

2m1102826.8

Université de Montréal

Développement d'une Nouvelle Méthode de Synthèse Peptidique
et Études d'affinités d'une transglutaminase
avec de Nouveaux Substrats Fabriqués à l'Aide de cette Méthode

par :

Paul Gagnon

Département de chimie

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en chimie
(Août 2000)

© Paul Gagnon, 2000



QD

3

154

2001

15,009

Université de Montréal
Faculté de études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Développement d'une Nouvelle Méthode de Synthèses Peptidique
et Études d'affinités d'une transglutaminase
avec de Nouveaux Substrats Fabriqués à l'Aide de cette Méthode

présenté par :
Paul Gagnon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. William Lubell	président-rapporteur
Dr. Jeffrey Keillor	directeur de recherche
Dr. Joelle Pelletier	examineur externe

Mémoire accepté le :

Sommaire

Le présent mémoire comprend deux parties principales. La première partie traite du développement d'une nouvelle méthode de synthèse. La deuxième partie, quant à elle, traite de l'évaluation de nouveaux substrats peptidiques pour une enzyme, la TGase extraite de foie de cochon d'Inde (EC 2.3.2.13). Ces nouveaux substrats furent synthétisés à l'aide de la nouvelle méthode de synthèse présentée dans la première partie.

Un nombre important de procédures de synthèses peptidiques sont répertoriées à ce jour¹⁻⁴. Certaines sont des méthodes de synthèse sur support solide et d'autres sont des méthodes dites classiques ou en solution. Dans le présent mémoire nous présentons une nouvelle méthode de synthèse classique qui s'inspire de modifications et d'améliorations de méthodes décrites dans la littérature^{5;6}. Notre méthode se démarque généralement par sa simplicité et son efficacité. Cette méthode utilisant le chloroformate de p-nitrophényle comme agent activant ne nécessite pas d'isolation de l'intermédiaire activé. Les nouveaux acides aminés ajoutés n'ont généralement pas à être protégé et le composé final est facilement isolé par précipitation en milieu acide.

Notre méthode s'est avérée très efficace pour synthétiser rapidement certains dipeptides, tripeptides et des substrats pour une enzyme TGase. Cette méthode est donc un outil de plus pour la synthèse peptidique. Dans certains cas, notre méthode s'est avérée plus efficace que certaines méthodes bien connues dans la littérature.

La deuxième partie du mémoire consiste à évaluer les nouveaux substrats synthétisés. Bon nombre de substrats pour la TGase extraite de foie de cochon d'Inde furent essayés au fil des ans⁷. La littérature les rapporte de façon pêle-mêle et laisse croire à la possibilité de trouver d'autres peptides simples qui pourraient présenter de meilleures réactivités que le principal substrat de référence, avec l'enzyme, la Cbz-L-Gln-Gly.

Des cinétiques sont faites avec l'enzyme extraite de foie de cochon d'Inde et les substrats. Les valeurs de K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m sont tirées de ces cinétiques et sont utilisées

pour comparer l'affinité enzyme-substrat des nouveaux substrats au composé de référence Cbz-L-Gln-Gly.

Aucun des substrats synthétisés n'a démontré, à notre déception, une meilleure affinité que celle du composé de référence. Par contre, les résultats nous ont permis de faire plus de lumière sur l'affinité de la TGase de foie de cochon d'Inde.

Table des matières

SOMMAIRE.....	I
TABLE DES MATIÈRES.....	III
Liste des figures	VII
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des abréviations	X
DÉDICACE.....	XI
1.....	13
1.1 QUELQUES ÉLÉMENTS HISTORIQUES SUR LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.....	13
1.1.1 <i>Les débuts de la chimie peptidique</i>	13
1.1.2 <i>La chimie peptidique moderne</i>	14
1.2 LES BASES DES COUPLAGES PEPTIDIQUES	14
1.2.1 <i>Idées générales des couplages peptidiques</i>	14
1.3 LES ESTERS ACTIVÉS	15
1.3.1 <i>Les premiers esters activés utilisés en synthèse peptidique</i>	15
1.3.2 <i>Les esters développés par Bodanszky</i>	16
2.....	18
2.1 QUELQUES MÉTHODES DE SYNTHÈSES PEPTIDIQUES EN SOLUTION	18
2.1.1 <i>La méthode au dicyclohexylcarbodiimide (DCC)</i>	18
2.1.2 <i>La méthode à l'aide du fluoroborate de 7-Hydroxy-2-éthylbenzoxazolium</i> ¹⁸	
21	
2.2 LES ESTERS ACTIVÉS	22

2.2.1	<i>La méthode développée par Bodanszky pour l'utilisation des esters p-nitrophényles en synthèse peptidique</i>	22
2.2.2	<i>Autres façons de préparer les esters activés de p-nitrophényle</i>	24
2.2.3	<i>Les esters de fluorophényles</i>	26
3	28
3.1	DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE DE SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.....	28
3.1.1	<i>Les premiers essais</i>	28
3.1.2	<i>Amélioration de la méthode à partir des résultats de Sunggak</i>	29
3.1.3	<i>Essais de différents solvants</i>	30
3.1.4	<i>Essais de groupes protecteurs</i>	30
3.2	DESCRIPTION GÉNÉRALE DE LA MÉTHODE DE SYNTHÈSE.....	31
3.2.1	<i>Description de la méthode</i>	31
4	33
4.1	LES POSSIBILITÉS ET LIMITATIONS DE LA MÉTHODE	33
4.1.1	<i>Les possibilités de la méthode</i>	33
4.1.2	<i>Les limitations de la méthode</i>	34
4.2	COMPARAISON DE LA MÉTHODE.....	36
4.2.1	<i>Discussion et comparaison avec d'autres méthodes</i>	36
4.3	CONCLUSION.....	39
4.3.1	<i>Présent</i>	39
4.3.2	<i>Futur</i>	40
5	PARTIE EXPÉRIMENTALE	41
5.1	PROTOCOLE GÉNÉRAL DE SYNTHÈSE:	41
5.2	SYNTHÈSES SUIVANT LE PROTOCOLE GÉNÉRALE (ÉTAPES A ET C) AVEC PRODUITS FINAUX QUI PRÉCIPITENT.....	42
5.3	SYNTHÈSES SUIVANT LE PROTOCOLE GÉNÉRAL AVEC ÉTAPE A, B ET C AVEC PRODUITS FINAUX QUI PRÉCIPITENT	44
5.4	SYNTHÈSE SUIVANT LE PROTOCOLE GÉNÉRAL AVEC ÉTAPE A, B ET C AVEC PRODUITS FIANUX QUI NE PRÉCIPITENT PAS.....	49

5.5 AUTRES SYNTHÈSES ANALOGUES AU PROTOCOLE GÉNÉRAL AVEC DE LÉGÈRES MODIFICATIONS	52
6.....	59
6.1 HISTORIQUE SUR L'ENZYMOLOGIE.....	59
6.1.1 <i>Les enzymes dans l'Antiquité</i>	59
6.1.2 <i>Les premières études plus systématiques</i>	60
6.1.3 <i>La découverte des enzymes en tant qu'unité réactive et isolable</i>	60
6.1.4 <i>De plus en plus de possibilités</i>	62
7.....	63
7.1 LES TRANSGLUTAMINASES.....	63
7.1.1 <i>Informations générales</i>	63
7.2 TGASES DE FOIE DE COCHON D'INDE FACTEUR XIIIa ET AUTRES TGASES DU CORPS HUMAIN.....	64
7.2.1 <i>Analogies</i>	64
7.2.2 <i>Différences entre les TGases</i>	65
7.3 LES ÉTUDES DE SUBSTRATS.....	66
7.3.1 <i>Idées de base</i>	66
7.3.2 <i>L'affinité TGase de foie de cochon d'Inde-substrat</i>	67
7.3.3 <i>Études parallèle Facteur XIIIa et TGase du foie de cochon d'Inde</i>	73
8.....	78
8.1 OBTENTION DES RÉSULTATS.....	78
8.1.1 <i>La méthode utilisée pour déterminer les constantes cinétiques</i>	78
8.1.2 <i>Définition des constantes étudiées</i>	80
8.2 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	81
8.2.1 <i>Détails sur la méthode d'obtention des valeurs cinétiques</i>	81
8.2.2 <i>Interprétation des valeurs cinétiques</i>	82
8.3 CONCLUSION.....	86
8.3.1 <i>À court terme</i>	86
8.3.2 <i>À long terme</i>	87

9	88
9.1 PRÉPARATION DES SOLUTIONS	88
9.2 L'ENZYME	88
9.2.1 <i>Les solutions préparées à l'avance</i>	88
9.2.2 <i>Les solutions préparées quotidiennement</i>	89
9.3 LES CINÉTIQUES ET L'ANALYSE DES RÉSULTATS	90
9.3.1 <i>Les conditions expérimentales</i>	90
9.3.2 <i>Analyse des données expérimentales</i>	91
10	94
10.1 DÉTAILS DES CONDITIONS DES CINÉTIQUES	94
11	98
11.1 DESCRIPTION MATHÉMATIQUE DE L'OBTENTION DES RÉSULTATS	98
LISTE DES RÉFÉRENCES	100
REMERCIEMENTS	105

Liste des figures

Figure 1.1) Schéma général d'activation et couplage peptidique ¹	15
Figure 1.2) Quelques esters activés utilisés en synthèse peptidique ¹	16
Figure 2.1) Mécanisme général au DCC/HOBt ¹	20
Figure 2.2) Méthode avec le fluoroborate de 7-Hydroxy-2-éthylbenzoxazolium ¹⁹	21
Figure 2.3) Méthode de couplage peptidique Miklos Bodanszky ^{5;16}	23
Figure 2.4) Méthode de Glatthard et Matter pour l'activation ²⁴	25
Figure 2.5) Activation à l'aide de la méthode de Sunggak ^{6;25}	26
Figure 3.1) Premières conditions de synthèse développées	29
Figure 3.2) Conditions de réactions les plus efficaces pour l'activation et le couplage...31	
Figure 7.1) Analogie au site actif entre deux TGases	65
Figure 7.2) Inhibiteur de la TGase du foie de cochon d'Inde	67
Figure 7.3) Cinétique de Folk avec l'hydroxylamine (NH ₂ OH)	69
Figure 7.4) Structure similaire térapeptide et dipeptide N-protégé	71
Figure 7.5) Structure primaire de la B-caséine, de la α_{s1} - caséine, du segment A ^{59;60}	76
Figure 7.6) Structure de la monodansylcadaverine	77
Figure 8.1) Réaction catalysée par la TGase <i>in vitro</i>	79
Figure 8.2) Équation chimique d'une réaction enzymatique	80
Figure 8.3) Représentation du site actif de l'enzyme	85
Figure 9.1) Exemple d'une cinétique pour une concentration S de substrat donneur (Absorbance en fonction du temps)	91
Figure 9.2) Courbe Michaelis-Menten pour la Cbz-L-Gln-L-Phe	92

