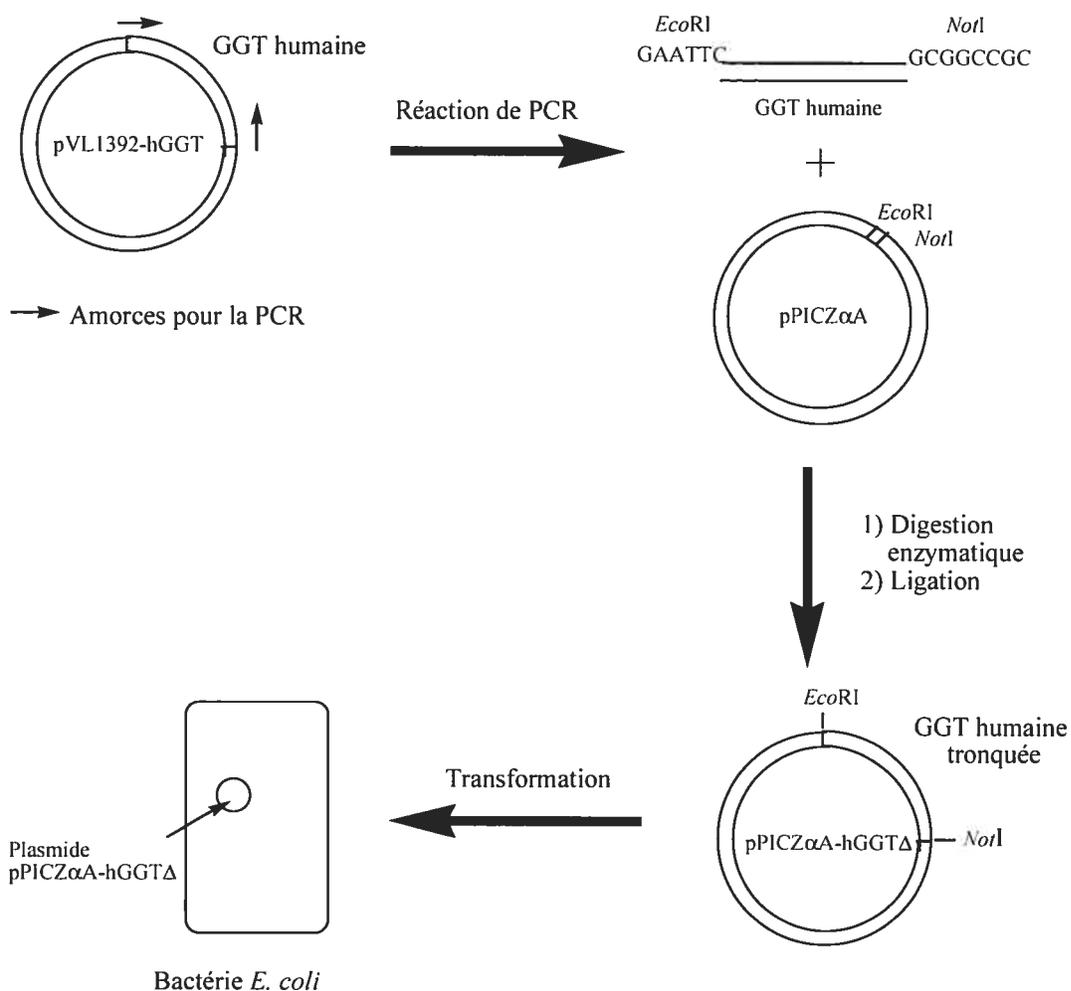


Schéma 12. Étapes pour effectuer le sous-clonage de la GGT tronquée dans le plasmide pPICZ α A et la transformation dans les bactéries *E. coli*.¹⁸

Suite à ces étapes, plusieurs colonies de bactéries possédant le plasmide pPICZ α A-hGGT Δ ont été obtenues.

4.2 Optimisation de l'expression

4.2.1 Linéarisation du plasmide purifié, transformation des levures *P.pastoris* et vérification de l'intégration du gène

L'introduction du gène de la GGT humaine dans les levures *P. pastoris* ne peut se faire sans d'abord rendre linéaire le plasmide. Il est important de souligner que le plasmide pPICZ α A-hGGT Δ ne contient aucune séquence de répllication autonome,^{18,90,91} il faut donc insérer le gène dans le génome de la levure.

La transformation de levures s'est faite trois fois à partir de deux souches différentes. Les souches utilisées sont X-33 et KM-71. Ce qui différencie la souche X-33 (type sauvage) de la souche KM-71 (*his4arg4aox1 Δ ::ARG4*) est une mutation génétique au niveau du gène *AOX1* qui est supprimé en partie et remplacé par le gène ARG4 de la levure *S. cerevisiae*.⁹¹ Ce nouveau gène est appelé *AOX2* et a pour effet de ralentir la dégradation du méthanol.⁹¹

Une deuxième transformation a été faite avec la souche X-33, mais avec plus de Zeocin mis dans le milieu de culture. Ainsi, les cellules ayant poussé sur un milieu plus riche en antibiotique risquent d'avoir intégré plus de copies du gène que les colonies poussant sur les milieux plus pauvres en antibiotique.⁹³

La méthode utilisée pour la linéarisation et la transformation de ces deux souches est la même. Les principales étapes à suivre sont illustrées ci-dessous au schéma 13.

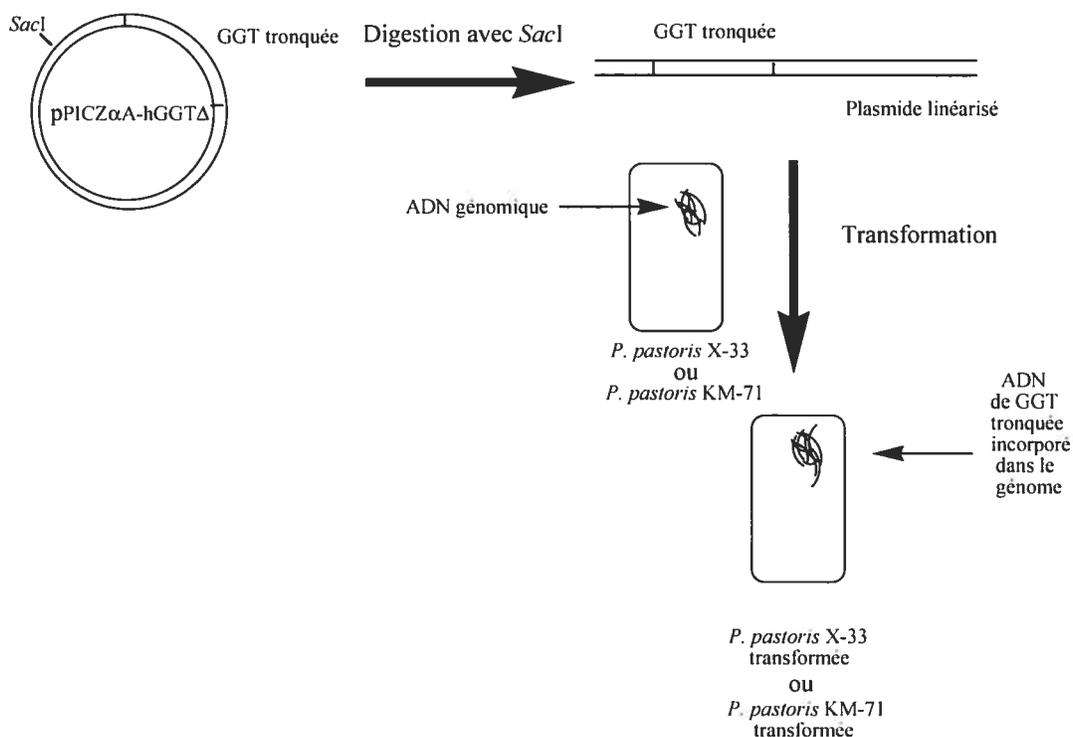


Schéma 13. Étapes pour effectuer la transformation des levures *P.pastoris* et l'intégration de l'ADN plasmidique dans leur génome.^{18,88}

La linéarisation du plasmide a été faite tel que discuté dans la littérature⁸⁸ et effectuée dans notre groupe.¹⁸ Ensuite, la transformation des cellules de levures est effectuée à l'aide de la technique au LiCl ce qui permet d'affaiblir les membranes de levure et d'y insérer le gène de la GGT humaine. Donc, une fois les manipulations de la transformation terminées, les levures transformées provenant d'une part de la souche X-33 ont été étalées sur un pétri contenant 500 $\mu\text{g/mL}$ de l'antibiotique Zeocin et d'autre part celle provenant de la souche KM-71 ont été étalées sur des pétris contenant 100 $\mu\text{g/mL}$ et 500 $\mu\text{g/mL}$ d'antibiotique.

Pour les levures transformées provenant de la souche X-33, une seule colonie est apparue après 3 jours. Avant de poursuivre les études avec cette colonie, la vérification de l'intégration du gène est nécessaire. Tout d'abord, l'ADN génomique de la GGT est isolé après avoir fait croître les cellules transformées dans un milieu de culture à 30°C toute la nuit et en l'absence de Zeocin. Une fois l'ADN isolé, ce dernier doit être purifié. Les étapes de purifications sont les mêmes que celle décrites au chapitre 6 de la thèse de Dr. Castonguay.¹⁸ À la suite de ces étapes, l'ADN a bel et bien été isolé. Grâce à une réaction de PCR qui permet l'amplification du fragment d'intérêt de l'ADN génomique, nous avons montré que l'intégration du gène a réussi. En effet, sur un gel d'agarose 1%, une bande correspondant à la masse des 1640 paires de bases de la GGT est visible.

Pour les cellules de levures transformées provenant de la souche KM-71, 3 colonies sont apparues sur le pétri contenant 100 µg/mL de Zeocin alors qu'une seule est apparue sur le pétri contenant 500 µg/mL de Zeocin après 3 jours d'incubation. Les mêmes opérations discutées ci-haut ont été faites pour ces levures. Dans le cas des cellules provenant du pétri contenant seulement 100 µg/mL, l'insertion du gène s'est très bien faite. Encore une fois, on retrouve une bande correspondant à la masse des 1640 paires de bases de la GGT sur le gel d'agarose 1%. Par contre, dans le cas des cellules se trouvant sur le pétri ayant 500 µg/mL de Zeocin, la transformation semble avoir échoué.

C'est donc avec les cellules X-33 (100 µg/mL de zéocine) transformées préalablement dans notre groupe,¹⁸ les cellules X-33 (500 µg/mL de Zeocin) et KM-71 que l'expression a été étudiée afin de vérifier quelles cellules permettent les meilleurs résultats.

4.2.2 Expression de la GGT dans *P.pastoris*

Le protocole d'expression est le même que celui développé dans notre groupe¹⁸. Aucune autre optimisation n'a été apportée. Le schéma ci-dessous montre bien les étapes suivies pour l'expression de la protéine.