Liste des tableaux

Tableau I) Quelques esters de p-nitrophényles (Np) des publications de Bodanszky	23
Tableau II) Quelques dipeptides synthétisés par Bodanszky à l'aide de la méthode au p-nitrophénol et DCC	24
Tableau III) Peptides synthétisés qui ont précipité	34
Tableau IV) Peptides synthétisés qui n'ont pas précipité	35
Tableau V) Peptides synthétisés retrouvés dans la littérature	38
Tableau VI) Cinétique de Folk avec de petits substrats à pH=8, incorporation de $\text{NH}_2\text{OH}^{56}$	70
Tableau VII) Constantes cinétiques, résultats de Folk à pH=8, incorporation de $\text{NH}_2\text{OH}^{56}$	70
Tableau VIII) Résultats de certaines études cinétiques de Folk ⁴⁹	73
Tableau IX) Constante cinétiques des Caséines	74
Tableau X) Valeurs cinétiques pour les différents substrats	83
Tableau XI) Données sur l'enzyme pour les différentes cinétiques	93
Tableau XII) Conditions finales de réaction à pH = 7 pour les substrats donneurs 1,2,4,5,6 ou la concentration de substrat donneur varie	94
Tableau XIII) Conditions finales de réaction à pH = 7 pour le substrat donneur 3	95
Tableau XIV) Conditions finales de réaction à pH = 7 pour les substrats donneurs 7, 8, 9 et 10	95
Tableau XV) Volumes des solutions utilisées pour les cinétiques, $V_t=500$ uL, pH = 7 pour les substrats donneurs 1,2,4,5 et 6	96
Tableau XVI) Volumes des solutions utilisées pour les cinétiques, $V_t=500$ uL, pH = 7 pour le substrat donneur 3	96
Tableau XVII) Volumes des solutions utilisées pour les cinétiques, $V_t=500$ uL, pH = 7 pour les substrats donneurs 7 et 9	97

Tableau XVIII) Volumes des solutions utilisées pour les cinétiques, $V_t=500$ μ L, pH = 7 pour les substrats donneurs 8 et 10	97
--	----

Liste des abréviations

[]	Concentration
Å	Angstrom
ϵ	Coefficient d'extinction molaire
Boc	N- <i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Cbz	Carbobenzyloxy
c.c.m.	Chromatographie sur couche mince
ClNp	Chloroformate de p-nitrophényle
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMPDA	N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine
Fmoc	9-fluorényle méthoxycarbonyle
GP	Groupe protecteur
GSH	Glutathion
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
k_{cat}	Constante de vitesse de premier ordre d'une réaction enzymatique
K_m	Constante de Michaelis
ONp	<i>para</i> -nitrophényl
SMHR	Spectre de masse haute résolution
TGases	Transglutaminases
THF	Tétrahydrofurane

*[...]je te loue pour avoir révélé aux tout petits
ce que tu as caché aux intelligents et aux sages .*

Mt 11/25

Première Partie
Chimie Peptidique

1.1 Quelques éléments historiques sur la synthèse peptidique

1.1.1 *Les débuts de la chimie peptidique*

Les origines de la chimie peptidique remontent à 1881 quand, pour la première fois, la benzoyldiglycine a été accidentellement synthétisée par Curtius. Cette synthèse fortuite était le résultat de la condensation de l'acide hippurique avec la glycine. Puis vers 1900, Fischer publia ses résultats de recherches sur les acides aminés et les peptides; il avait développé entre autres les méthodes de couplage par condensation d'esters et l'utilisation de chlorures d'acides. C'est en 1953 que la première hormone peptidique fut synthétisée par du Vigneaud. Celui-ci a utilisé les chlorures d'acides aminés N-tosylés. Toutes ces techniques développées dans les débuts de la synthèse peptidique sont aujourd'hui encore utilisées mais moins fréquemment que dans le passé, étant donné toutes les nouvelles techniques offertes⁸.

Un autre réactif intéressant fit son apparition en 1932, quand Bergmann et Zervas ont introduit l'utilisation du groupe protecteur carbobenzyloxy (Cbz). Ce groupe protecteur est encore grandement utilisé de nos jours. Vers 1930, il y avait donc un groupe protecteur très utile pour synthétiser des peptides, de plus, la technique de couplage à l'aide d'azide était déjà au point à la suite des travaux de Curtius. Par la suite les chercheurs se sont intéressés à fabriquer des groupes protecteurs des chaînes latérales. Peu après, vers 1955 le chercheur Miklos Bodansky publiait ses premiers résultats de synthèses peptidiques à l'aide d'esters activés p-nitrophényles⁹. Une autre méthode de synthèse peptidique qu'on ne peut passer sous silence est la synthèse sur support solide qui fut conçue en 1959. Merrifield est un de ceux qui a grandement développé la technique. Il fit la synthèse du térapeptide L-leucyl-L-alanyl-glycyl-L-valine en 1962-63¹⁰. À la même époque, Letsinger et Kornet ont synthétisé la L-leucyl-

glycine sur support solide en utilisant une approche chimique différente. À partir de ce moment plusieurs laboratoires ont travaillé à améliorer la technique¹¹.

1.1.2 La chimie peptidique moderne

Ceci nous amène, selon Wieland¹², à l'époque actuelle de la chimie peptidique, où des groupes protecteurs efficaces ont été développés pour les fonctions amines, amides, alcools, acides et soufrées des chaînes latérales des acides aminés. De plus, la disponibilité d'acides aminés énantiomériquement purs a permis d'étudier la racémisation des réactions de synthèses peptidiques. Comme le mentionne Wieland, le chiffre magique de la synthèse peptidique (un polypeptide de 100 acides aminés) a été atteint lorsque le groupe de Yajima a publié les résultats de la synthèse de la ribonucléase A pancréatique (124 acides aminés) en 1979¹². Malgré le très grand nombre de réactifs utiles déjà développés pour la synthèse peptidique, des nouveaux réactifs sont toujours développés pour répondre à de nouveaux besoins en synthèse.

Il est intéressant de noter que certains chercheurs ont espéré développer une méthode universelle de synthèse peptidique. Mais, il semble de plus en plus évident que la synthèse peptidique fait appel à une évaluation cas par cas qui permet de choisir les bons groupes protecteurs ainsi que les bons agents d'activations. La synthèse peptidique demeure toujours un grand défi¹¹. Une procédure générale ne peut pas être à ce jour décrite parce que chaque acide aminé présente une réactivité différente et que, de plus, la réactivité d'un acide aminé dans un peptide dépend des acides aminés adjacents.

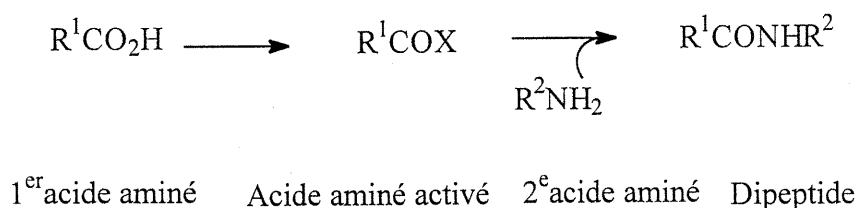
1.2 Les bases des couplages peptidiques

1.2.1 Idées générales des couplages peptidiques

Mis à part quelques exceptions, les couplages peptidiques sont le résultat de l'aminolyse d'un dérivé carboxylé. Celui-ci vient de l'activation de la fonction acide de l'acide aminé¹ (voir figure 1.1). On dénote trois façons générales pour réaliser un couplage par aminolyse de l'intermédiaire carboxylé. La première consiste en l'activation de la fonction acide du premier acide aminé, suivi de l'ajout du second acide

aminé. Par cette méthode, l'intermédiaire activé n'est pas isolé. L'aminolyse suit immédiatement l'activation. Dans le deuxième cas au contraire, l'intermédiaire activé est isolé et peut être purifié avant l'aminolyse. Enfin, dans un troisième cas, l'activation du premier acide aminé peut se faire en présence du deuxième acide aminé¹.

Figure 1.1) Schéma général d'activation et couplage peptidique¹



1.3 Les esters activés

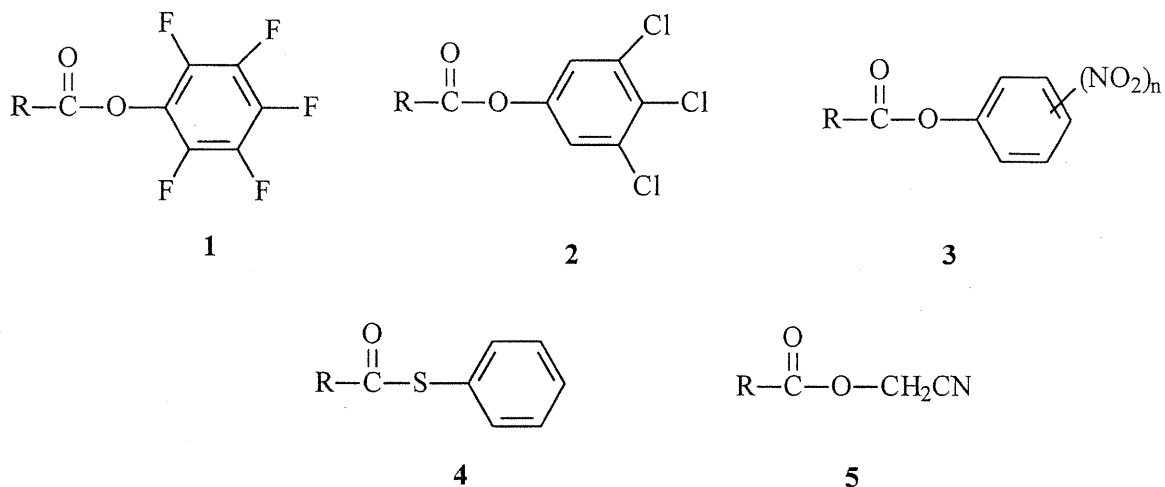
1.3.1 Les premiers esters activés utilisés en synthèse peptidique

Parmi les méthodes de couplage d'acides aminés il y a la méthode des esters activés d'acides aminés. Il y a plusieurs catégories d'esters activés. On dénote entre autres les alkyles esters, les aryles esters et les esters insolubles c'est-à-dire sur support solide. Les différents esters développés pour la synthèse peptidique ont tous un point en commun: l'activation du carbonyle d'un acide aminé N-protégé afin de le rendre plus réactif pour faire une aminolyse. Plusieurs types d'esters activés furent développés, mais seulement quelques-uns se sont avérés populaires. Parmi ces esters activés, notons les esters de pentafluorophényles^{13;14}, de trichlorophényles¹ (voir figure 1.2, composés 1 et 2). Un ester d'acide aminé peu réactif entraînera des sous-réactions lors du couplage avec le second acide aminé dû à une réactivité semblable à celle du groupe protecteur fixé sur la fonction amine. Une réactivité trop accrue entraînera des sous-réactions lors du couplage dû entre autres à l'hydrolyse de l'ester, des réactions avec la chaîne latérale de l'acide aminé ajouté etc.. Les premiers essais de synthèse peptidique par Curtius ainsi que Fischer ont donné des mélanges de peptides car ils utilisaient des esters du type

RCOOEt. Ces esters sont beaucoup trop stables pour donner une seule réaction spécifique.

Des esters activés plus efficaces furent développés dans les années 50 quand il fut réalisé que les couplages seraient facilités par l'utilisation de meilleurs groupes partants¹. En 1948-49, des études du groupe de Gordon ont démontré que la vitesse d'aminolyse des esters dépend des propriétés électroattractives des substituants sur l'ester. De plus, Wieland développa en 1951 les esters thiophényles d'acides aminés protégés (voir figure 1.2, composé 4) et le groupe de Schuyzer introduisit des groupes électroattracteurs (tel cyano) sur des méthyles esters d'acides aminés protégés (voir figure 1.2, composé 5).

Figure 1.2) Quelques esters activés utilisés en synthèse peptidique¹



1.3.2 Les esters développés par Bodanszky

Tous ces résultats amenèrent Bodanszky en 1955 à conclure que la réactivité des esters thiophényles était plus en relation avec le groupement phényle "conjugué" au groupement carbonyle que le fait que le composé soit un dérivé thiol. Il développa donc les esters nitrophényles d'acides aminés N-protégés (voir figure 1.2, composé 3), sur les bases que le groupe nitro peut servir à activer le carbonyle par effet inductif et que l'atome d'oxygène peut remplacer l'atome de soufre bien que celui-ci soit plus

polarisable. Des différents esters nitrophényles d'acides aminés N-protégés étudiés par Bodanszky, les esters p-nitrophényles d'acide aminés N-protégés se sont avérés les plus pratiques au niveau de la stabilité versus réactivité. Les esters p-nitrophényles d'acide aminés N-protégés peuvent généralement être obtenus sous forme de solides stables. Comparativement à ces derniers, les esters 2,4-dinitrophényles du même type sont très réactifs et trop sensibles à l'hydrolyse. L'utilité générale des esters p-nitrophényles d'acides aminés N-protégés a été démontrée lors de la synthèse de l'oxytocin par Bodanszky et du Vigneaud en 1959¹⁵.

Le couplage, après isolation de l'intermédiaire activé, peut se faire de différentes façons. Dans certains cas le couplage peut se faire en solution aqueuse avec le second acide aminé libre⁵. La partie "couplage" de la méthode développée dans notre laboratoire est d'ailleurs dérivée de celle-ci. Vers les années 1980, Bodanszky s'est intéressé aux possibilités et limitations, de l'activation des acides aminés donc la fonction amine était protégée avec le 9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc)^{5;16}. Les esters activés de type p-nitrophényles avec la fonction amine protégé avec Fmoc sont des cristaux très stables. Une partie des travaux présentés ici ont été effectués sur des acides aminés protégés avec le Fmoc.

2.1 Quelques méthodes de synthèses peptidiques en solution

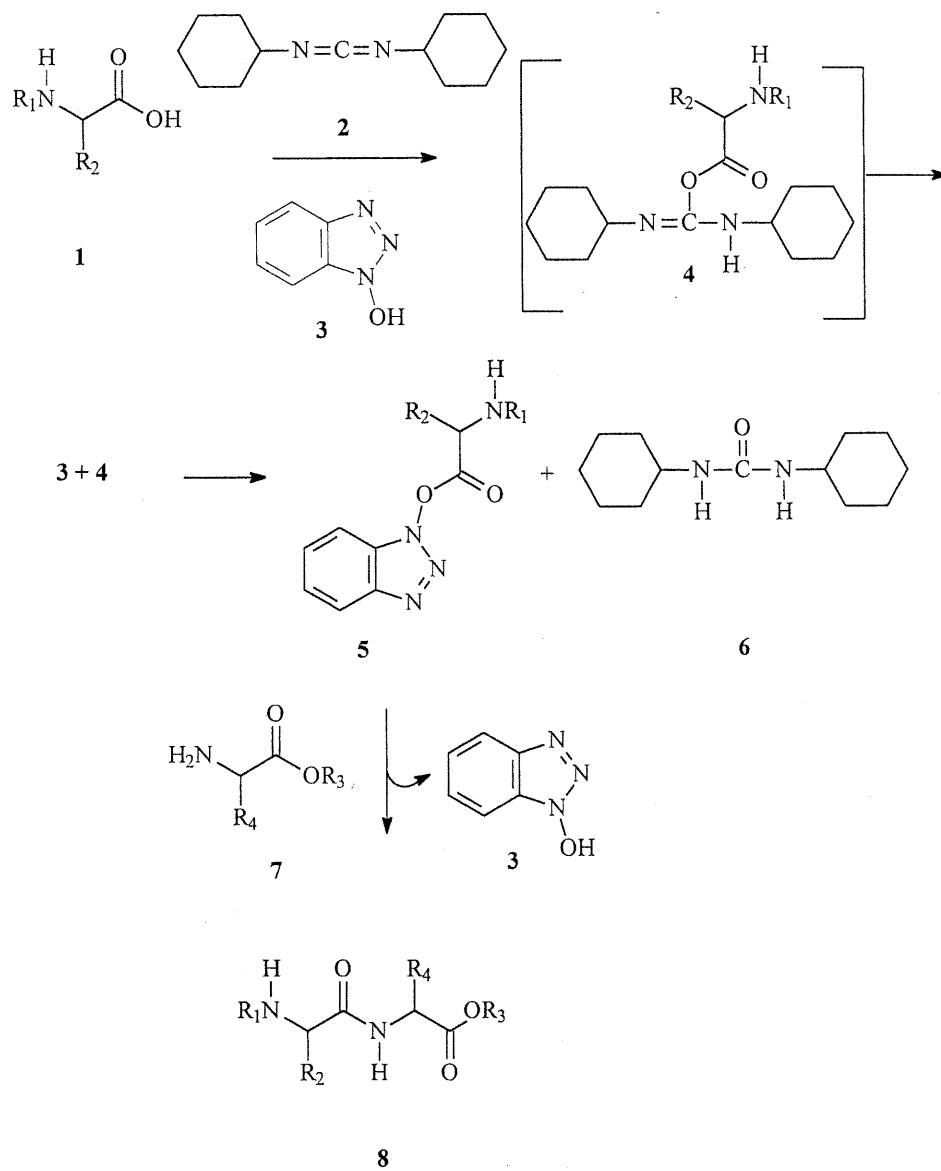
2.1.1 La méthode au dicyclohexylcarbodiimide (DCC)

Comme il a été mentionné, il existe une incroyable variété de méthodes de synthèses peptidiques, que l'on retrouve résumée dans plusieurs livres, dont quelques-uns sont mentionnés dans les références¹⁻⁴. De ces méthodes, il y a celles sur phase solide et celles en solution aussi appelées méthode classique. Les méthodes sur phase solide semblent prendre une place de plus en plus importante comparativement aux méthodes en solution mais celles-ci n'en demeurent pas moins utiles dans plusieurs situations¹. D'ailleurs, plusieurs méthodes de synthèse en solution ont été développées dans les années 1980-90, bien que les méthodes sur phase solide prennent de plus en plus d'ampleur. Par contre, il semble que, pour les synthèses de longs peptides (plus d'une dizaine d'acides aminés), les méthodes sur phase solide ont la faveur des "peptidiciens"^{8;17}. Le principal avantage vient de la simplification des purifications puisque le peptide est fixé sur une phase solide insoluble. Malgré ces avantages pour les longs peptides, il semble que pour la synthèse de courts peptides (2-4 acides aminés) les méthodes en solution seraient plus rapides et plus simples.

Pour ces raisons, un très grand nombre de méthodes de synthèse peptidique en solution furent et sont encore développées. Pour les besoins présents, quelques méthodes de synthèse peptidique en solution utilisant des esters activés seront décrites et comparées par la suite.

Une des méthodes de synthèse peptidique que l'on ne peut passer sous silence est celle au DCC. Le DCC a été le réactif le plus utilisé pour activer le groupement carboxyle en synthèse peptidique durant plusieurs années¹. Cette méthode est très simple, rapide et compatible avec l'eau³. La méthode de couplage au DCC peut se faire directement entre un acide aminé N-protégé et un autre C-protégé. La méthode a comme

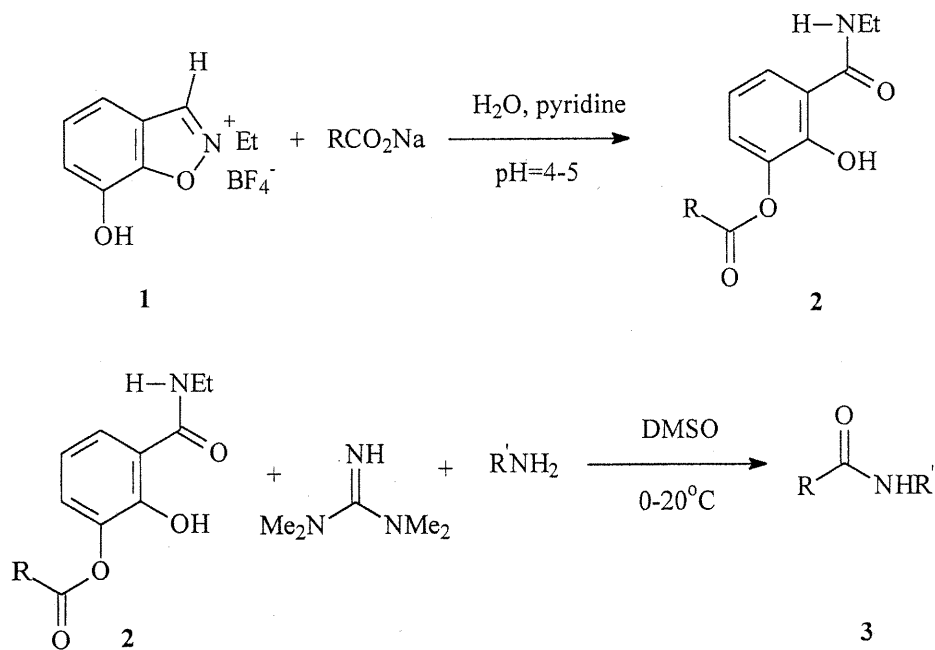
inconvenient principal de pouvoir être accompagnée de réactions secondaires dont la formation de N-acylurées et de racémisation en passant par la formation de 5-(4H)-oxazolone. Pour diminuer l'intensité des réactions secondaires, il est généralement accepté d'ajouter un nucléophile tel le 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (voir figure 2.1, composé 3). Le HOBt réagit très rapidement avec l'intermédiaire formé (voir figure 2.1, composé 4) pour former un ester activé (voir figure 2.1, composé 5) ce qui empêche les sous-réactions intramoléculaires d'avoir lieu¹. Cet ester activé est un réactif encore sensible à l'aminolyse mais plus stable et moins susceptible de donner lieu à des réactions secondaires¹.