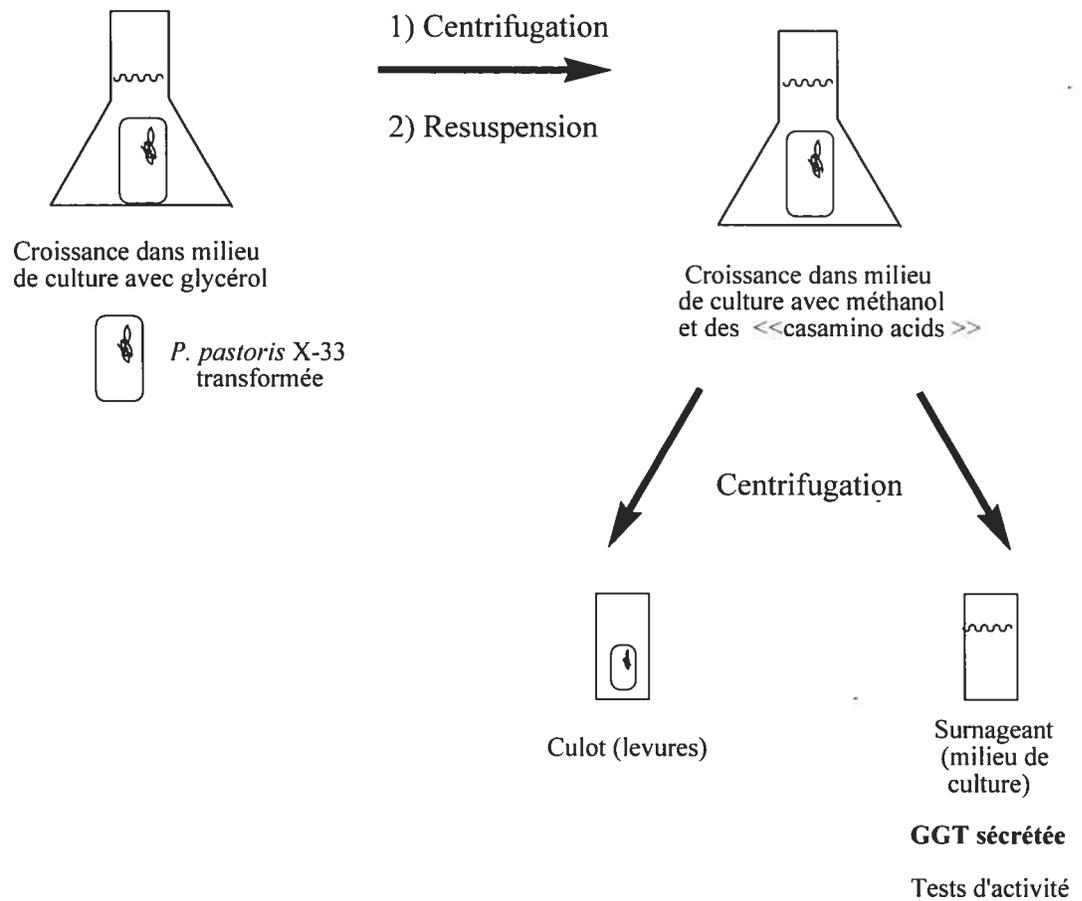


Schéma 14. Étapes pour l'expression de la GGT humaine tronquée à partir de la levure *P.pastoris* transformée avec le plasmide pPICZ α A-hGGT Δ .

La première étape consiste à faire croître les cellules dans un milieu contenant du glycérol et du tampon phosphate pH 7.0. Ce milieu est nommé BMGY pour «Buffered Glycerol-complex Medium». Ce milieu assure la croissance des levures sans toutefois permettre l'induction, car le dextrose ou plutôt le glucose, dans ce cas,

ne permet pas d'initier cette étape.⁸⁸ Les cellules sont ensuite centrifugées et les culots suspendus dans un milieu contenant du méthanol afin de permettre, cette fois, l'induction. Il est à noter que le milieu BMMY pour «Buffered Methanol-complex Medium» est exempt de glycérol, mais contient également un tampon phosphate pH 7.0. La densité optique initiale se situe aux alentours de 15,0, ce qui a été démontré comme étant la meilleure densité pour obtenir une grande quantité de GGT tronquée.¹⁸ C'est également à cette étape où 1 % de «casamino acids» est ajouté au mélange afin de ralentir la digestion potentielle de la GGT par les protéases capables de digérer celle-ci. Il a été démontré que le nombre d'unités de GGT était beaucoup plus élevé en leur présence.¹² De plus, comme établi précédemment la quantité de méthanol doit rester 1 % tout au long de l'induction pour des résultats optimaux.¹² L'induction se fait sur une période d'environ 96 heures et à chaque 24 heures 1 % de méthanol est ajouté, car on considère qu'il s'est complètement évaporé. L'enzyme est finalement récupérée dans le surnageant suite à une centrifugation puisqu'elle est excrétée dans le milieu grâce au facteur α présenté à la section 4.1.3. Le surnageant est placé à -80°C pour assurer sa conservation.

L'expression des cellules transformées X-33 ayant poussé sur le pétri contenant 500 $\mu\text{g/mL}$ en Zeocin a été effectuée. Ayant poussé sur un milieu plus riche en antibiotique, on peut croire qu'un plus grand nombre de copies du gène a été inséré ce qui favoriserait le nombre d'unités de GGT produit.⁹³ Cependant, suite aux résultats expérimentaux, le nombre d'unités est légèrement plus faible pour les cellules ayant poussé sur le pétri contenant davantage de Zeocin. Dans la littérature, il a été observé que dans certains cas, le nombre de copies du gène inséré pouvait affecter le rendement. Cela a entre autre été observé pour la levure *Saccharomyces cerevisiae*.⁹³ Si le temps n'avait pas manqué, il aurait été intéressant de vérifier par une analyse «Southern blot» le nombre de copies réellement présent dans les cellules.

Pour ce qui est des cellules de levures KM-71 transformées, celles-ci présentent également un nombre d'unités inférieur à celui obtenu par les cellules transformées

préalablement dans notre groupe (X-33, 100 µg/mL de Zeocin). Donc, l'induction n'a pas été favorisée par des cellules métabolisant plus lentement le méthanol.

Vu ces résultats, l'étude s'est poursuivie à l'aide des cellules transformées provenant de la souche X-33 et étalées sur un pétri contenant 100 µg/mL de Zeocin.

4.2.3 Expression à plus grande échelle de la GGT dans *P.pastoris*

Le protocole de l'expression établi a été repris, mais à plus grande échelle, car le but de notre expérience était d'obtenir suffisamment de GGT pour effectuer différentes études mécanistiques. Les étapes présentées au schéma 12 demeurent identiques. Des cellules fraîches sont utilisées et une pré-culture de 5 mL est laissée pour la nuit à 30 °C sous agitation. Ensuite, la pré-culture est transférée dans 1 L du milieu de BMGY afin de permettre aux cellules de croître et cela durant toute une fin de semaine. La densité optique se trouve à ce moment aux alentours de 10,5. Pour induire la production de GGT, on transfère les cellules dans le milieu de BMMY où le volume est ajusté de manière à ce que la densité optique soit tout près de 15,0. L'induction s'effectue sur une période de 96 heures.

Il est à noter qu'avant la purification, on trouve une activité spécifique environ deux fois plus grande pour l'expression à grande échelle comparativement à celle à petite échelle. Ce qui pourrait expliquer ce phénomène est l'utilisation d'une fiole erlenmeyer en nalgène dans laquelle on retrouve des baffles. Ceux-ci contribuent à une meilleure oxygénation des cellules empêchant probablement la mort cellulaire d'une certaine quantité de levure.

L'expérimentation à grande échelle ayant réussi sans avoir eu à apporter de modifications au protocole déjà établi, la suite de l'étude concernera la purification de la GGT humaine recombinante.

4.2.4 Concentration de la GGT humaine recombinante

Après chaque induction, un volume près de 700 mL de surnageant contenant la GGT recombinante est récupéré. Le surnageant est alors séparé également dans deux bouteilles de nalgène conservées, par la suite, à -80°C . Avant la purification, la concentration du surnageant contenu dans une bouteille est nécessaire pour s'assurer que la matrice de Ni-NTA retiendra efficacement la protéine. Donc, la concentration de l'enzyme et la purification doivent être effectuées dans une même journée, car l'enzyme semble perdre de son activité avec le temps avant d'être complètement purifiée. Cette perte d'activité peut être causée par la présence de protéase dans le surnageant. Dans le futur, il serait bien d'approfondir sur la stabilité de l'enzyme dans le surnageant avant la purification.

Pour la concentration de la protéine, différentes méthodes peuvent être employées. Celles testées pour cette enzyme dans notre groupe sont les suivantes : la précipitation au sulfate d'ammonium et celle à l'acétone.¹⁸

La précipitation au sulfate d'ammonium est une méthode grandement utilisée dans la littérature. Cette méthode consiste à rendre les protéines plus solubles dans l'eau, car le sulfate d'ammonium vient stabiliser les charges de la GGT lorsqu'il se trouve en faible concentration.⁹⁴ Cependant, à mesure que la concentration de sulfate d'ammonium augmente, c'est l'eau qui solvate ce dernier faisant ainsi précipiter la protéine chargée. Les résultats obtenus par la précipitation au sulfate d'ammonium sont bons soient 46 % de rendement.¹⁸

L'autre méthode est la précipitation à l'acétone qui est une méthode que l'on retrouve aussi dans la littérature pour la précipitation des protéines.⁹⁴ Cette méthode consiste à précipiter les protéines en utilisant un solvant organique agissant en diminuant la solvation des protéines.⁹⁴ Ainsi, les protéines stabilisent leurs charges entre elles, provoquant de ce fait la précipitation. Cette méthode a offert un rendement de 43 %, ¹⁸ ce qui est légèrement en dessous de la première méthode.

Pour d'optimiser la concentration, dans un premier temps des tubes de filtration en deux parties ayant une limite de 10 kDa de marque Amicon ultra de millipore ont été testés. Les cellules ont été centrifugées à 2000 rpm, à 4 °C et en présence de tampon phosphate de potassium 0.1 M pour réussir à enlever le maximum de protéines autres que la GGT humaine recombinante dans le surnageant. Cependant, cette méthode diminue grandement l'activité de l'enzyme. Il semble qu'une bonne quantité d'enzyme soit restée collée sur la membrane du tube. Ce phénomène a déjà été observé dans notre groupe pour la GGT de reins de rat pour cette même méthode.

Finalement, la meilleure méthode consiste à utiliser le «Stirred cell» Amicon. Cet appareil contient une membrane de cellulose ayant une limite de 10 000 unités. Ce qui empêche la GGT de coller, dans ce cas-ci, est probablement l'agitation continue apportée par cet appareil. De plus, ce qui permet la concentration du surnageant est une entrée d'azote qui pousse sur ce dernier.

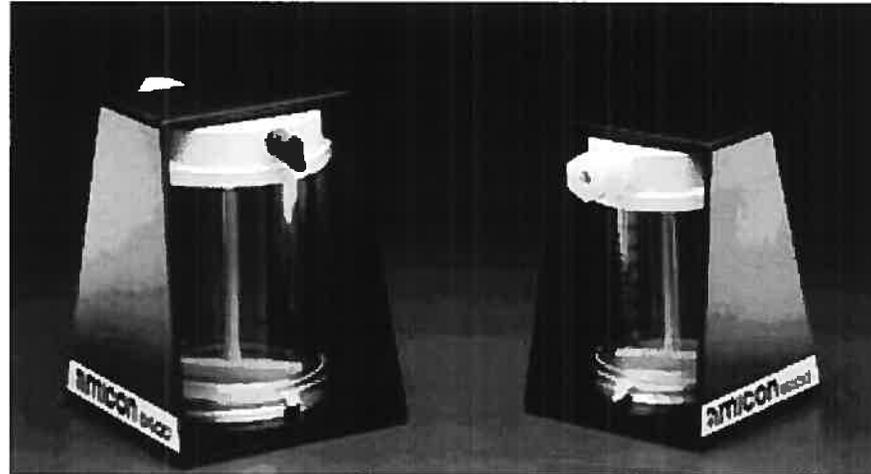


Figure 33. Appareil «Stirred cell» de Amicon pour la concentration⁹⁵

Pour cette méthode, une bouteille de nalgène, contenant environ 350 mL et préalablement placée à -80 °C, est laissée à 4 °C pour la nuit afin d'assurer que le surnageant dégèle lentement et que l'enzyme reste au froid, car elle a tendance à se

dénaturer. Les manipulations s'effectuent dans la chambre froide à 4 °C pour cette même raison.

Avant l'utilisation du «Stirred cell» pour la concentration, une filtration sous vide à partir de filtres Whatman 541 circulaires ayant des pores de 20-25 µm s'impose afin d'enlever toutes grosses particules pouvant boucher la membrane de cellulose d'ultrafiltration. Cette étape n'affecte aucunement l'activité et le nombre d'unités d'enzyme. Ensuite, le surnageant est transféré dans le «Stirred cell».

Dans un premier temps, le volume de surnageant passe de 350 mL à 50 mL. Par la suite, 100 mL de tampon phosphate de potassium 0.1 M, contenant 300 mM de NaCl et à pH 8,0 sont ajoutés pour changer le milieu. Cette étape est reprise trois fois, ce qui facilite la purification à l'aide de la colonne Ni-NTA. L'enzyme colle davantage à la matrice de Ni-NTA alors que les protéines indésirables sont moins nombreuses, ce qui évite à la colonne contenant la matrice de Ni-NTA de boucher. La concentration est arrêtée après 5-6 heures quand il reste environ 35 mL de liquide dans le «Stirred cell». Ceux-ci sont transvidés dans un tube falcon de 50 mL. Le surnageant est alors de couleur beige, ce qui permet de certifier l'importance de la purification. Cependant, cette méthode de concentration est supérieure à toute les autres, car un rendement de 81 % est obtenu. Rappelons que la méthode au sulfate de sodium offrait un rendement de 46 %.¹⁸ La concentration au «Stirred cell» apporte donc une amélioration considérable au protocole déjà établi.