Figure 2.1) Mécanisme général au DCC/HOBt¹

2.1.2 La méthode à l'aide du fluoroborate de 7-Hydroxy-2-éthylbenzoxazolium¹⁸

Cette méthode (voir figure 2.2) semble donner de très bons rendements, pourtant, elle ne semble jamais avoir connu d'essor. Elle est présentée ici étant donné que plusieurs des composés que nous avons synthétisés seront comparés avec les mêmes composés préparés à l'aide de cette méthode. Les auteurs mentionnent que leur méthode se démarquera dans des situations où l'on devra utiliser des sels d'acides aminés¹⁸. Par contre, cette méthode ne serait pas plus propre que celle du p-nitrophénol développée par Bodanszky (voir section 2.2.1). Cette technique semble avoir comme principal désavantage, de nécessiter plusieurs manipulations plus ou moins faciles. Entre autres l'agent activant (voir figure 2.2, composé 1) est préparé en trois étapes et les esters activés (voir figure 2.2, composé 2) doivent être isolés et purifiés¹⁸. De plus, les couplages sont faits sous azote. Ceci explique peut-être le peu d'essor connu par la méthode.

Figure 2.2) Méthode avec le fluoroborate de 7-Hydroxy-2-éthylbenzoxazolium¹⁹



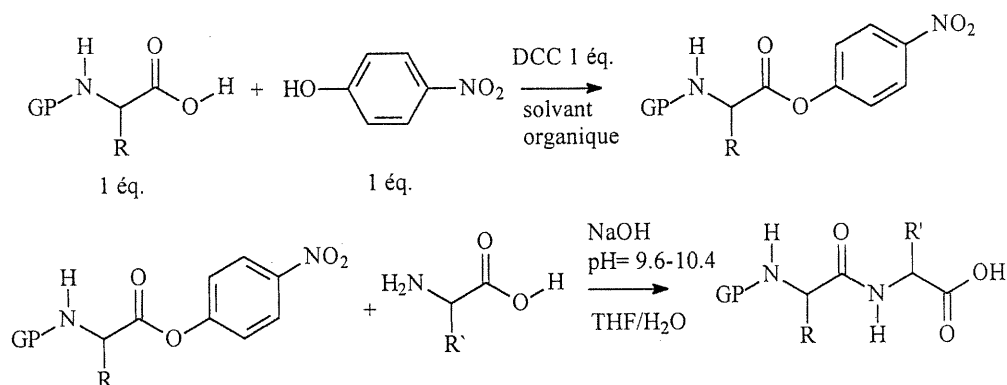
2.2 Les esters activés

2.2.1 *La méthode développée par Bodanszky pour l'utilisation des esters p-nitrophényles en synthèse peptidique*

Une des méthodes les plus utilisées de synthèse peptidique, utilisant les esters activés, est la méthode des esters p-nitrophényles développée par Miklos Bodanszky. C'est aux alentours de 1955 que les premières synthèses peptidiques utilisant le p-nitrophénol furent effectuées^{9;20;21}. Les esters activés sont préparés à l'aide du DCC et du p-nitrophénol. Peu de temps avant, Sheehan et Hess publiaient un article sur la synthèse peptidique utilisant le DCC comme agent de couplage entre un acide aminé ou un peptide N-protégé et un acide aminé C-protégé²². Bodanszky pour justifier l'amélioration de sa méthode par rapport à celle utilisant seulement le DCC, mentionne qu'un sous-produit acyluréa peut être formé avec la méthode au DCC³¹. Cette formation de sous-produit peut être diminuée en utilisant un excès d'acide aminé C-protégé ou un excès de l'acide aminé ou du peptide N-protégé. Il dénote que l'utilisation de ces excès est parfois non désirée. Pour la méthode avec le p-nitrophénol, il est facile d'utiliser un excès de ce dernier.

La méthode de Bodanszky nécessite l'isolation de l'ester activé, ceci permet d'augmenter la pureté de la réaction d'aminolyse en enlevant les produits secondaires possiblement formés lors de l'activation. Par contre, cette isolation augmente le nombre de manipulations à suivre et diminue le rendement global. Bodanszky utilise plus fréquemment des acides aminés C-protégés lors du couplage¹⁵ mais dans certains cas, la méthode de Bodanszky permet d'utiliser un deuxième acide aminé libre sans même isoler l'ester activé^{5;20} (voir figure 2.3).

Figure 2.3) Méthode de couplage peptidique Miklos Bodanszky^{5;16}



Quoi qu'il en soit la méthode des esters nitrophényles développée par Bodanszky a fait ses preuves aux travers de multiples synthèses de peptides et d'études des possibilités de la méthode^{5;15;23}. Un des avantages de la méthode est que l'on peut utiliser le groupe protecteur Fmoc pour fabriquer des esters activés qui peuvent être utilisés comme unité à ajouter dans la synthèse de longs peptides⁵. Le tableau I donne le rendement pour l'activation de quelques acides aminés à l'aide du DCC et du p-nitrophénol.

Tableau I) Quelques esters de p-nitrophényles (Np) des publications de Bodanszky

Esters activés ^a	Rendement, %	Références
Cbz-L-Leu-ONp	86	15
Cbz-L-ProONp	89	15
Cbz-L-Gln-ONp	59	15
Fmoc-L-Leu-ONp	85	5
Fmoc-L-Pro-ONp	62	5
Fmoc-L-Gln-ONp	38	5

^a Activation avec DCC et p-nitrophénol

Les rendements sont généralement bons à l'exception du Fmoc-L-Gln-ONp, Bodanszky mentionne que plusieurs sous-produits sont formés, entre autre la glutarimide⁵. En ce qui a trait aux techniques pour le couplage, les rendements sont aussi généralement bons, comme démontré dans le tableau II pour des synthèses de dipeptides à l'aide du deuxième acide aminé libre ou de l'acide aminé C-protégé. Par contre il faut noter que ces rendements correspondent seulement au couplage après isolation de l'ester activé. Il serait intéressant d'avoir un rendement global activation-couplage. Si l'on prend des valeurs représentant les tendances générales on obtient un rendement global d'environ 63 % (85% pour l'activation et 75 % pour le couplage).

Tableau II) Quelques dipeptides synthétisés par Bodanszky à l'aide de la méthode au p-nitrophénol et DCC

Dipeptides	Rendements, %	Références
Cbz-L-Val-L-Leu	77 ^a	5
Cbz-L-Phe-L-Ser	65 ^b	23
Cbz-Leu-Gly-OEt	74 ^c	15

a) Synthétisé dans un mélange H₂O/THF avec NaOH
 b) Synthétisé dans un mélange H₂O/pyridine avec NaOH
 c) Synthétisé dans le CHCl₃ en présence de Et₃N

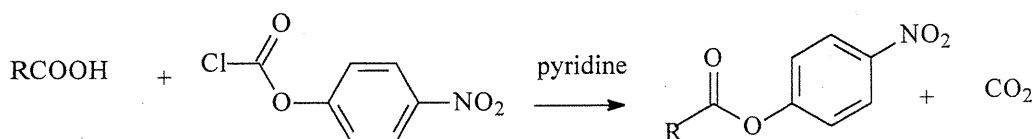
Comme mentionné, la méthode des esters activés du p-nitrophénol développée par Bodanszky a été utilisée dans la synthèse de peptides naturels tel l'oxytocin^{1;15}. Les synthèses de longs peptides, avec cette méthode, se font généralement dans la direction C→N^{15;23}.

2.2.2 Autres façons de préparer les esters activés de p-nitrophényle

Quelques années après, d'autres façons de synthétiser des esters activés furent décrites par Glatthard et Matter en 1963²⁴ (voir figure 2.4). Ils utilisaient le

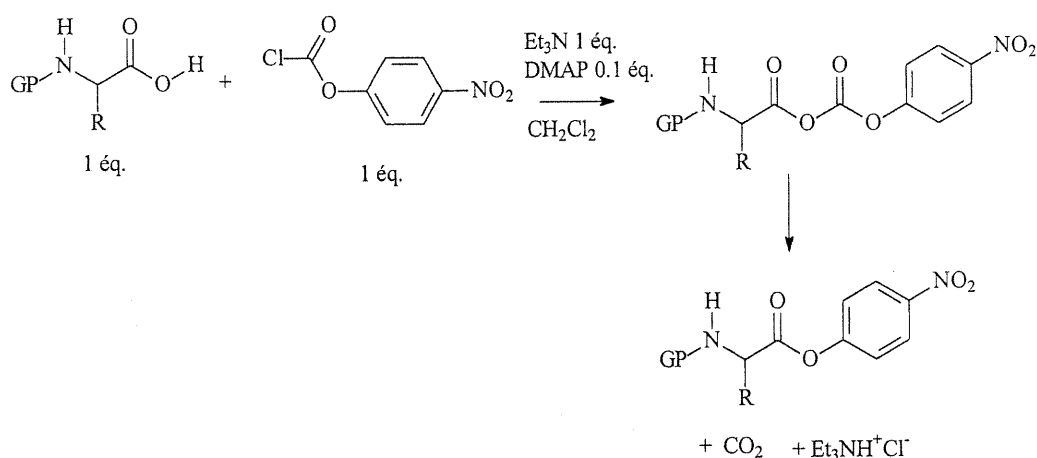
chloroformate de p-nitrophényle ou des anhydrides mixtes d'ester de nitrophényle en présence de l'acide aminé N-protégé et d'une base organique telle la pyridine dans un solvant organique ou directement dans la pyridine. Pour quelques raisons, ces résultats ne furent pas très utilisés par la suite. Puis, en 1985 le groupe de Sunggak développa une méthode de synthèse d'ester à l'aide d'anhydride mixte qui était une amélioration de la méthode de Glatthard^{6,25}. Les auteurs décrivent dans leur publication la synthèse de différents esters dont des esters p-nitrophényles à l'aide du chloroformate de p-nitrophényle et d'acides aminés protégés, en présence de triéthylamine et de diméthylaminopyridine (DMAP) dans le dichlorométhane (voir figure 2.5).

Figure 2.4) Méthode de Glatthard et Matter pour l'activation²⁴



Fait intéressant de l'article de Sunggak, les auteurs mentionnent que cette méthode pourra être pratique en synthèse peptidique pour protéger les fonction acide mais ils ne font pas allusion à la possibilité de couplage. Puis, il semble que personne n'ait décidé d'utiliser les idées de Sunggak pour faire des synthèses peptidiques. Peut-être ceci s'explique par l'efficacité de la méthode au DCC et par le fait que les synthèses peptidiques en solution sont moins étudiées et utilisées de nos jours.

Figure 2.5) Activation à l'aide de la méthode de Sunggak^{6;25}



Les auteurs de la méthode de Sunggak mentionnent que le mécanisme de cette réaction n'est pas clairement élucidé et proposent des mécanismes possibles, pour expliquer la formation et la dégradation de l'anhydride mixte formé, dans un article⁶.

Nous avons principalement exploré les possibilités d'utiliser la méthode de Sunggak comme méthode d'activation d'acides aminés pour des fins de couplage peptidique.

2.2.3 Les esters de fluorophényles

Plusieurs autres types d'esters phényles furent développés au fil des années. À titre d'exemple, voici quelques informations générales sur les esters de fluorophényles (voir figure 1.2, composé 1). Tout comme pour les esters de p-nitrophényles, les esters de fluorophényles sont préparés à l'aide du DCC¹⁴, avec de bons rendements généralement autour de 75 à 95 %¹³. Pour les couplages, les rendements sont aux alentours de 70-90 %¹³. L'inconvénient principal de ces esters vient aussi de leur très grande réactivité, c'est-à-dire qu'ils sont facilement hydrolysés et qu'il faut prendre des

précautions afin d'optimiser les synthèses¹⁴. Il y aurait certains problèmes avec le pentafluorophénol relâché lors du couplage puisque ce dernier est très irritant.

Il a été démontré que ces esters étaient très utiles lors de la synthèse de certains composés naturels tel l'oxytocin et l'angiotensin^{26;27}. Les synthèses des longs peptides à l'aide de cette méthode se font dans la direction C→N²⁷.

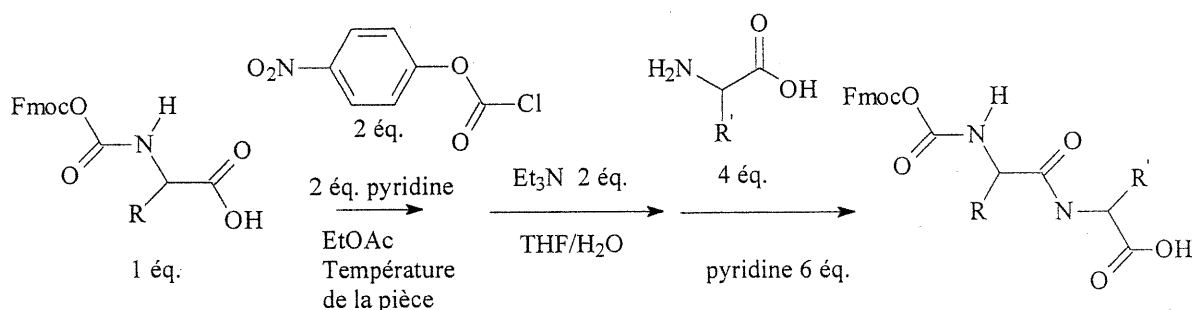
Bref, il semble que chaque méthode possède ses avantages et désavantages et que le choix d'une méthode dépend des besoins spécifiques de la synthèse à effectuer. Dans le même ordre d'idée, il semble bien évident qu'il n'existe aucune méthode magique applicable à toutes situations. Bien d'autres méthodes de couplages existent telles les anhydrides mixtes et les chlorures d'acides, qui peuvent dans plusieurs cas aussi être utiles^{1;28;29}.

3.1 Développement de la méthode de synthèse peptidique

3.1.1 *Les premiers essais*

Il est sans doute d'intérêt ici de mentionner comment nous en sommes arrivés à développer la méthode de synthèse présentée dans ce mémoire. Les premières tentatives d'activation à l'aide du chloroformate de p-nitrophényle étaient effectuées avec deux équivalents de pyridine ainsi que deux équivalents de chloroformate de p-nitrophényle dans l'acétate d'éthyle à la suite de constatations fortuites survenues dans nos laboratoires. Puis le couplage se faisait dans un mélange eau/THF en présence de six équivalents de pyridine et de quatre équivalents du deuxième acide aminé libre (voir figure 3.1). Cette méthode nous permettait d'obtenir des dipeptides contenant beaucoup d'impuretés avec des rendements très peu satisfaisants. De plus, l'usage de deux équivalents de chloroformate de p-nitrophényle rendait compliqué le passage de l'activation au couplage sans isolation de l'intermédiaire car, pour détruire l'excès de p-nitrophényle chloroformate nous devions laisser le mélange en milieu basique un certain temps sans ajouter le deuxième acide aminé. Ceci pouvait entraîner la destruction d'une partie de l'ester activé formé. L'acide aminé activé était protégé avec le groupement Fmoc. Ces premiers résultats nous amenèrent à raffiner nos recherches dans la littérature afin d'améliorer si possible la méthode ainsi que de mieux connaître ce qui avait déjà été tenté de semblable.

Figure 3.1) Premières conditions de synthèse développées



3.1.2 Amélioration de la méthode à partir des résultats de Sunggak

Par la suite, les recherches dans la littérature nous amenèrent à avoir plus d'informations sur l'utilisation des chloroformates dans la formation d'esters d'acides aminés. Une publication de Glatthard et Matter²⁴ remontant à 1963 mentionne ce type de réaction où un intermédiaire anhydride mixte est formé sur une fonction acide pour finalement former un ester. Bien évidemment, les réactions utilisant des anhydrides mixtes sont souvent utilisées²⁸. Par contre, la méthode de Glatthard ne semble pas avoir obtenue un très grand succès comparativement à d'autres méthodes de la même époque. Un des articles clés dans le développement de notre méthode est nul doute celui de Sunggak⁶ et ses collègues qui en 1984 publiaient "A Simple and Mild Esterification Method for Carboxylic Acids Using Mixed Carboxylic-Carbonic Anhydrides"⁶. Cet article nous a permis d'améliorer le rendement de l'activation des acides aminés. Sunggak dans ses publications sur sa méthode^{6;25} décrit la synthèse de certains esters d'acides aminés N-protégés et même quelques p-nitrophényles esters d'acides aminés N-protégés. Ce qui est surprenant est qu'il mentionne l'utilité de sa méthode pour la protection des fonctions acides des acides aminés N-protégés mais qu'il ne mentionne pas l'application potentielle pour l'activation de la fonction acide en synthèse peptidique. À partir de cette découverte nous avons utilisé la méthode de Sunggak à l'exception que nous utilisons 0.1 équivalent d'excès au lieu de concentration équimolaire dans son cas pour le chloroformate de p-nitrophényle et la triéthylamine. De même, le protocole des

couplages fut légèrement modifié et nous avons utilisé 4 équivalents de triéthylamine plutôt que 6 équivalents.

3.1.3 *Essais de différents solvants*

Donc, à la suite de ces recherches dans la littérature nous faisons l'activation à l'aide de la méthode inspirée de Sunggak dans l'acétate d'éthyle ou le dichlorométhane. Puis, après avoir enlevé le solvant par évaporation sous vide nous faisons le couplage dans un mélange THF/eau. La présence d'impureté après la précipitation du dipeptide final nous a amené à réaliser qu'il était grandement important d'utiliser du THF distillé afin d'enlever les agents stabilisants qu'il contient car ceux-ci restent mélangés avec le précipité final.

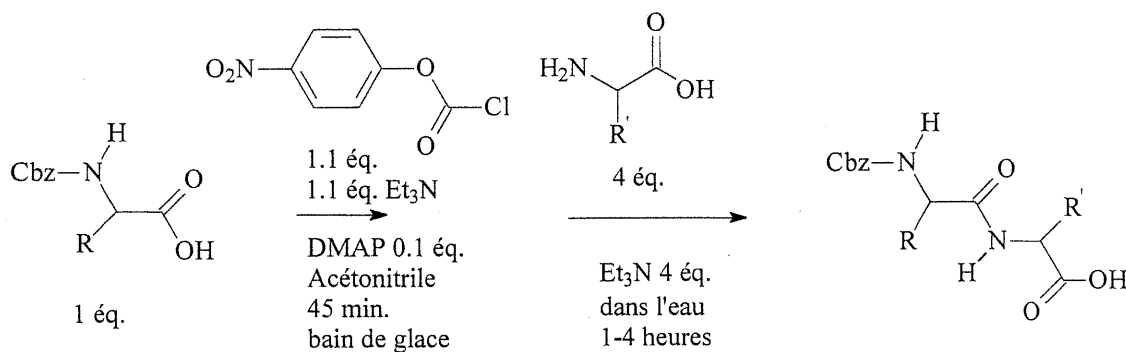
Par la suite, la nécessité d'activer certains acides aminés N-protégés insolubles dans le dichlorométhane ou l'acétate d'éthyle nous amena à utiliser l'acétonitrile. Ce solvant possède l'avantage d'être miscible avec l'eau, ce qui fait que l'on a pas à enlever le solvant avant de passer au couplage. Pour cette raison et des raisons de solubilité, la majorité des couplages furent effectués dans l'acétonitrile.