4.2.5 Purification de la GGT humaine recombinante

La dernière étape avant d'obtenir de la GGT humaine pure est la purification à l'aide d'une matrice de Ni-NTA. Cette méthode de purification peut être utilisée, car l'enzyme recombinante contient un «His-tag» soit une série de six histidines placées sur la petite sous-unité. Cette particularité permet à la GGT de se lier au nickel contrairement aux autres protéines présentes dans le milieu permettant ainsi la purification. Pour assurer une bonne purification de l'enzyme, des lavages à partir

d'imidazole sont effectués à différentes concentrations. De cette manière, les protéines non désirées et liées non spécifiquement seront éluées lors des lavages ayant une faible concentration d'imidazole alors que la GGT fortement liée sera éluée à de plus grandes concentrations.

Donc, pour effectuer la purification les 35 mL ont été mis en présence de 2 mL de matrice. Cela peut sembler beaucoup, mais en présence de 1,5 mL de matrice, pour ce même volume initial de surnageant, l'enzyme n'a pas été toute retenue. De plus, des protéines du milieu semblent se fixer légèrement au site de Ni²⁺. Ce qui est possible si celles-ci contiennent également des histidines.

Ensuite, la matrice est agitée lentement pendant 45 min par basculement à 4 °C afin que la GGT humaine se fixe à celle-ci. La matrice est placée dans la colonne et le milieu non fixé s'écoule goutte à goutte. Dans un premier temps, un lavage avec quelques mL de tampon phosphate de potassium 0.1 M et à pH 8.0, contenant 300 mM de NaCl pour assurer une bonne force ionique,¹⁸⁻⁹⁶ est ajouté pour enlever le plus possible les autres protéines. Les lavages se poursuivent avec ce même tampon auquel 5 et 10 mM d'imidazole ont été ajoutés pour éluer les protéines non spécifiques s'étant liées à la matrice. Finalement, 3 mL de tampon contenant 250 mM d'imidazole sont ajoutés, ce qui retire la GGT fixée à la matrice. L'enzyme recombinante est alors obtenue avec un très bon rendement et une activité spécifique acceptable.

Tableau III. Concentration de la GGT humaine recombinante par le «Stirred cell» et purification par Ni-NTA.

Étape	Quantité de protéine (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Activité (U)	Rendement (%)
Surnageant	9,9	10	100	100
Filtration	12	8,4	99	99
Concentration	6,0	13	80	81
Milieu non fixé 1 à la colonne	0,9	4,9	4,8	4,7
Milieu non fixé 2 à la colonne	1,7	2,9	4,9	4,9
Milieu non fixé 3 à la colonne	0,8	4,6	3,8	3,8
Tampon (300 mM NaCl)	0,09	3,0	0,3	0,3
5 mM imidazole	0,4	1,5	0,6	0,6
10 mM imidazole	0,2	4,2	0,8	0,8
250 mM imidazole-1	0,4	240	87	86
250 mM imidazole-2	0,01	178	2,0	2,0

Tableau IV. Concentration de la GGT humaine recombinante par sulfate d'ammonium et purification par Ni-NTA.¹⁸

Étape	Quantité de protéine (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Activité (U)	Rendement (%)
Surnageant	2,4	3,0	7,3	100
Surnageant 60 % (NH ₄) ₂ SO ₄	2,4	2,5	5,9	80
Culot 60 % (NH ₄) ₂ SO ₄	0,6	1,4	0,9	12
Surnageant 95 % (NH ₄) ₂ SO ₄	1,9	1,1	2,1	29
Culot 95 % (NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	7,2	3,9	53
Milieu non fixé à la colonne	0,3	1,6	0,5	7,4
5 mM imidazole	0,06	1,8	0,1	1,4
10 mM imidazole	0,004	7,0	0,03	0,4
20 mM imidazole	0,005	21	0,1	1,4
250 mM imidazole-1	0,01	280	3,4	46
250 mM imidazole-2	0,01	7,4	0,08	1,1

En observant les valeurs du tableau III, il est évident que 2 mL de matrice Ni-NTA pour cette quantité d'enzyme est suffisant et que l'enzyme y colle très bien, car très peu de GGT se retrouve dans le milieu non fixé et dans les premiers lavages.

De plus, avec un rendement final de 86 % une augmentation presque deux fois plus grande est remarquée. Ainsi, la purification de l'enzyme a très bien fonctionné. Cette méthode permet d'obtenir environ 1,3 mg d'enzyme par litre de culture, ce qui est obtenu habituellement avec une trentaine de reins de rat. La valeur d'activité spécifique obtenue est comparable à celle d'Ikeda pour la GGT humaine exprimée par des baculovirus d'insectes avec une activité spécifique de 440 U/mg.⁸⁷ Cette nouvelle méthode d'expression et de purification permettra d'obtenir de plus grandes quantités de GGT humaine et surtout beaucoup plus facilement que provenant d'un organe direct. De plus, cette méthode s'avère peu coûteuse et surtout assez simple. Le schéma suivant rappelle les principales étapes pour obtenir la protéine.

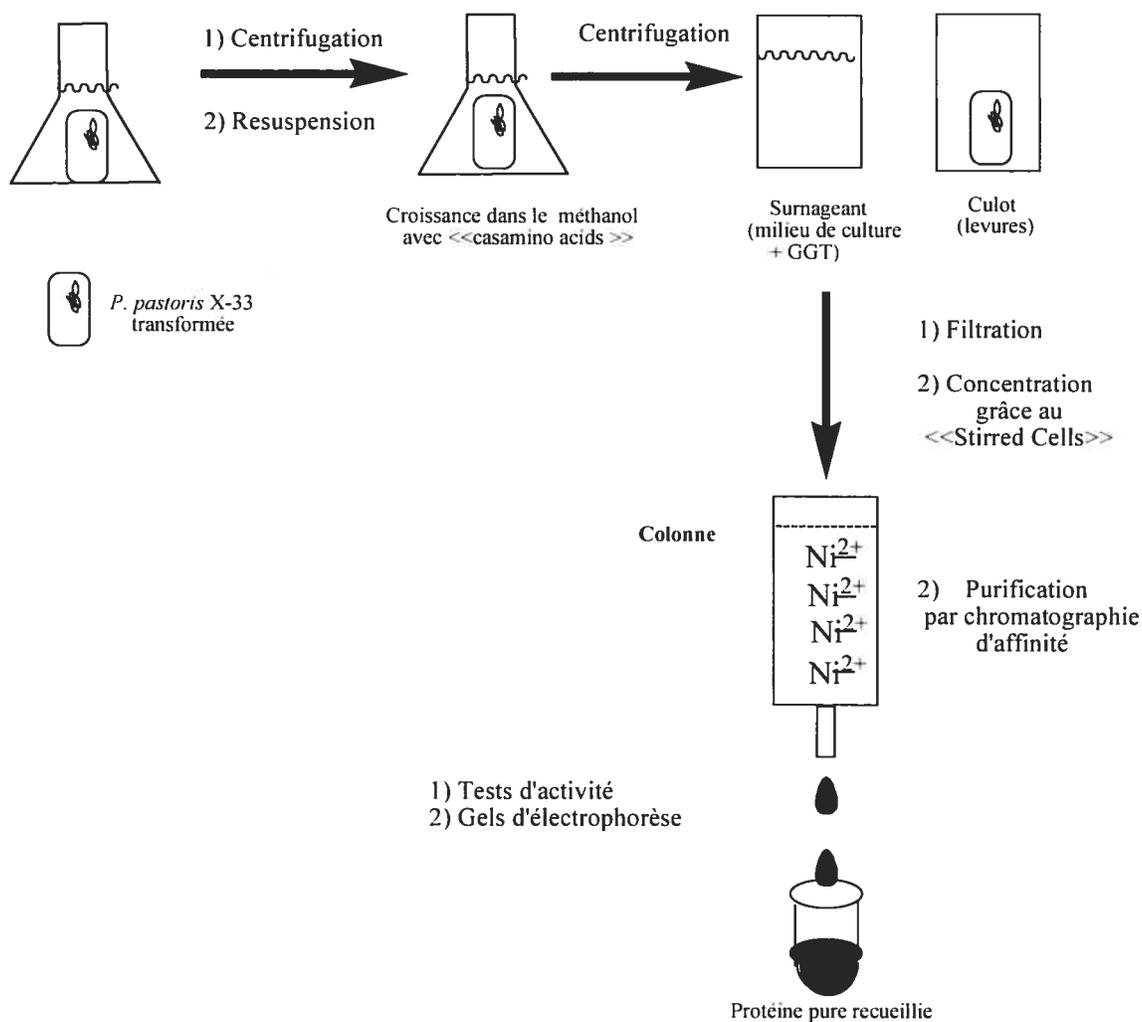


Schéma 15. Étapes pour l'expression et la purification de la GGT humaine.

La résolution de l'enzyme a été entreprise sur un gel d'acrylamide. Sur ce gel (figure 14) il est facile d'identifier la petite sous-unité, mais pour la grosse cela est moins évident. Plusieurs essais ont montré le même patron.

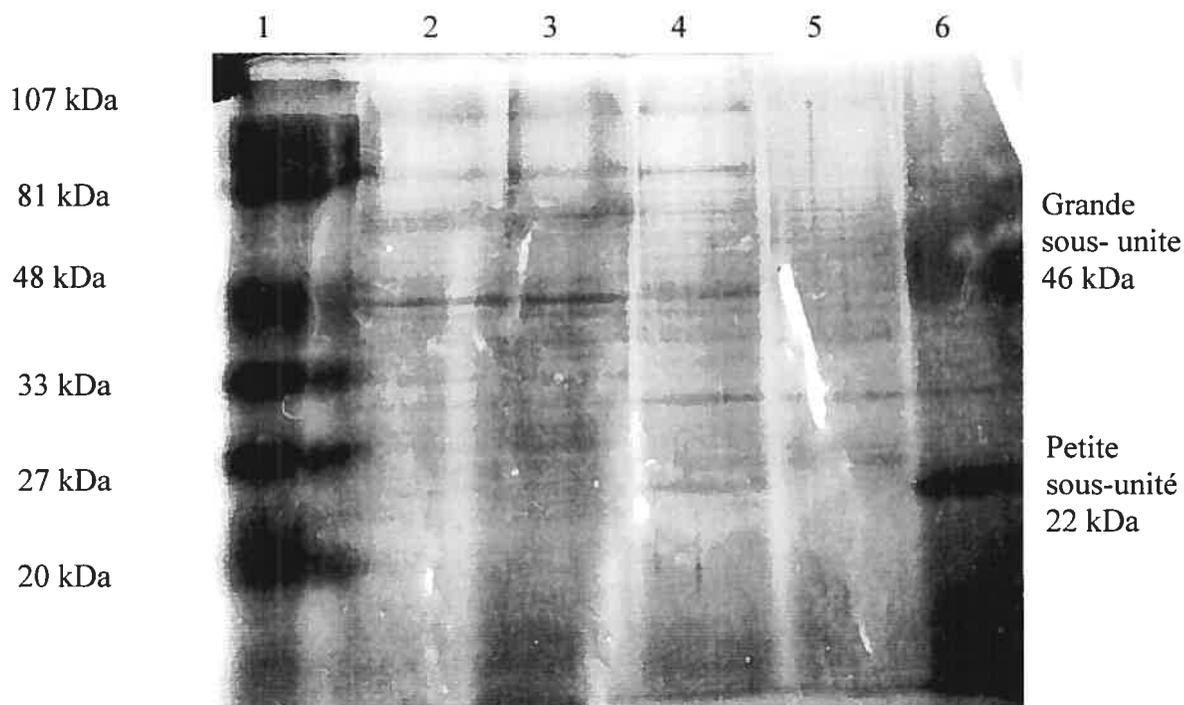


Figure 44. Gel d'électrophorèse de protéine d'échantillons de la purification de la GGT humaine recombinante par concentration au «Stirred cell» et chromatographie d'affinité avec une colonne de Ni-NTA. Puits 1, marqueur de poids moléculaire (en kDa); puits 2, milieu non fixé 1; puits 3, milieu non fixé 3; puits 4, fraction d'élution avec 5 mM imidazole; puits 5, fraction d'élution avec 10 mM d'imidazole; puits 6, fraction d'élution avec 250 mM d'imidazole.