3.1.4 *Essais de groupes protecteurs*

Le groupement Fmoc fut notre choix de départ puisque les composés finaux contenant ce groupe protecteur précipitaient généralement facilement. En fait, dans aucun cas le composé final neutre fut soluble dans la phase aqueuse acide. Par contre, les produits finaux contenant ce groupe protecteur sont difficiles à rincer après la précipitation. Ils contiennent toujours beaucoup de chlorure de triéthylamine protonée. De plus, ils contiennent des sous-produits provenant probablement de la dégradation des produits. Le Fmoc peut être enlevé en milieu basique. Comme l'activation et le couplage se déroulent en présence de triéthylamine, il est permis de croire que les impuretés proviennent de la déprotection non-désirée du Fmoc. Bodanszky a étudié¹⁶ l'utilisation du groupement Fmoc pour des synthèses peptidiques en solution d'ester activé de p-nitrophénol, et ce type de déprotection non-désirée fut détectée³⁰. Les problèmes de pureté furent détectés pour tous les composés de la série synthétisée avec Fmoc, soit Fmoc-L-Phe-L-Cys, Fmoc-L-Phe-L-His, Fmoc-L-Phe-L-Phe, Fmoc-L-Phe-L-Ser.

Nous avons donc essayé des composés ayant d'autres groupes protecteurs plus stables aux conditions de notre méthode. Les groupements Cbz et Boc furent essayés pour synthétiser des substrats pour une enzyme transglutaminase. Le groupement Boc fut utilisé une seule fois car il n'était pas nécessaire de l'utiliser pour d'autres substrats. Le groupement Cbz fut utilisé pour plusieurs synthèses et présenta une bonne stabilité. De plus, plusieurs composés synthétisés avec ce groupe protecteur précipitèrent comme désiré. Nous avons donc resynthétisé la série de dipeptides fait avec le Fmoc mais cette fois contenant le groupe protecteur Cbz. Tous les composés ainsi protégés étaient plus facilement purifiés après le couplage. Seulement quelques rinçages du produit final précipité étaient nécessaires. Le protocole le plus efficace est donc représenté à la figure 3.2.

Figure 3.2) Conditions de réactions les plus efficaces pour l'activation et le couplage



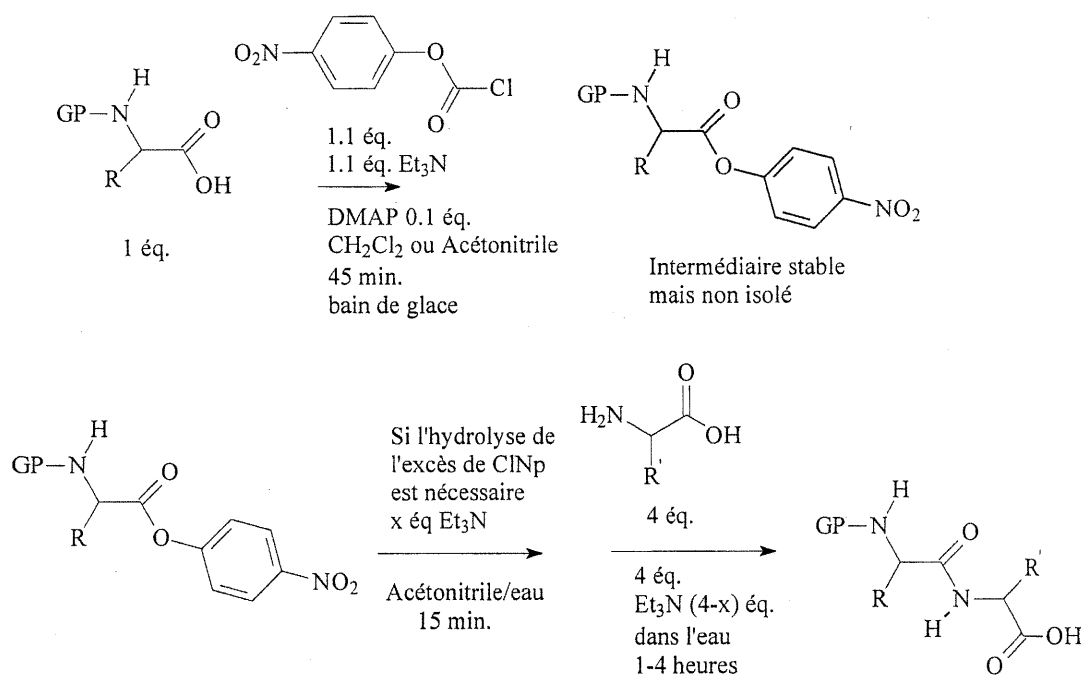
3.2 Description générale de la méthode de synthèse

3.2.1 Description de la méthode

La méthode générale (voir figure 3.3) consiste à faire réagir dans un solvant organique, un équivalent d'acide aminé N-protégé avec 1.1 équivalent de chloroformate

de p-nitrophényle en présence de 1.1 équivalent de triéthylamine pour former un ester activé ainsi qu'un dégagement de CO₂. La triéthylamine sert à capter le proton libéré au cours de la réaction. La réaction est facilitée par l'ajout de 0.1 équivalent de DMAP. Une fois l'ester formé, celui-ci n'est pas isolé et on passe directement au couplage. Si l'activation a été faite dans un solvant immiscible avec l'eau on enlève ce dernier par évaporation sous vide. Dans le cas contraire on passe directement à l'étape suivante. Le deuxième acide aminé est ajouté en milieu basique et ainsi le dipeptide se forme en quelques heures. Il est important de mentionner que certains composés furent couplés avec le NaHCO₃ plutôt que la triéthylamine (voir partie expérimentales chapitre 5)

Figure 3.3) Schéma général de l'activation et du couplage d'acides aminés à l'aide de notre méthode



Bref, nous sommes arrivés à développer une méthode de synthèse peptidique rapide et efficace pour différentes situations. Les résultats et discussions de la méthode se retrouvent au prochain chapitre. La méthode sera comparée avec d'autres méthodes classiques ce qui permettra de mettre en relief les possibilités et les limitations de la méthode.

4.1 Les possibilités et limitations de la méthode

4.1.1 *Les possibilités de la méthode*

Nous avons tenté différentes synthèses afin d'obtenir des composés représentatifs pour connaître les limites de la méthode. De plus, certains substrats pour la TGase furent préparés, leurs études sont d'ailleurs décrites dans la seconde partie de ce mémoire.

Du point de vue des résultats expérimentaux, les séries de composés synthétisés à l'aide de notre méthode sont présentés aux tableaux **III** et **IV**.

Les principaux avantages de notre méthode sont la rapidité et la simplicité des synthèses. Une des raisons qui la rend efficace, est le fait de ne pas avoir besoin d'isoler l'intermédiaire activé. L'activation est faite en 45 minutes puis on peut passer directement au couplage. Dans la majorité des cas, on n'a même pas de besoin de changer de solvants. Le couplage est, pour sa part, fait en seulement quelques heures et les rendements sont généralement très bons. Autre point important est la simplicité d'isolation et de purification du produit final. Le produit final est tout simplement précipité dans le milieu par l'ajout d'acide puis filtré. Le produit retenu sur le filtre est ensuite rincé avec une solution aqueuse acide et ceci est suffisant pour enlever les impuretés qui sont principalement le p-nitrophénol et le chlorure de triéthylamine protoné. Le produit rincé est séché sous vide et ainsi le produit final est obtenu avec un bon rendement.

Tableau III) Peptides synthétisés qui ont précipité

Peptides synthétisés ^a	Rendements %
Cbz-L-Phe-L-Cys	98
Cbz-L-Phe-L-His	88
Cbz-L-Phe-L-Ser	67
Fmoc-L-Phe-L-Phe	82
Cbz-L-Gln-L-Ala	66
Cbz-L-Gln-L-Leu	70
Cbz-L-Gln-L-Phe	79
Cbz-L-Gln-L-Val	44
Cbz-L-Phe-L-Phe-L-Val	66 ^b

a) Conditions de synthèses décrites au chapitre 5

b) Rendement global pour l'ajout des 2 acides aminés libres

De plus, cette méthode permet d'obtenir immédiatement un peptide ayant la fonction acide libre, ce qui est souvent un avantage. Par ailleurs, on n'a pas besoin de travailler sous atmosphère inerte et les produits utilisés sont peu dispendieux. Bien que nous n'ayons pas poussé trop loin les études de racémisation, la comparaison des α_D avec ceux de la littérature sont généralement concordants. Ceci est une assurance que la racémisation est très faible. Les spectres RMN démontrent aussi la même chose. Dans un autre ordre d'idée, le couplage se fait en milieu basique à l'aide d'une base organique ou minérale, celles essayées sont le NaHCO_3 et la triéthylamine. Notre méthode peut donc s'avérer très utile lors de certaines situations de synthèses grâce à sa simplicité et à son efficacité.

4.1.2 Les limitations de la méthode

Hors de tout doute une des principales limitations de notre méthode survient lorsque le peptide formé ne précipite pas en milieu acide (voir tableau IV). On se

retrouve alors avec une solution aqueuse contenant quatre équivalents de triéthylamine, trois équivalents d'acide aminé libre et un équivalent de p-nitrophénol. On peut parfois extraire le peptide séparément du p-nitrophénol en faisant des extractions à différents pH. La solubilité assez bonne du p-nitrophénol dans les solvants organiques, l'eau acide et basique ne simplifie pas les extractions. Celui-ci peut même être extrait en milieu basique à l'aide de l'acétate d'éthyle²³. De plus, si le peptide n'est pas trop polaire, il y a la possibilité de purifier le produit à l'aide d'une colonne de gel de silice. Le problème est que souvent le peptide migre très peu sur la silice même si on utilise un éluant contenant de l'acide acétique. Comme il est évident dans le tableau IV, les composés qui ne précipitent pas ont des rendements généralement plus faibles conséquence de leur isolation plus ardue. En fait, lorsque l'on suit la réaction par chromatographie sur couche mince, celle-ci semble bien évoluer comme pour les composés du tableau III. De ce fait, nous croyons que les faibles rendements sont généralement dûs aux difficultés rencontrées lors de l'isolation du produit.

Tableau IV) Peptides synthétisés qui n'ont pas précipité

Peptides synthétisés	Rendements %
Boc-L-Gln-Gly	35
Cbz-L-Gln-Gly	65
Cbz-L-Gln-L-Ser	31
Cbz-L-Gln-Gly-Gly	46(30 ^a)
Cbz-Gly-L-Gln-Gly	15 ^a
Cbz-L-Gly-L-Leu	71
Cbz-Gly-L-Leu-Gly	58 (43 ^a)

a) Rendement global pour l'ajout des 2 acides aminés libres

La méthode s'est avérée inefficace pour synthétiser des composés de type Cbz-L-Ser-Xaa, car, d'après nos résultats, une partie de l'activation se ferait sur la fonction

hydroxyle de la sérine plutôt que sur l'acide. Ce problème est par ailleurs rencontré avec beaucoup de méthodes^{1,18}.