4.3 Conclusion

Le plasmide pPICZ α A-hGGT Δ a été intégré dans les cellules de levures provenant de deux souches différentes, X-33 et KM-71. Les cellules KM-71 métabolisant le méthanol plus lentement lors de l'induction des cellules de levures n'ont pas offert des résultats aussi bons que ceux provenant de la souche X-33 transformées préalablement dans notre groupe.

L'étude s'est poursuivie par l'expression de ces dernières levures. L'expression à grande échelle n'a pas nécessité d'optimisations. De plus, une activité spécifique

plus grande est observée ce qui est probablement causé par les erlenmeyers avec baffles employés qui offrent une meilleure oxygénation des cellules.

Ensuite, le surnageant a été concentré avec un très bon rendement de 81% grâce à un «Stirred cell» de Amicon. De plus, cette méthode est très simple et peu coûteuse. Elle donne un rendement meilleur que la concentration au sulfate d'ammonium et à l'acétone.

La purification à partir d'une matrice de Ni-NTA a également été réussie avec un rendement de 86 %. Pour favoriser la purification lors de la concentration le milieu a été changé avec un tampon phosphate de potassium 0.1 M contenant 300 mM de NaCl et à pH 8.0. Cela a permis d'enlever davantage de protéines non désirées de ce milieu.

En fait, cette méthode développée permet d'obtenir un rendement supérieur en GGT comparativement à plusieurs méthodes retrouvées dans la littérature dont la méthode utilisée pour obtenir la GGT de reins de rat dans notre groupe qui permet d'obtenir la GGT avec un rendement de 52 %.³⁹

Maintenant, que nous avons réussi à établir un protocole d'expression et de purification avec de bons rendements pour la GGT humaine, un plus grand nombre d'expériences pourront être effectuées. Cela permettra de mieux connaître cette enzyme présente au cœur de certains désordres physiologiques.

CHAPITRE 5

Conclusion

Jusqu'à maintenant, de nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre le mécanisme catalytique de l'enzyme γ -glutamyltranspeptidase et de connaître les acides aminés impliqués dans sa catalyse et dans la liaison de ses substrats. Ainsi, de nouvelles informations sur le sujet permettraient d'accroître notre connaissance de son rôle physiologique, favorisant de ce fait la conception d'inhibiteurs puissants pour contrer les désordres physiologiques causés par la GGT. C'est dans ce but que les recherches présentées dans ce mémoire ont été menées.

Tout d'abord, l'optimisation d'une méthode de dérivation au chlorure de dabsyle et d'analyse par HPLC a permis d'effectuer la première courbe pH-vitesse du substrat naturel de la GGT, le glutathion. La courbe pH-vitesse obtenue présente une forme de cloche et des valeurs de pK_a de 7.9 et de 8.4. Le résidu actif sous la forme basique ($pK_a \sim 7.9$) correspond fort probablement à l'amine de la thréonine en N-terminal de la petite sous-unité. Ce groupement a été identifié comme base générale suite aux études de cristallographie de la GGT de *E.coli*. L'autre résidu actif sous la forme acide ($pK_a \sim 8.4$), n'est pas identifiable, dans ce cas-ci, car le pK_a trouvé semble correspondre à celui du substrat accepteur et non à celui d'un résidu de l'enzyme. De plus, les valeurs de k_{cat} $990 \pm 80 \text{ s}^{-1}$ et de K_M $0.67 \pm 0.16 \text{ mM}$ obtenues pour la réaction enzymatique de la GGT à partir du GSH et de L-GlyGly à pH 8.0 ont également été obtenues pour la première fois. Ces données sont très importantes, car elles appartiennent au substrat naturel de la GGT. Cette méthode offre de nombreux avantages comparativement aux autres méthodes de détection, car elle est simple, sécuritaire et reproductible et surtout elle permet l'étude d'une multitude de substrat sans chromophores.

Cette méthode a ensuite permis d'étudier la réaction de transpeptidation de l'étape d'acylation de la GGT à partir de substrats donneurs de type L- γ -glutamylamides. À partir de ces substrats une courbe de Brønsted a montré que les substrats utilisés pouvaient possiblement se séparer en quatre catégories. Selon les graphiques obtenus, on peut faire l'hypothèse que le groupe partant des alkyl amines n'influence pas la vitesse de réaction à l'état de transition. La valeur des pentes observées étant

près de zéro laisse croire que l'azote du groupe partant à l'état de transition de l'étape limitante possède peu de charge développée. Donc, l'étape limitante est en fait l'attaque nucléophile de la GGT sur les substrats donneurs suivie d'une protonation rapide de l'amine provoquant l'expulsion du groupe partant amine et la formation de l'acyle-enzyme.

De plus, les études de Fukuyama laissent supposer qu'il n'y a pas seulement une corrélation avec la nucléofugativité du groupe partant durant l'acylation. Il semble que l'efficacité est en relation avec des interactions qui ne sont pas identifiables, mais qui sont en lien avec la structure et l'affinité du substrat et non seulement avec la basicité de l'amine partante. De plus, il a été remarqué que les substrats ayant un groupe partant similaire à Cys-Gly ont une vitesse de réaction plus élevée, ce qui ajoute du poids à l'importance de l'affinité entre le groupe partant et le site de liaison de cette partie du substrat donneur.

Finalement, la dernière partie du projet consistait à optimiser l'expression et la purification de la GGT humaine recombinante. En fait, cette nouvelle méthode permet d'obtenir la GGT humaine recombinante avec un rendement de 86 %, ce qui est un rendement supérieur en GGT comparativement à plusieurs méthodes retrouvées dans la littérature dont celle utilisée pour obtenir la GGT de reins de rat dans notre groupe qui offre un rendement de 52 %.³⁹ Cette méthode permet d'obtenir environ 1,3 mg d'enzyme par litre de culture, ce qui est obtenu habituellement avec une trentaine de reins de rat.

Rappelons que pour atteindre le but le plasmide pPICZ α A-hGGT Δ a été intégré dans les cellules de levures provenant de la souche de levure, X-33. L'expression à grande échelle selon une méthode déjà établie dans notre groupe a très bien fonctionné. Ensuite, le surnageant a été concentré avec un très bon rendement de 81 % grâce à un «Stirred cell» de Amicon. De plus, cette méthode est très simple et peu coûteuse. Elle donne un rendement meilleur que la concentration au sulfate d'ammonium et à l'acétone, deux méthodes grandement utilisées dans la littérature.

La purification à partir d'une matrice de Ni-NTA a également été réussie avec un rendement de 86 %. Pour favoriser la purification, lors de la concentration le milieu a été changé avec un tampon phosphate de potassium 0.1 M contenant 300 mM de NaCl et à pH 8.0. Cela a permis d'enlever plusieurs particules non désirées de ce milieu.

L'expression et la purification pour la GGT humaine recombinante permettra un plus grand nombre d'expériences entre autre à partir de la spectroscopie. Ces différentes études permettront encore une fois de mieux connaître cette enzyme présente au cœur de certains désordres physiologiques.

CHAPITRE 6
Partie expérimentale

6.1 Synthèse de substrats analogues

6.1.1 Matériel

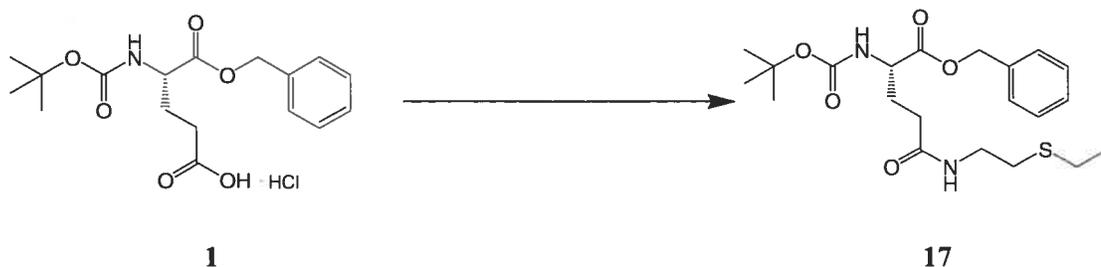
La synthèse des substrats a été réalisée à partir de produits provenant des compagnies Sigma-Aldrich et Novabiochem. Les solvants usuels ont tous été achetés chez VWR.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été obtenus sur quatre différents appareils soit un Bruker de type AMX-300 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz), AMX-400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), AV-300 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz) et AV-400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz). Les spectres de masse ont été réalisés par le centre de spectroscopie de masse de l'Université de Montréal, département de chimie. L'appareil utilisé est un ESI-TOF. L'appareil ayant permis la prise de point de fusion est de type Uni-melt Thomas-Hoover alors que les pouvoirs rotatoires spécifiques $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ sont mesurés à l'aide d'un polarimètre Perkin Elmer 241 à une longueur d'onde de 589 nm. La cellule utilisée a un volume de 1 mL et un parcours optique de 1 dm.

6.1.2 Méthode expérimentale

Procédure générale de couplage

N-Boc-L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide α -benzyl ester (**17**)



L'acide *N*-Boc-L-glutamique α -benzyle ester **1** (0,6 g, 1,78 mmoles, 1 éq.) est dissout dans l'acétonitrile anhydre, sous atmosphère inerte et à température ambiante. La diisopropyléthylamine (DIEA) (1,24 mL, 7,12 mmoles, 4 éq.) est ajoutée goutte à goutte. La réaction est agitée quelques minutes et la 2,2,2-trifluoroéthylamine HCl (380 mg, 2,67 mmoles, 1,5 éq.) est additionnée. Après dissolution de la 2,2,2-trifluoroéthylamine HCl, le *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tétrafluoroborate (TBTU) (1,14 g, 3,56 mmoles, 2 éq.) est ajouté et la réaction est laissée sous agitation pour la nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le solide est dissout dans l'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée avec de l'eau (2 \times 25 mL), avec une solution d'HCl 0,1 M (2 \times 25 mL), avec une solution 5 % NaHCO₃ (2 \times 25 mL) et pour terminer avec une solution saturée en NaCl (2 \times 25 mL). La phase organique est séchée par MgSO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Un solide beige **17** est obtenu (0,67 g, 88 %).

R_f : 0,23 (70/30 AcOEt/Hexane, révélateur : CAM)

p.f. (62-65 °C)

[α]_D : -1,5 (c : 0,01g/mL; CHCl₃)

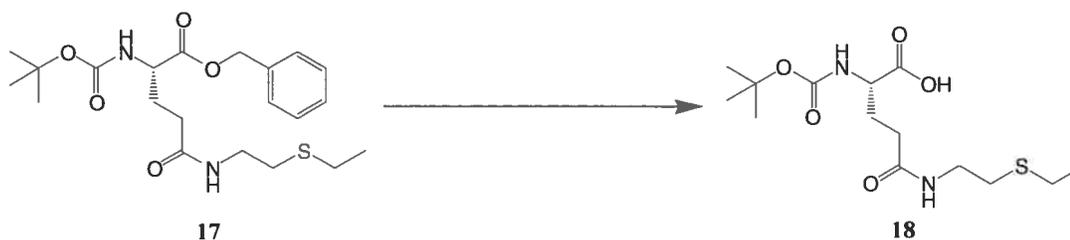
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1,23 (t, $J = 7,4$, 3H), 1,41 (s, 9H), 1,95-2,02 (m, 1H), 2,14-2,17 (m, 1H), 2,21-2,26 (m, 2H), 2,50 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,62 (t, $J = 6,6$ Hz 2H), 3,38 (q, $J = 6,3$ Hz, 2H), 4,31 (m, 1H), 5,13 (q, $J = 12,9$ Hz, 2H), 7,33 (m, 5H)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 15,1; 25,9; 28,7; 30,0; 31,5; 32,9; 39,0; 53,6; 60,8; 67,5; 78,0; 80,4; 128,9; 135,7; 156,2; 172,4; 172,6

SMHR (MAB, $\text{M}+\text{H}$) $^+$ 424,2032. $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ calculé 424,5560.

Procédure générale de déprotection du groupement Bn

***N*-Boc-L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide (18)**



Le *N*-Boc-L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide α -benzyl ester **17** (225 mg, 0,141 mmoles, 1 éq.) est dissout dans une mélange 1:1 H₂O/THF à 0 °C. Le K₂CO₃ (219 mg, 1,58 mmoles, 3 éq.) est ajouté au mélange réactionnel. La réaction s'effectue à 0 °C au départ et elle est laissée sous agitation durant la nuit à température ambiante. De l'eau est ajoutée et la réaction est agitée pour cinq autres heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est acidifiée avec du HCl 1 M et extraite à partir de 25 mL d'AcOEt. La phase organique est séchée par MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le composé est dissout dans de l'AcOEt et purifié par chromatographie «flash» (80 % AcOEt, 15 % Hexane, 5 % AcOH). Une gomme transparente est obtenue (107 mg, 61 %).

R_f : 0,55 (80/15/5 AcOEt/Hexane/AcOH, révélateur : ninhydrine)

[α]_D : 8,3 (c : 0,0029g/mL; CHCl₃)

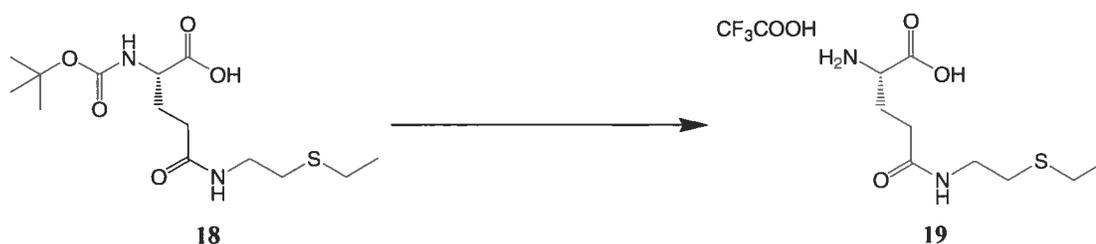
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,28 (t, *J* = 7,4, 3H), 1,46 (s, 9H), 2,04-2,17 (m, 1H), 2,19-2,22 (m, 1H), 2,44 (m, 1H), 2,57 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,70 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 3,48 (q, *J* = 6,1 Hz, 2H), 4,30 (m, 1H)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 15,2; 25,89; 28,75; 29,40; 30,59; 32,97; 39,20; 53,33; 80,68; 156,47; 173,96; 174,60

SMHR (MAB, M+H)⁺ 334.1562 C₁₄H₂₆N₂O₅S calculé 334.4354.

Procédure générale de déprotection du Boc

L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide (19)



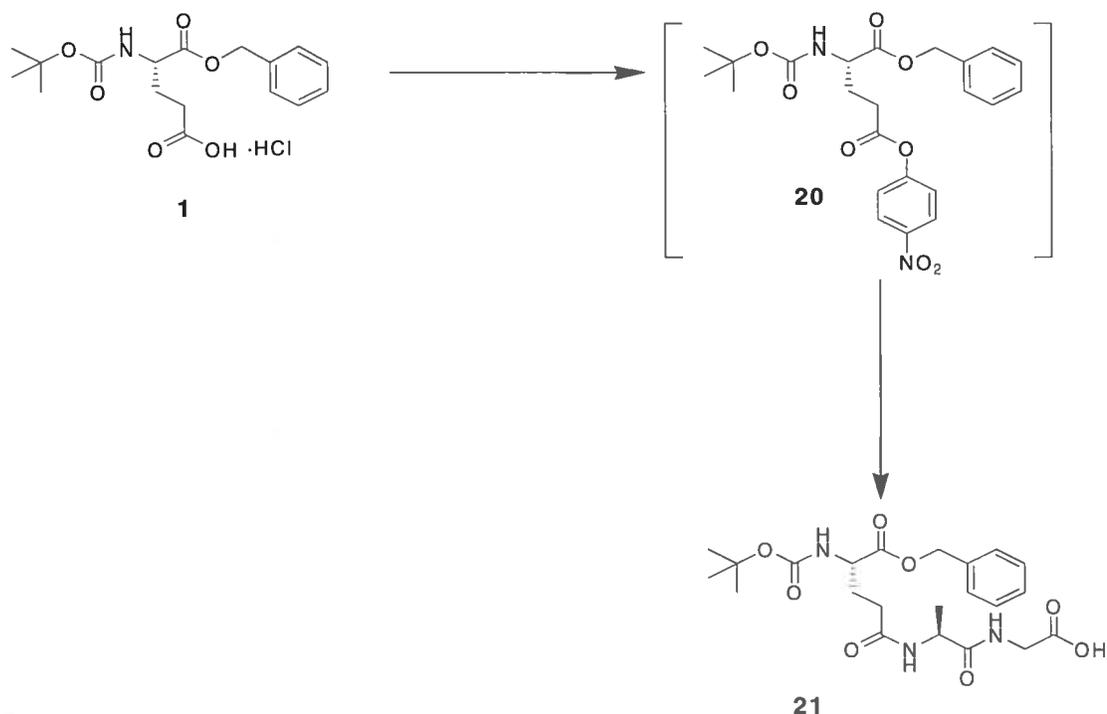
Le *N*-Boc-L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide **18** (38 mg, 0,11 mmoles, 1 éq.) est dissout dans du dichlorométhane (10 mL) . Le TFA (0,026 mL, 0,342 mmoles, 3 éq.) est additionné goutte à goutte à 0 °C, après 20 minutes le mélange réactionnel est laissé à température ambiante. Après 90 minutes, 3 éq. de TFA sont ajoutés goutte à goutte à 0 °C. Le mélange est agité et après 3,5 heures à température ambiante un autre 3 éq. sont additionnés de la même manière. La solution est agitée à température ambiante durant la nuit. Le cyclohexane mis en présence du composé est évaporé sous pression réduite et cette étape est refaite quatre fois consécutives. Le composé est dissout dans le CH₂Cl₂ et est purifié par élution en mettant d'abord 3-4 cm de silice sur la hauteur d'une colonne de chromatographie et des lavages rapides consécutifs de différents gradients de solvant (10 mL) permet la séparation du produit et des impuretés. (100 % hexane, 100 % AcOEt, 100 % CH₂Cl₂ , 90 % CH₂Cl₂/10 % MeOH, 80 % CH₂Cl₂/ 20 % MeOH, 70 % CH₂Cl₂/ 30 % MeOH, 60 % CH₂Cl₂/ 40 % MeOH, 50% CH₂Cl₂/ 50 % MeOH, 40 % CH₂Cl₂/60 % MeOH, 30 % CH₂Cl₂/ 70 % MeOH, 20 % CH₂Cl₂/ 80 % MeOH, 10 % CH₂Cl₂/ 90 % MeOH, 100 % MeOH). Un solide blanc obtenu est (23 mg, 54 %).

R_f : 0,56 (80/15/5 AcOEt/Hexane/AcOH, révélateur : ninhydrine)

RMN ^1H (300 MHz, D_2O) δ (ppm) : 1,20 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H), 2,09-2,14 (m, 2H), 2,37-2,42 (m, 2H), 2,56 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,69 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,39 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,74 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H)

RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ (ppm) : 14,20; 25,30; 26,78; 30,17; 31,84; 38,93; 54,46; 174,31; 174,99

SMHR (MAB, $\text{M}+\text{H}$) $^+$ 234,1038. $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ calculé 234,3222

Procédure générale de couplage***N*-Boc-L- γ -glutamyl-Ala-Gly α -benzyle ester (21)**

L'acide *N*-Boc-L-glutamique α -benzyle ester **1** (100 mg, 0,296 mmoles, 1 éq.) est dissous dans 4 mL d'acétonitrile anhydre, sous atmosphère inerte et à 0 °C. La triéthylamine (0,041 mL, 0,296 mmoles, 1 éq.) est ajoutée goutte à goutte suivi du chloroformate de *p*-nitrophényle (63 mg, 0,311 mmoles, 1,05 éq.). Après 5 minutes d'agitation, le 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (4 mg, 0,030 mmoles, 0,1 éq.) est additionné. Le composé **20** est obtenu après 45 minutes, mais n'est pas isolé.

L'excès de chloroformate de *p*-nitrophényle est hydrolysé en ajoutant 1 mL d'une solution préparée avec 4 mL d'eau et de triéthylamine (0,164 mL, 1,184, 4 éq.). La réaction est laissée environ 10 minutes avant le couplage. Ensuite, les 3 mL restant de la solution de triéthylamine sont ajoutés au composé L-Ala-Gly (173 mg, 1,184 mmoles, 4 éq.) et la solution est versée goutte à goutte au mélange réactionnel. La réaction est terminée après 2,5 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite et

purifié par chromatographie « flash » (85/10/5 AcOEt, MeOH, AcOH). Une gomme transparente est obtenue (66 mg, 54 %).

R_f : 0,48 (85/10/5 AcOEt/MeOH/AcOH, révélateur : ninhydrine)

$[\alpha]_D$: -4,2 (c : 0,005g/mL; CHCl₃)

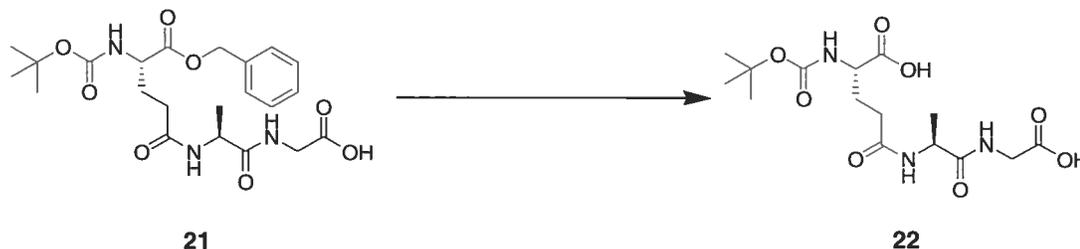
RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 1,34 (d, $J = 7,1$, 3H), 1,42 (s, 9H), 1,89-1,94 (m, 1H), 2,12-2,15 (m, 1H), 2,34 (m, 2H), 3,84 (s, 2H), 4,17 (m, 1H), 4,38 (m, 1H), 5,15 (q, $J = 12,5$, 2H), 7,30-7,36 (m, 5H)

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 17,02; 27,12; 27,73; 31,84; 49,34; 53,73; 66,93; 79,69; 128,22; 128,56; 136,24; 157,14; 172,86; 173,54; 174,31

SMHR (MAB, M+H)⁺ 465,2111. C₂₂H₃₁N₃O₈ calculé 465,4949

Procédure générale de déprotection du groupement Bn

N-Boc-L- γ -glutamyl-L-Ala-Gly (22)



Le *N*-Boc-L- γ -glutamyl-L-Ala-Gly α -benzyl ester **21** (63 mg, 0,151 mmoles) est dissout dans environ 5 mL MeOH. Du palladium sur carbone (10 wt. %) (6 mg) est ajouté au mélange réactionnel. La réaction est laissée sous agitation pour la nuit sous une pression de 150 psi d'hydrogène. La réaction terminée, le mélange réactionnel est filtré sur Célite et lavé avec du MeOH. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Une gomme blanche-transparent est obtenue (49 mg, 99 %).