4.2 Comparaison de la méthode

4.2.1 Discussion et comparaison avec d'autres méthodes

Comme il a été mentionné, il existe un nombre incroyable de possibilités pour former un lien peptidique. Le type de peptides à faire est une des choses les plus importantes à considérer lors du choix d'une méthode. Par exemple, de nos jours, pour fabriquer de longs peptides, les méthodes sur phase solide sont préférées¹⁷. Par contre, s'il s'agit de former de courts peptides, les méthodes en solution sont plus simples. Par exemple, pour notre laboratoire, nous avons dû synthétiser une série de courts substrats peptidiques pour la TGase extraite de foie de cochon d'Inde. Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode en solution, en l'occurrence celle développée dans nos laboratoires.

Si l'on compare la synthèse du Cbz-L-Phe-L-Ser (composé **2**, tableau V) mentionné dans la littérature avec nos résultats, Bodanszky a synthétisé ce peptide avec un rendement de 65% à partir de l'ester. Dans notre cas, nous avons un rendement total de 67%. Bodanszky synthétise ses esters en environ 1 heure 30 minutes pour ensuite les purifier par filtration et recristallisation. Le composé peut ensuite être couplé en maintenant le pH constant par ajout de NaOH. Le produit final est ensuite extrait en plusieurs étapes après 16 heures de réaction. Il semble donc que du point de vue de la simplicité des manipulations et de la rapidité, notre méthode est avantageuse dans le cas présent. Par contre, les points de fusion des composés sont plutôt différents, 155-156 °C pour la littérature²³, comparé à 147-149 °C pour nous. Par ailleurs une autre publication donne un point de fusion semblable au notre 147-148 °C³¹. En ce qui a trait aux α_D les valeurs sont semblables. Étant donné les bons résultats des spectres RMN¹H et ¹³C et de spectre de masse haute résolution (SMHR) nous sommes portés à croire au bien fondé de nos résultats (voir tableau V). Nous avons aussi isolé un intermédiaire activé, le Fmoc-L-Gln-ONp avec un rendement de 42% comparable à la littérature (38%)⁵. Dans

notre cas, de même que pour Bodanszky, le faible rendement s'expliquerait par la formation de sous-produits⁵.

D'autres résultats que l'on peut comparer avec la littérature sont ceux pour le Cbz-L-Phe-L-His, Cbz-L-Gln-Ala, Cbz-L-Gln-L-Phe, Cbz-L-Gln-Gly et le Cbz-L-Gln-L-Leu (composé **2,9-12**, tableau V). Pour tous ces composés les valeurs de α_D et/ou de point de fusion sont comparables avec la littérature (voir tableau V). En ce qui a trait aux rendements, ceux-ci sont tous bons et sont comparables avec la littérature, même pour la Cbz-L-Gln-Gly qui ne précipite pas. Les composés Cbz-L-Gln-Ala et Cbz-L-Gln-L-Phe ont pour leur part des rendements légèrement moins bons que ceux de la littérature (86%, 97% respectivement¹⁸). Ces derniers sont synthétisés à l'aide de la méthode au fluoroborate qui est schématisée à la figure 2.2. Ici la rapidité et la simplicité de notre méthode comparées à l'autre méthode sont encore les principaux avantages. Bien que la méthode au fluoroborate offre des rendements légèrement supérieurs, la synthèse est beaucoup plus compliquée (voir section 2.1.2).

Tableau V) Peptides synthétisés retrouvés dans la littérature

#	Peptide synthétisé	[α] _D		Point de fusion °C	
		Exp. [α] _D ^{20°C}	Litt. ^c	Exp.	Litt. ^c
2	Cbz-L-Phe-L- His	-8.0 (1.0,DMF)	-5.1 (1.0,DMF)	201-203	205-207
3	Cbz-L-Phe-L- Ser	< 3 ^a (2.0,DMF)	-2.6 (1.0,DMF)	147-149 155-156	147-148
5	Cbz-Gly-L- Leu	---	-9.5 (5.0,EtOH)	100-101	100-102 142.5-143
6	Cbz-Gly-L- Leu-Gly	-2.9 (4.0,DMF)	-14.7 (4.0,DMF)	157-158	110
9	Cbz-L-Gln- Gly	-3.9 (1.0,DMF)	-3.0 (1.0,DMF)	183-184	183-184
10	Cbz-L-Gln-L- Ala	-1.5 (1.5,DMF)	-1.5 (1.5,DMF)	218-219	219-220
11	Cbz-L-Gln-L- Leu	-5.3 (2.0,DMF)		180-182	178-181
12	Cbz-L-Gln-L- Phe	4.7 (1.0,DMF)	5.2 (1.0,DMF)	198-199	199-200
14	Cbz-L-Gln-L- Val	<3 ^a (1.1,95%a) ^e	1.4 (1.1,95%a.)	191-192	193-194

a) Plus bas que la limite de détection de l'appareil à l'aide de la cellule utilisée

b) Les références sont données avec les synthèses au chapitre 5

Les résultats très différents de la littérature sont obtenus pour les composés Cbz-L-Gly-L-Leu et Cbz-Gly-L-Leu-Gly par rapport à certains articles. Pour le Cbz-L-Gly-L-Leu nous avons obtenu un point de fusion semblable à la littérature dépendamment de la référence. Nous n'avons pas mesuré de α_D avant de passer à l'étape suivante qui est la

synthèse de Cbz-Gly-L-Leu-Gly. Pour ce composé, le α_D est beaucoup plus bas que celui trouvé dans la littérature. Les points de fusion sont aussi plutôt différents. Par contre, les spectres RMN¹³C et RMN¹H ainsi que le spectre de masse indiquent que nous avons le bon produit. Nous sommes donc assez confiants que nous avons le bon produit. On pourrait croire que celui-ci est racémisé en grande partie étant donné la valeur faible de α_D . Peut-être aussi qu'une impureté quelconque vient fausser les résultats du point de fusion. Un autre tripeptide, le Cbz-L-Phe-L-Phe-L-Val, a été synthétisé avec un rendement global de 66% avant recristallisation. À chaque étape, les composés ont bien précipité, ce qui peut expliquer le bon rendement. Le tripeptide contenait que très peu d'impuretés avant la recristallisation. Un tel rendement est plus qu'acceptable si l'on considère qu'il équivaut à quatre étapes de synthèse, c'est-à-dire, deux activations et deux couplages, le rendement global équivaut à des rendements de 90% pour chaque étape. Le tout est fait dans la direction N→C avec des acides aminés libres. Vu la bonne concordance généralement observée entre la littérature et nos résultats expérimentaux, nous croyons que notre méthode peut s'avérer un outil très utile pour la synthèse peptidique. Notre méthode est, à notre avis, comparable et parfois plus efficace que celle de Bodanszky étant donné que les composés simples sont préparés plus rapidement avec des rendements comparables et une pureté finale généralement très acceptable. Elle est aussi beaucoup plus simple que la méthode au fluoroborate de 7-hydroxy-2-éthylbenzoxazolium car elle nécessite beaucoup moins de travail pour isoler l'intermédiaire activé.

4.3 Conclusion

4.3.1 *Présent*

À la lumière des résultats obtenus, il a été démontré que notre nouvelle méthode de synthèse peptidique pouvait être un choix intéressant pour faire certains couplages. La simplicité de synthèse et de purification ainsi que la rapidité de la méthode, sont probablement les principales distinctions par rapport aux autres techniques lorsqu'il y a précipitation. La méthode est efficace pour des couplages avec des acides aminés libres

ce qui diminue le nombre d'étapes de synthèse (protection, déprotection). Cette technique est aussi très économique car elle nécessite des réactifs peu dispendieux. La méthode est très efficace pour la synthèse de dipeptides et a été appliquée à la synthèse de substrat simple pour la TGase. Deux tripeptides ont aussi été synthétisés avec de bons rendements à l'aide de notre méthode. Le résultat est particulièrement intéressant pour le Cbz-L-Phe-L-Phe-L-Val avec un rendement global de 66%. De plus, dans certains cas où il n'y a pas de précipitation, la méthode demeure quand même efficace, comme pour la synthèse de la Cbz-L-Gln-Gly ainsi que de Cbz-Gly-L-Leu.

Manifestement, nos travaux ont permis d'élaborer une méthode de synthèse peptidique très efficace. Notre méthode s'avère, dans plusieurs situations, un outil de plus pour répondre aux besoins en synthèse peptidique.

4.3.2 *Futur*

Les études qui ont été faites sur cette nouvelle méthode pourraient être encore plus poussées. Par exemple, de plus longs peptides pourraient être synthétisés, ainsi que des peptides par condensation de fragments. Par ailleurs, les esters de p-nitrophényles sont utilisés dans la synthèse peptidique sur phase solide et il serait intéressant de voir si notre méthode pourrait être utile dans certain cas, par exemple, pour ajouter des acides aminés à une chaîne par synthèse dans la direction N→C. Des essais préliminaires en ce sens ont d'ailleurs été tentés par d'autres personnes du laboratoire et il semble que certains supports solides pourraient être efficaces pour faire ce type de synthèse (résultats non publiés). Avec un support solide les problèmes de précipitation sont contournés. De plus, d'autres types d'amines pourraient être ajoutés à la place du deuxième acide aminé. Par exemple, certaines personnes dans les laboratoires du professeur Keillor ont utilisé cette méthode pour faire des aminolyse à l'aide de l'ammoniaque³². Il sera donc intéressant d'approfondir les connaissances sur ces nouvelles possibilités.

5 Partie expérimentale

5.1 Protocole général de synthèse:

A) Activation:

À 0 °C, 1 équivalent de l'acide aminé N-protégé est dissout dans un solvant organique. On ajoute ensuite 1 équivalent de triéthylamine. Au mélange réactionnel, 1.1 équivalent de chloroformate de *p*-nitrophényle (ClNp) sont ajoutés d'un seul coup. Après 5 minutes d'agitation 0.1 équivalent de DMAP est ajouté. La réaction est agitée ainsi environ 45 minutes. De cette façon l'acide aminé activé est obtenu en solution (solution activée). L'avancement de la réaction peut généralement être suivi par c.c.m. avec un éluant EtOAc/Hexane/acide acétique.