R_f : 0,21 (85/10/5 AcOEt/MeOH/AcOH, révélateur : ninhydrine)

$[\alpha]_D$: -6,4 (c : 0,002g/mL; MeOH)

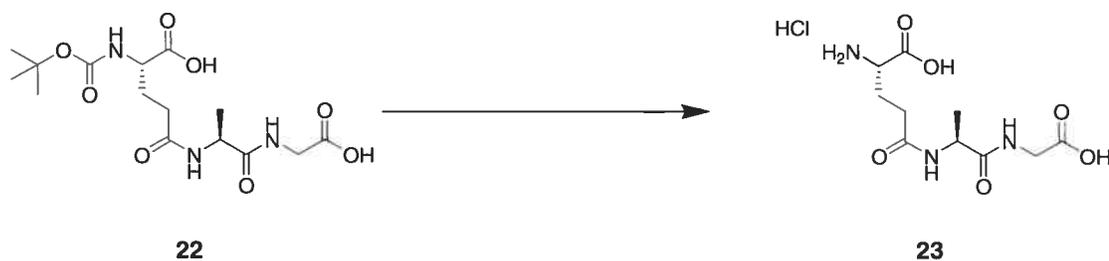
RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 1,36 (d, $J = 7,1$, 3H), 1,44 (s, 9H), 1,89-1,95 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 2,36 (m, 2H), 3,87 (s, 2H), 4,08 (m, 1H), 4,38 (q, $J = 7,1$, 1H)

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 16,95; 27,75; 27,85; 31,95; 41,53; 49,40; 53,94; 79,49; 156,99; 172,88; 173,93; 174,38; 175,58

SMHR (MAB, $\text{M}+\text{H}$) $^+$ 375,1642. $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8$ calculé 375,3775

Procédure générale de déprotection du groupement Boc

L- γ -glutamyl-L-Ala-Gly (23)



Le *N*-Boc-L- γ -glutamyl-L-Ala-Gly **22** (41 mg; 0,125 mmoles, 1 éq.) est dissous dans 15 mL dichlorométhane (CH₂Cl₂). Le TFA (0,127 mL, 0,752 mmoles, 6 éq.) est additionné goutte à goutte à 0 °C. Après 20 minutes, le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. La réaction est complète après 5 heures. Le cyclohexane en présence du composé est évaporé à quatre reprises sous pression réduite. Le composé est extrait par AcOEt/eau/HCl 1M (3 × 25 mL). La phase aqueuse est évaporée sous pression réduite. Une gomme jaune pâle est obtenue (31 mg, 80%).

R_f : 0,07 (80/15/5 AcOEt/Hexane/AcOH, révélateur : ninhydrine)

[α]_D : 18,4 (c : 0,01g/mL; CHCl₃)

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,05 (d, *J* = 7,9, 3H), 1,93-1,99 (m, 2H), 2,31 (t, *J* = 7,0, 2H), 3,89 (s, 2H), 3,96 (t, *J* = 7,1, 1H), 4,27 (q, *J* = 8,0, 1H)

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) δ (ppm) : 16,28; 16,85; 25,74; 31,11; 41,31; 50,04; 52,66; 173,42; 174,48; 176,12

SMHR (MAB, M+H)⁺ 275,1117. C₁₀H₁₇N₃O₆ calculé 275,2643.

6.2 Méthode par HPLC en phase inverse couplée à la dérivation chimique par le chlorure de dabsyle

6.2.1 Matériel

Le tampon Tris servant à normaliser l'activité de l'enzyme provient de chez Bio-Rad alors que les tampons HEPES, phosphate de potassium, phosphate de potassium dihydrogène, bicarbonate de sodium, CHES, MES et MOPS proviennent de chez Sigma-Aldrich. Le glutathion, la glutamine et le chlorure de dabsyle ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Le chlorure de dabsyle est recristallisé comme indiqué par Chang⁶³. Notamment, on dissout 1 g de chlorure de dabsyle dans 100 mL d'acétone chaud (qualité analytique 99,5%). La solution est filtrée afin d'enlever les particules insolubles et le filtrat est laissé pour la nuit à -20 °C, pour former les cristaux de chlorure de dabsyle. Suite à la filtration, les cristaux sont laissés une journée sous vide. Pour éviter la dégradation, des solutions fraîches de dabsyle et de glutamine doivent être préparées avant chaque utilisation. Toutes les solutions aqueuses sont préparées avec de l'eau purifiée et désionisée grâce à un appareil Milli-Q Biocell de Millipore. Tous les solvants pour le HPLC ainsi que l'acétone proviennent de chez VWR. Les solvants sont filtrés par des filtres (0,22 µM) de Millipore. Les échantillons sont préparés dans des micro-tubes (2 mL) avec couvercles vissables et filtrés par des filtres (0,22 µM) de chez Sarstedt. Pour l'injection automatique d'échantillon par le HPLC des «crimp vials» avec «clear snap-close lids» ont été achetés chez VWR.

L'ajustement du pH de chaque échantillon avant la dérivation s'est effectué par un pH-mètre Accumet modèle 15 et une électrode combinée MI-410 (microelectrodes, Inc.) alors que le pH des solutions tampons a été ajusté avec une électrode combinée constituée d'une électrode de référence Ag/AgCl de Fisher. Les centrifugations ont été faites par une centrifugeuse réfrigérée 5417 R d'Eppendorf. Les mesures d'absorbance lors des tests mesurant l'activité de l'enzyme se sont effectuées par le spectrophotomètre Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech.

Le modèle de HPLC utilisé est le Hitachi D-7000 HPLC, comprenant une pompe modèle L-7100, un système d'injection automatique modèle L-7200 et un détecteur de barrette de photodiode (modèle L-7450 A). La colonne utilisée provient de chez Chromabec et est de type phase inverse 5 μm Higgins C18 Targa C18 (250 \times 4,6 mm).

L'analyse des chromatogrammes est faite par le programme informatique « HPLC System Manager » et la régression non-linéaire (par exemple, les courbes de type Michaelis-Menten et la courbe pH-vitesse) a été réalisée avec le logiciel « Origin 6.0 ».

6.2.2 Méthode expérimentale

Courbe pH-vitesse

L'activité de l'enzyme est d'abord normalisée grâce à l'activité spécifique standard de la GGT, 837 U/mg³⁹. Le dosage de l'enzyme découle du protocole de Tate et Meister²⁶.

La progression de la réaction enzymatique du substrat GSH est suivie par la formation du produit de transpeptidation, L- γ -Glu-Gly-Gly. Un tube à essais est chargé avec le substrat donneur, glutathion avec différentes concentrations allant de 0,15 à 3,0 mM suivi de 0,50 mL d'une solution de glycylglycine de 0,1 M (concentration final 20 mM) et du tampon HEPES 0,1 M à pH 8,0 pour obtenir un volume final de 2,5 mL. Le tampon HEPES a été choisi, car il ne contient pas d'amine primaire qui réagirait avec le DABS-Cl lors de la dérivation. Dépendamment du pH de la réaction enzymatique différents tampons ont été utilisés, MES (pH 6,0), MOPS (pH 7,0), CHES (pH 8,5, pH 9,0, pH 9,5). Ensuite, la solution est pré-incubée pour 10 minutes à 37 °C et si le pH est changé, il est réajusté au pH désiré avant d'initier la réaction par l'ajout de 0,04 à 0,7 unités de GGT,

dépendamment du pH testé. Une portion de 195 μL est prélevée à différents temps entre 0 et 60 minutes et transférée dans un microtube pour centrifugeuse de 2 mL dans lequel se trouve 60 μL d'acide trichloroacétique 40 % pour arrêter la réaction enzymatique. L'enzyme est précipitée suite à une centrifugation à 10 000 rpm (10600 g) pour 5 min à 4 °C. Le surnageant est soutiré et placé dans un second microtube pour centrifugeuse de 2 mL. Un volume de 20 μL d'une solution mère de glutamine 50 mM dans du tampon de bicarbonate de sodium 0,2 M à pH 9,0 est ajouté comme étalon interne à chaque microtube contenant la réaction arrêtée. La dérivation s'effectue ensuite comme expliqué plus bas. Une régression linéaire de l'aire sous le pic de L- γ -Glu-Gly-Gly en fonction de temps est tracée afin d'établir la vitesse initiale pour la réaction enzymatique avec le GSH. Cette procédure est répétée à différentes concentrations de substrat pour déterminer les paramètres V_{max} et K_{M} provenant de la courbe Michaelis-Menten tracée par une régression non-linéaire. La valeur V_{max} est convertie en k_{cat} en divisant par la concentration de l'enzyme utilisée. La ligne de la courbe théorique pH-vitesse a été tracée par le logiciel «Origin 6.0» selon le modèle suivant :

$$k_{\text{cat}}^{\text{obs}} = \frac{k_{\text{cat}}}{\frac{[\text{H}^+]}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{[\text{H}^+]}}$$

L- γ glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide

Les paramètres cinétiques pour la réaction enzymatique entre la GGT et la L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide sont déterminés par cette même méthode. Les concentrations de substrats donneurs utilisées varient entre 0,1 à 3 mM et la quantité d'enzyme est de 0,6 unités. Le tampon utilisé est HEPES 0,1 M à pH 8,0.

L- γ glutamyl-L-Ala-Gly

Les paramètres cinétiques pour la réaction enzymatique entre la GGT et la L- γ -glutamyl-2-(éthylthio)éthylamide sont déterminés par cette même méthode. Les concentrations du substrat accepteur L-Ala-Gly utilisées varient entre 0,2 à 5 mM alors que la quantité du substrat donneur, GSH, est de 4 mM et celle de l'enzyme 0,5 unités. Le tampon utilisé est HEPES 0,1 M à pH 8,0.

Dérivation au chlorure de dabsyle

La procédure à suivre est basée sur la méthode publiée par Chang *et al.*⁶³ Tout d'abord, le pH de chaque échantillon doit être ajusté à $9,0 \pm 0,1$ avec du NaOH (Pour une meilleure dérivation, le pH ne doit pas s'éloigner de 9,0). Ensuite, un volume égal d'une solution fraîche de DABS-Cl 20 mM dissous dans l'acétone est ajouté. En fait, cela représente un excès deux fois plus grand DABS-Cl pour assurer une dérivation complète. Le mélange est alors chauffé à 70°C pour 10-15 min, pour assurer une solubilisation complète. Les microtubes pour centrifugeuse sont munis d'un couvercle vissable dans le but d'éviter toute évaporation, ce qui changerait la concentration du substrat donneur dans la solution. Sous ces conditions, la dérivation est complète et rapide. Finalement, un volume 1:1 (v/v) d'une solution de phosphate de sodium (pH 6,5) : éthanol est additionné pour diluer l'échantillon dérivé avant son analyse par HPLC. Le volume final est donc de 2 mL. Les échantillons sont alors stables à température ambiante pour plusieurs mois ou stables pour un an s'ils sont entreposés à -20°C .⁶⁷

Analyse par HPLC

Les différents composés du mélange sont séparés et analysés par HPLC selon une méthode publiée qui a été modifiée.⁶⁶ Les échantillons sont préparés à partir de la méthode expliquée plus haut. Ceux-ci sont analysés à l'aide d'une colonne en mode

inverse sur laquelle 40 μ L d'échantillon est injecté. La phase mobile permettant de séparer les composés dabsylés comprend deux solvants : le tampon dihydrogène phosphate de sodium (25 mM, pH 6,8, solvant A) et un mélange de 80:20 d'acétonitrile : 2-propanol (solvant B). Les conditions de séparation sont présentées dans le tableau ci-dessous. Il faut préciser que le débit de l'élution se fait à 1 mL/min et aussi à température ambiante.

Tableau V. Conditions chromatographiques utilisées pour obtenir une séparation complète

Temps (min)	Solvant A (%) (Tampon)	Solvant B (%) (acétonitrile: isopropanol) (80:20)	Solvant C (%) (eau)
0	80	20	0
1	80	20	0
7	75	25	0
20	75	25	0
45	60	40	0
50	65	35	0
52	0	0	100
67	0	0	100
70	0	100	0
85	0	100	0
90	0	0	100
105	0	0	100

Courbe de calibration, effet du temps et du pH sur la dérivation

Pour les courbes de calibration, le produit de la transpeptidation qui a été synthétisé est dissout dans le tampon bicarbonate de sodium 0,2 M (pH 9,0) selon la concentration désirée. Ensuite à 0,5 mL de cette solution est ajouté 20 μ L de glutamine provenant d'une solution mère ayant une concentration de 50 mM. Par la suite, 0,52 mL d'une solution fraîche de DABS-Cl ayant une concentration au moins deux fois plus grande que la solution du produit de transpeptidation sont ajoutés, ce qui permet d'obtenir un excès de DABS-Cl pour assurer la dérivation complète. Finalement, la solution est diluée par une solution (v/v) 1:1 de phosphate de sodium 40 mM (pH 6,5) : éthanol jusqu'à l'obtention d'un volume final de 2 mL. L'absorbance maximale pour ces espèces dabsylés est à 420 nm. Les deux courbes obtenues présentent une excellente linéarité. Pour le L- γ -Glu-Gly-Gly une pente de $1.69 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$ ($R^2 = 0,994$).⁵² Pour le L- γ -Glu-Ala-Gly, la méthode est la même sauf que la glutamine n'a pas été utilisée et les mesures ont été prises à partir de la hauteur des pics au lieu de l'aire. Donc, la pente obtenue est de $0,853 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$ ($R^2 = 0,999$).

Pour l'effet du temps sur la dérivation et celui du pH, la procédure est la même que pour les courbes de calibration. Cependant, l'analyte utilisé est la glutamine.

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

6.3.1 Matériel

Pour arriver à la transformation des cellules de levures X-33, le plasmide utilisé est le pVL1392-hGGT provenant du laboratoire du Pr. Taniguchi.⁹² Le plasmide pPICZ α A a été acheté chez la compagnie Invitrogen. Dr. Robert Lortie a permis d'obtenir les levures *P.pastoris* X-33 et KM-71 provenant de l'Institut de recherche en Biotechnologie (IRB-CNRC, Montréal).

Pour les réactions de PCR, les solutions proviennent de la compagnie New England Biolabs (NEB) alors que les amorces ont été conçues par AlphaDNA (Montréal). Les solutions pour la transformation (ADN de sperme de saumon) et l'isolation d'ADN (lyticase) ainsi que les « casamino acids » ont été achetés chez Sigma-Aldrich ou BioShop. Le « Gene Ruler DNA Ladder Mix » de Fermentas a permis de marquer les fragments d'ADN alors que le marqueur de poids moléculaire protéinique qui est coloré au sulfate de zinc provient de chez bio-Rad. Les milieux de culture ont été faits à partir de YPD, BMGY et BMMY achetés chez BioShop (Montréal). La matrice de Ni-NTA servant à la purification provient de chez QIAGEN. Les solutions servant pour les gels d'électrophorèse proviennent de la compagnie Bio-Rad.

Les mesures de densité optique ont été prises par le spectrophotomètre Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech alors que les tests d'activité ont été effectués avec un spectrophotomètre Cary 100 Bio (Varian). Pour les PCR l'appareil est PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Les centrifugeuses utilisées sont : la Sorvall RC 5C possédant un rotor Sorvall SS-34 et un rotor Sorvall SLA-3000 et la centrifugeuse Beckman GS-6R muni d'un rotor GS-3.8. Le département de biochimie de l'Université de Montréal a fourni l'appareil pour la prise des films.

Précédant l'étape de concentration, l'appareil servant à la filtration provient de chez Nalgène et permet une filtration sous vide. Les filtres utilisés sont des Whatman 541 circulaire de 47 mm de diamètre et 20-25 μm pour les pores. La concentration est réalisée par le Stricell Amicon fait par Millipore (et distribué par Fisher). La membrane de cellulose d'ultrafiltration a un diamètre de 76 mm avec une limite théorique de 10 000 Da.

6.3.2 Méthode expérimentale

6.3.2.1 Linéarisation du plasmide purifié, transformation des levures *P. pastoris*, purification de l'ADN génomique et vérification de l'intégration du gène

La linéarisation du plasmide pPICZ α A-*hGGT* Δ , la précipitation à l'acétate de sodium, la transformation des levures X-33 et KM-71 ainsi que la purification et la vérification de l'intégration du gène se sont effectuées par les mêmes méthodes que celle employées dans notre groupe.^{18, 88} La seule modification apportée concerne la concentration de l'antibiotique Zeocin. En plus, d'avoir étalé la solution de la transformation sur des pétris contenant un milieu de culture de YPD (le protocole indique sa composition⁸⁸) avec 100 μ g/mL de l'antibiotique Zeocin, la solution a également été mise sur des pétris contenant 500 μ g/mL de Zeocin. Rappelons que ces levures transformées n'ont pas été aussi efficaces que celle préalablement obtenue par la souche X-33 (100 μ g/mL Zeocin). Donc, pour l'expression de la GGT, les cellules X-33 transformées et étalées sur des pétris contenant 100 μ g/mL de Zeocin ont servies pour la suite.

6.3.2.2 Expression à grande échelle de la GGT dans *P.pastoris*

Les solutions et la vaisselle doivent être stériles pour ces manipulations.

Pré-culture des levures : Des cellules fraîches sur un milieu solide de YPD ne contenant pas d'antibiotique Zeocin sont utilisées pour inoculer un tube de pré-culture contenant 5 mL de BMGY (la littérature donne sa composition,⁸⁸ cependant, le pH du tampon 100 mM phosphate de potassium est de 7,0 au lieu de 6,0. Les tubes sont incubés pour la nuit à 30 °C et sous agitation.

Culture des levures : Le lendemain après-midi, les 5 mL de la pré-culture sont transférés dans un erlenmeyer en Nalgène stérile avec des baffles contenant 1000 mL

du milieu BMGY. La culture est laissée encore sous agitation et à 30 °C pour deux jours et demi.

Induction de la GGT : Après deux jours et demi, la densité optique de la culture de 1000 mL est aux alentours de 10 à 600 nm. Pour mesurer la densité optique, une dilution 10 X de la solution doit être faite avec de l'eau directement dans la cuvette à spectrophotométrie. Pour induire la GGT, le milieu doit être changé. Donc, une centrifugation est effectuée, la culture est séparée dans trois bouteilles stérilisées à l'autoclave de 500 mL de Nalgène prévues pour cet effet. La centrifugation est faite à température ambiante, à 2500 rpm durant environ 30 minutes par la centrifugeuse Sorvall RC 5C possédant un rotor Sorvall SLA-3000.

Le surnageant est enlevé alors que les culots sont resuspendus dans un milieu BMMY (la composition se retrouve dans la littérature⁸⁸ et le pH du tampon 100mM phosphate de potassium est aussi de 7,0 au lieu de 6,0). Les culots resuspendus sont ensuite transférés dans un autre erlenmeyer stérile et en Nalgène contenant des baffles. Le milieu BMMY est ajouté jusqu'à ce que la densité optique du milieu à 600 nm soit environ de 15 (ce qui fait environ 700 mL de BMMY à la fin). Ensuite, une solution fraîche de «casamino acids» stérilisée sur des filtres de 0,22 µm est ajoutée de façon à obtenir une concentration finale de 1 % par volume. Le tout est ensuite laissé sous agitation à 30 °C durant environ 96 heures. Cependant, à chaque jour, 1 % par volume de méthanol stérilisé sur filtre de 0,22 µm est ajouté pour garder ce pourcentage constant durant les cinq jours d'induction.

Après les 96 heures, les levures sont centrifugées en séparant la solution dans deux bouteilles de Nalgène de 500 mL et qui ne sont pas stériles. La centrifugation est aussi effectuée à température ambiante, à 2500 rpm durant 30 minutes. Le surnageant est conservé puisque la GGT est sécrétée et les levures peuvent être jetées. Le surnageant est laissé à -80 °C jusqu'au moment de la concentration.

6.3.2.3 Test d'activité et de concentration

La procédure pour les tests d'activité est retrouvée dans la littérature,³² le substrat accepteur utilisé est le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide et le substrat accepteur est la glycyglycine. Les tests de concentration suivent la méthode de Bradford⁹⁷.

6.3.2.4 Concentration du surnageant

La veille de la concentration, une bouteille contenant environ 350 mL de surnageant est sortie du congélateur, à -80 °C. La bouteille est laissée pour la nuit dans le réfrigérateur à 4 °C. Le surnageant doit être le moins possible laissé à température ambiante.

Filtration : Pour éviter que les grosses particules bouchent la membrane de cellulose lors de la concentration, il faut d'abord filtrer le surnageant sous vide dans la chambre froide à 4 °C. L'appareil servant à la filtration provient de chez Nalgène. Les filtres utilisés sont des Whatman 541 circulaire de 47 mm de diamètre et 20-25 μ m pour les pores

Préparation de la membrane de cellulose : La membrane doit tremper dans l'eau déionisée pendant 10 minutes. L'appareil est assemblé et la membrane est installée en mettant le côté lustré vers le haut. La membrane est ensuite testée en appliquant graduellement une pression allant au maximum à 50 psi lorsqu'il y a 250 mL d'eau dans l'appareil sous agitation. Le débit sortant doit se faire goutte à goutte et le tourbillon provoqué par l'agitation doit se trouver au tiers du volume total. Ces observations confirment que la membrane n'est pas trouée.

Concentration : Le filtrat est ensuite transféré en entier dans le «Stirred cell», ce dernier ne peut contenir plus de 400 mL. Le surnageant est filtré sous une pression de 40 psi et toujours en étant agité à 4 °C. Le tourbillon créé doit toujours rester près du tiers du volume total. Au moment où il ne reste que 50 mL de surnageant, 100 mL

de tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH 8,0 avec 300mM de NaCl est ajouté. Cela est répété au moins deux autres fois afin d'enlever le plus possible de protéines indésirables et favoriser la purification de la GGT. Enfin, lorsqu'il ne reste qu'environ 35 mL la concentration est arrêtée.

Purification de la GGT : Un volume de 1,0 mL de la matrice de la colonne Ni-NTA est placé dans deux tubes eppendorfs, ceux-ci sont centrifugés à 3000 rpm dans une micro-centrifugeuse à 4 °C durant une minute. Ensuite, le surnageant est retiré et la résine est resuspendue dans un volume de 800 µL de tampon de lavage (0,1 M phosphate de potassium pH 8,0). Les tubes sont de nouveau centrifugés. Ces étapes sont reprises deux autres fois. Au dernier lavage, la matrice contenue dans les deux tubes est transférée dans un tube falcon de 50 mL contenant déjà le surnageant concentré à l'étape précédente. Laisser agiter par basculement la matrice et le surnageant environ 45 minutes à 4 °C. Ensuite, le mélange est placé dans une petite colonne de plastique où la matrice se dépose au fond. Le milieu non fixé est ensuite égoutté avec un débit d'environ 1 mL par minute. Par la suite, différents lavages sont effectués avec des solutions de tampon de lavage contenant 5 et 10 mM d'imidazole. L'élution est effectuée avec un tampon d'élution (0,1 M phosphate de potassium pH 7,4) contenant 250 mM d'imidazole. Des aliquotes sont prélevés à chaque étape et sont analysés par des tests d'activité et de concentration.

Gel d'électrophorèse : Le protocole pour les gels d'électrophorèse se trouve dans la littérature.⁹⁸ Le gel de séparation possède une concentration de 10 % en acrylamide alors que le gel de concentration des protéines a une concentration de 4 %. Sur le gel, les échantillons (environ 20 µL) et un marqueur de poids moléculaire y sont placés. Dans un premier temps, la migration se fait à 80 V et quand les protéines atteignent le gel de séparation, le voltage est augmenté à 120 V. La révélation du gel est permise par le sulfate de zinc et l'imidazole.^{18, 99} Dans 50 mL d'eau sont ajoutés 0,680 g d'imidazole et un mL de SDS 10 %. Le gel est donc placé dans cette solution sous agitation pour une période de sept minutes. À ce moment, le gel d'électrophorèse est rincé rapidement avec de l'eau désionisée. Ensuite, il est mis en contact avec une

solution de 0,2 M sulfate de zinc où il est agité jusqu'à ce que les bandes de protéines apparaissent. Finalement, le gel est rincé avec de l'eau désionisée.

RÉFÉRENCES

- ¹ Voet, D., Voet, J.G., *Biochemistry*, John Wiley and Sons Inc, New York, **1995**.
- ² Kinne-Saffran, E., Kinne, R.K., *Am. J. Nephrol.* **1999** ; *19*, 290-294.
- ³ Thuriaux, P., *medecine/sciences* **1998**, *14*, 248-251.
- ⁴ Somorjai, G.A., *Catalysis letters* **2000**, *67*, 1-4.
- ⁵ Singer, M., Berg, P., *Nature reviews genetics* **2004**, *5*, 949-954.
- ⁶ Raju, N.T., *The Lancet* **1999**, *354*, 434
- ⁷ Szybalski, W., Skalka, A., *Gene* **1978**, *4*, 181-278.
- ⁸ Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., *Science* **1985**, *230*, 1350-1354.
- ⁹ Tate, S.S., Meister, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 2599-2603.
- ¹⁰ Taniguchi, N., Ikeda, Y., *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* **1998**, *72*, 239-278.
- ¹¹ Kuno, T., Matsuda, Y., Katunuma, N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1983**, *114*, 889-895.
- ¹² Kuno, T., Matsuda, Y., Katunuma, N., *Biochem. Int.* **1984**, *8*, 581-588.
- ¹³ Suzuki, H., Kumagai, H., Tochikura, T., *J. Bacteriol.* **1986**, *168*, 1325-1331.
- ¹⁴ Takahashi, H., Hirose, K., Watanabe, H., *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 244-247.
- ¹⁵ Mehdi, K., Thierie, J., Penninckx, M.J., *Biochem. J.* **2001**, *359*, 631-637.
- ¹⁶ Martin, M.N., Slovin, J.P., *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 1417-1426.
- ¹⁷ Lherbet, C. «Synthèse et études cinétiques de substrats analogues et d'inhibiteurs de l'étape d'acylation de la γ -glutamyl transpeptidase» *Thèse U. de Montréal*, **2004**, 275 pages.
- ¹⁸ Castonguay, R. «Études cinétiques de la γ -glutamyltranspeptidase purifiée de reins de rat et recombinante humaine provenant des levures *Pichia pastoris*» *Thèse U. de Montréal*, **2004**, 242 pages.
- ¹⁹ Tate, S.S., Meister, A., *Mol. Cell. Biochem.* **1981**, *39*, 357-368.

-
- ²⁰ Tate, S.S., Ross, L.L., Meister, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 1447-1449.
- ²¹ Nemesansky, E., Lott, J.A., *Clin Chem.* **1985**, *31*, 797-803.
- ²² Novogrodsky, A., Tate, S.S., Meister, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 2414-2418.
- ²³ Okada, T., Suzuki, H., Wada, K., Kumagai, H., Fukuyama, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, *103*, 6471-6476.
- ²⁴ Meister, A., *Science* **1973**, *180*, 33-39.
- ²⁵ Meister, A., *Ann. Int. Med.* **1974**, *81*, 247-253.
- ²⁶ Misicka, A., Maszczyńska, I., Lipkowski, A.W., Stropova, D., Yamamura, H.I., Hruby, V.J. *Life Sci.* **1996**, *58*, 905-911.
- ²⁷ Magnan, S.D.J., Shirota, F.N., Nagasawa, H.T. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 1018-1021.
- ²⁸ Anderson, M.E., Allison, R.D., Meister, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 1088-1091.
- ²⁹ Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A. J., Daniel, S., Jenner, P., Marsden, C.D., *Ann. Neurol.* **1994**, *36*, 356-361.
- ³⁰ Goswin, A.K., Meister, A., O'Dwyer, P.J., Huang, C.S., Hamilton, T.C., Anderson, M.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3070-3074.
- ³¹ Del Bello, B., Paolicchi, A., Comporti, M., Pompella, A., Maellaro, E., *FASEB J.* **1999**, *13*, 69-79.
- ³² Tate, S.S., Meister, A., *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 400-419.
- ³³ Allison, R.D., *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 419-437.
- ³⁴ Allison, R.D., *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 2988-2992.
- ³⁵ Thompson, G.A., Meister, A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1976**, *71*, 32-36.
- ³⁶ Keillor, J.W., Ménard, A., Castonguay, R., Lherbet, C., Rivard C., *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, *17*, 529-536.

-
- ³⁷ Orłowski, M., Meister, A., *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *73*, 679-681.
- ³⁸ Meister, A., Tate, S.S., Griffith, O.W., *Methods Enzymol.* **1981**, *77*, 237-253.
- ³⁹ Ménard, A., Castonguay, R., Lherbet, C., Rivard, C., Roupioz, Y., Keillor, J.W., *Biochemistry* **2001**, *40*, 12678-12685.
- ⁴⁰ White, I.N.H., Razvi, N., Lawrence, R. M., Manson, M.M., *Anal. Biochem.* **1996**, *233*, 71-75.
- ⁴¹ Laursen, T., Jacyszyn, K., *Clin. Chim. Acta* **1968**, *21*, 497-499.
- ⁴² Griffith, O.W., Meister, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 3330-3334.
- ⁴³ Castonguay, R., Lherbet, C., Keillor, J.W., *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 4185-4191.
- ⁴⁴ Orłowski, M., Meister, A. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 338-347.
- ⁴⁵ Thompson, G.A., Meister, A., *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 6792-6798.
- ⁴⁶ Castonguay, R., Lherbet, C., Keillor, J.W. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11504-11513.
- ⁴⁷ Elce, J.S., Broxmeyer, B. *Biochem. J.* **1976**, *153*, 223-232.
- ⁴⁸ Lherbet, C., Morin, M., Castonguay, R., Keillor, J.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 997-1000.
- ⁴⁹ Kumagai, H., Nohara, S., Suzuki, H., Hashimoto, W., Yamamoto, K., Sakai, H., Sakabe, K., Fukuyama, K., Sakabe, N. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 1259-1262.
- ⁵⁰ Sakai, H., Sakabe, N., Sasaki, K., Hashimoto, W., Suzuki, H., Tachi, H., Kumagai, H., Sakabe, K., *J. Biochem.* **1996**, *120*, 26-28.
- ⁵¹ Ikeda, Y., Funjii, J., Taniguchi, N., Meister, A., *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 12471-12475.
- ⁵² Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3980-3985.
- ⁵³ Tate, S.S., Meister, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 931-935.
- ⁵⁴ Stole, E., Seddon, A.P., Wellner, D., Meister, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1706-1709.

-
- ⁵⁵ Inoue, M., Horiuchi, S., Morino Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1978**, *82*, 1183-1188.
- ⁵⁶ Inoue, M., Hiratake, J., Suzuki, H., Kumagai, H., Sakata, K., *Biochemistry* **2000**, *39*, 7764-7771.
- ⁵⁷ Yoon, J., Oh, B., Kim, K., Park, J., Han, D., Kim, K.K., Cha, S.-S., Lee, D., Kim, Y. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 341-347.
- ⁵⁸ Rivard, C. «Études cinétiques par HPLC de l'étape d'acylation de la γ -glutamyl transpeptidase purifiée de reins de rats à l'aide de substrats analogues» *Mémoire U. de Montréal*, **2003**, 86 pages.
- ⁵⁹ Cook, N.D., Peters, T.J. *Biochim. Biophys Acta* **1985**, *832*, 142-147.
- ⁶⁰ Kiuchi, K., Nagatsu, T., Togari, A., Kumagai, H., *J. Chromatogr.* **1986**, *357*, 191-198.
- ⁶¹ Vendrell, J., Avilés, F.X., *J. Chromatogr.* **1986**, *358*, 401-413.
- ⁶² Cook, N.D., Peters T.J. *Biochem.Soc. Trans.* **1985**, *13*, 1226-1227.
- ⁶³ Chang, J.-Y., Knecht, R., Braun, D.G., *Methods Enzymol.* **1983**, *91*, 41-48.
- ⁶⁴ Joseph, M.H., Davies, P., *J. Chromatogr.* **1983**, *277*, 125-136.
- ⁶⁵ Einarsson, S., Folestad, S., Josefsson, B., Lagerkvist, S., *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1638-1643.
- ⁶⁶ Stocchi, V., Cucchiaroni, L., Piccoli, G., Magnani, M., *J. Chromatogr.* **1985**, *349*, 77-82.
- ⁶⁷ Chang, J.-Y., Knecht, R., Braun, D.G., *Biochem. J.* **1982**, *203*, 803-806.
- ⁶⁸ Lin, J.-K., Wang, C.-H., *Clin. Chem.* **1980**, *26*, 579-583.
- ⁶⁹ Gravel, C., «Utilisation d'analogues hétéatomiques de la glutamine dans l'étude mécanistique de la Transglutaminase» *Thèse U. de Montréal* **2005**, p.183.
- ⁷⁰ Gagnon, P., Huang, X. Therrien, E. Keillor, J.W. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7717-7719.
- ⁷¹ Tate, S.S., Meister, A. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7593-7602.

-
- ⁷² Castonguay, R., «Études cinétiques des réactions catalysées par la γ -glutamyl transpeptidase purifiée de reins de rats» *Mémoire U. de Montréal* **2000**, p.91.
- ⁷³ Elamin, B., Anantharamaiah, G.M., Royer, G.P., Means, G.E., *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3442-3444.
- ⁷⁴ Abdelmoty, I., Alberico, F., Carpino, L.A., Foxman, B., Kates, S. A., *Lett. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 57-60.
- ⁷⁵ Halab, L., Lubell, W. D., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3312-3321.
- ⁷⁶ Tsuji, T., Kataoka, T., Yoshioka, M., Sendo, Y., Nishitani, Y., Hirai, S., Maeda, T., Nagata, W., *Tetrahedron Lett.* **1979**, 2793.
- ⁷⁷ Fujii, N., Otaka, A., Ikemura, O., Akaji, K., Funakoshi, S., Hayashi, Y., Kurada, Y., Yajima, H. *J. Chem. Soc.* **1987**, 274-275.
- ⁷⁸ Huffman, H.F., Hall, R.F., Grant, J.A. Holden, K.G. *J. Med. Chem.* **1978**, *5*, 413-
- ⁷⁹ Chauvel, E.N., Coric, P., Llorens-Cortès, C., Wilk, S., Roques, B. P., Fournié-Zaluski, M.-C., *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1339-1346.
- ⁸⁰ Cook, N.D., Upperton, K.P., Challisand, B.C., Peters, T.J. *Biophys. Acta* **1987**, *914*, 240-245.
- ⁸¹ Leblanc, A., Gravel, C., Lebel, J., Keillor, J.W. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8335-8342.
- ⁸² Malathi, P., Preiser, H., Fairclough, P., Mallett, P., Crane, R.K. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *554*, 259-263.
- ⁸³ Jaspers, C.J., Penninckx, M.J., *Biochimie* **1984**, *66*, 71-74.
- ⁸⁴ Visvikis, A., Thiouellet, C., Oster, T., Fournel-Gigleux, S., Wellman, M., Siest, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7361-7365.
- ⁸⁵ Thiouellet, C., Oster, T., Wellman, M., Siest, G., *Eur. J. Biochem.* **1994**, *222*, 1009-1016.
- ⁸⁶ Sastre, J., Siegrist, S., Bulle, F., Asensi, M., Baik, J.-H., Pawlak, A., Guellaen, G. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, *38*, 801-811.
- ⁸⁷ Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E, Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. «*Current Protocols in Molecular Biology*» John Wiley & Sons, New York, **1997**, 16.9.1-16.11.12.

-
- ⁸⁸ Livre d'instruction de la compagnie Invitrogen « *Pichia Expression Kit : Protein Expression* », version F.
- ⁸⁹ Gunji, H., Kochi, H., Hiraiwa, K. *Fukushima J. Med. Sci.* **1994**, *40*, 119-132.
- ⁹⁰ Cregg, J.M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y., Madden, K.R. *Mol. Cell. Biol.* **1985**, *5*, 3376-3385.
- ⁹¹ Livre d'instruction de la compagnie Invitrogen « *Pichia Expression Kit : Protein Expression* », version E.
- ⁹² Ikeda, Y., Fujii, J., Tanaguchi, N., Meister, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 126-130.
- ⁹³ Higgings, D.R., Cregg, J.M. « *Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols* » Humana Press Inc., Totowa, Vol. 103, **1998**, 261 pages.
- ⁹⁴ Scopes, R.K. « *Protein Purification; Principles and Practice* », Springer-Verlag, New York, 2^e édition, **1987**, 329 pages.
- ⁹⁵ [http:// www.millipore.com](http://www.millipore.com) (novembre 2006)
- ⁹⁶ Livre d'instruction de la compagnie QIAGEN, « *The QIAexpressionist* », 4^e édition, **2000**.
- ⁹⁷ Livre de référence de BioRad « *BioRad Protein Assay* ».
- ⁹⁸ Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. « *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* » Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2^e édition, **1989**, p. 9.8-9.49, 14.1-14.33.
- ⁹⁹ Fernandez-Patron, C., Hardy, E., Sosa, A., Seoane, J., Castellanos, L. *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 263-269.