Si l'activation a été faite dans un solvant miscible à l'eau, le couplage (ou l'hydrolyse) à température de la pièce est immédiatement effectué.

Par contre, si l'activation a été faite dans un solvant immiscible à l'eau celui-ci doit préalablement être enlevé par évaporation sous vide puis remplacé par un solvant miscible à l'eau. Ensuite le couplage (ou l'hydrolyse) est effectué à température de la pièce.

B) Hydrolyse:

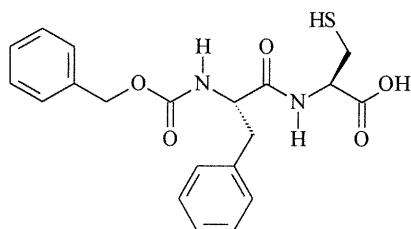
Dans certain cas, l'excès de ClNp est détruit avant d'ajouter le deuxième acide aminé. Pour se faire, la triéthylamine ainsi que l'eau sont ajoutées à la solution juste avant le couplage. L'excès est ainsi transformé en *p*-nitrophénol qui ne pourra pas réagir lors du couplage. Les quantités de triéthylamine et d'eau utilisées sont soustraites des quantités de la solution du deuxième acide aminé (voir couplage).

C) Couplage:

À la solution contenant l'acide aminé activé la solution du deuxième acide aminé est ajoutée goutte-à-goutte. Cette solution est préparée en mélangeant 4 équivalents du second acide aminé dans l'eau en présence de 4 équivalents de triéthylamine (ou moins si il y a eu une hydrolyse de l'excès de ClNp). Le volume d'eau utilisé permet d'obtenir une solution finale 50/50 eau/solvant organique. Après 1 à 4 heures de réaction, le solvant organique est évaporé et la solution aqueuse acidifiée à $\text{pH} < 3$. Si il précipite, le peptide est ensuite isolé par filtration. Si il ne précipite pas, il est isolé par d'autres méthodes. L'avancement de la réaction peut généralement être suivi par c.c.m. avec un éluant de type EtOAc/Hexane/acide acétique.

5.2 Synthèses suivant le protocole générale (étapes A et C) avec produits finaux qui précipitent.

Cbz-L-Phe-L-Cys



Départ : 598.6 mg de Cbz-L-Phe (2 mmol, 1éq.) dans 100 mL d'acétonitrile.

Rendement : 98% (789.5 mg)

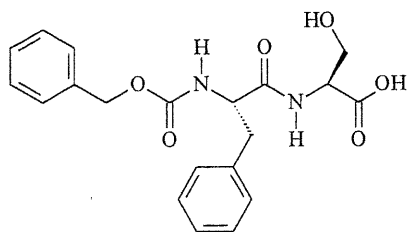
P.f. 114-116 °C

$[\alpha]_{20}^D = -17.1^\circ$ (2.0, DMF)

SMHR masse calculée pour $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}^+(\text{MH}^+)$ 403.13, trouvée, 403.13

RMN¹H (300 MHz, CD₃OD, ppm): $\delta = 2.82\text{-}2.99$ (m, 3H), $3.12\text{-}3.20$ (m, 1H), $4.41\text{-}4.48$ (m, 1H), $4.58\text{-}4.64$ (m, 1H), 5.00 (s, 2H), $7.16\text{-}7.33$ (m, 10H)

RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD, ppm) : $\delta = 26.69; 38.90; 55.84; 57.73; 67.56; 127.04; 127.70; 128.65; 128.89; 129.42; 130.34; 138.10; 138.45; 158.24; 172.72; 174.09$

Cbz-L-Phe-L-Ser

Départ : 598.6 mg de Cbz-L-Phe (2 mmol, 1 éq.) dans 100 mL d'acétonitrile.

Rendement : 67 % (520.5 mg)

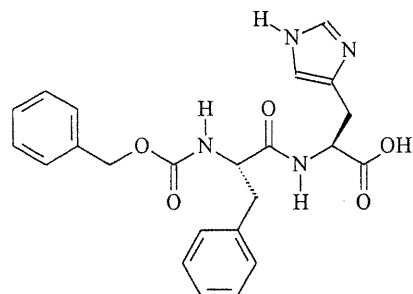
P.f. 148-149 °C, [Litt³¹ P.f. 147-148 °C, Litt²³ P.f. 155-156 °C]

$[\alpha]_D^{20} < 3^\circ$ (1.0, DMF) (valeur plus faible que la limite détectable avec la cellule utilisée) [Litt²³ $[\alpha]_D^{21} = -2.6^\circ$ (1.0, DMF)]

SMHR masse calculée pour $C_{20}H_{23}N_2O_6^+(MH^+)$ 387.16, trouvée, 387.15

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) : $\delta = 2.84-2.90$ (m, 1H), 3.18-3.23 (m, 1H), 3.82-3.95 (m, 2H), 4.47-4.52 (m, 2H), 4.97-5.05 (m, 2H), 7.19-7.36 (m, 10H)

RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, ppm) : $\delta = 39.09; 56.07; 57.72; 62.86; 67.53; 127.67; 128.59; 128.87; 129.40; 130.36; 138.09; 138.52; 158.26; 172.99; 174.13$

Cbz-L-Phe-L-His

Départ : 598.6 mg de Cbz-L-Phe (2 mmol, 1 éq.) dans 100 mL d'acétonitrile.

N.B. On fait précipiter le mélange avec une solution de HCl 6M. (pH= 3.29). Il est important de ne pas trop acidifier la solution car le précipité a tendance à se resolubiliser.

Rendement : 88% (770.3 mg)

P.f. 201-203 °C, [Litt¹⁸ P.f. 205-207 °C]

$[\alpha]_D^{20} = -8.0^\circ$ (1.0, DMF), [Litt¹⁸ $[\alpha]_D = -5.1^\circ$ (1.0, DMF)]

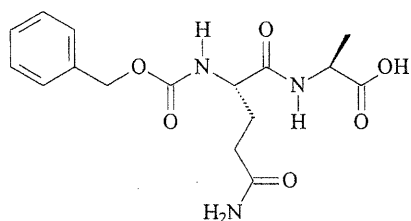
SMHR masse calculée pour $C_{23}H_{25}N_4O_5^+(MH^+)$ 437.18, trouvée, 437.18

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) : $\delta = 2.68-2.74$ (m, 1H), 2.90-3.04 (m, 3H), 4.24-4.30 (m, 1H), 4.42-4.47 (m, 1H), 4.83-4.97 (m, 2H), 6.91 (s, 1H), 7.10-7.34 (m, 10H), 7.55 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, N-H), 7.70 (s, 1H), 8.37 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, N-H)

RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, ppm) : 31.27; 39.91; 54.92; 58.72; 67.84; 119.24; 128.86; 130.05; 130.30; 130.67; 130.93; 131.84; 135.69; 137.21; 139.63; 140.82; 158.49; 174.15; 175.41

5.3 Synthèses suivant le protocole général avec étape A, B et C avec produits finaux qui précipitent

Cbz-L-Gln-L-Ala



Départ : 432 mg de Cbz-L-Gln (1.54 mmol, 1éq.) dans 100 mL d'acétonitrile.

Rendement : 66% (355 mg)

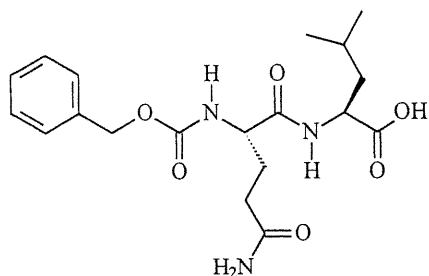
P.f. 218-219 °C, [Litt¹⁸ P.f. 219-220 °C]

$[\alpha]_D^{20} = -1.5^\circ$ (1.5, DMF), [Litt¹⁸ $[\alpha]_D = -1.5^\circ$ (1.5, DMF)]

SMHR masse calculée pour $C_{16}H_{22}N_3O_6^+(MH^+)$ 352.15, trouvée, 352.15

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) : $\delta = 1.19-1.28$ (m, 3H), 1.66-1.74 (m, 1H), 1.87-1.93 (m, 1H), 2.07-2.19 (m, 2H), 3.98-4.03 (m, 1H), 4.16-4.21 (m, 1H), 5.02 (s, 2H), 6.76 (s, 1H, N-H) 7.24-7.41 (m, 7H, aromatique+N-H) 8.19 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, N-H)

RMN¹³C (DMSO-d₆, 100MHz, ppm) : $\delta = 18.17$; 28.88; 32.53; 48.48; 55.07; 66.41; 128.72; 128.81; 129.38; 138.04; 156.91; 172.45; 174.85; 175.08

Cbz-L-Gln-L-Leu

Départ : 215.8 mg de Cbz-L-Gln (0.77 mmol, 1éq.) dans 40 mL d'acétonitrile.

Rendement avant recristallisation : 70% (213.3mg). Après recristallisation avec EtOAc.

Rendement : 46% (140.5mg)

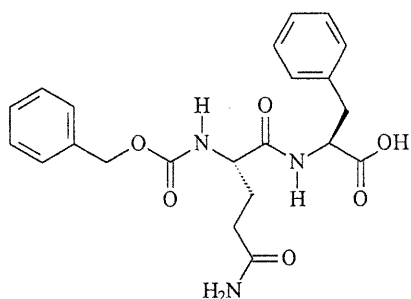
P.f. 181-182 °C, [Litt³³ P.f.178-181 °C]

$[\alpha]_{20}^D = -5.3^\circ$ (2.0, DMF).

SMHR masse calculée pour C₁₉H₂₇O₆N₃Na (MNa⁺) 416.18, trouvée, 416.18

RMN¹H (CD₃OD-d₄, 400MHz, ppm) : $\delta = 0.91-0.97$ (m, 6H), 1.65 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.73-1.78 (m, 1H) 1.87-1.97 (m, 1H), 2.02-2.13 (m, 1H), 2.34 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.17-4.20 (m, 1H), 4.45 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 7.28-7.37 (m, 5H)

RMN¹³C (CH₃OH-d₄, 400MHz, ppm) : $\delta = 21.76; 23.37; 25.91; 29.22; 32.43; 41.51; 52.05; 55.61; 67.66; 128.82; 128.98; 129.44; 138.12; 158.29; 174.29; 175.89; 177.92$.

Cbz-L-Gln-L-Phe

Départ : 432 mg de Cbz-L-Gln (1.54 mmol, 1éq.) dans 100 mL d'acétonitrile.

Rendement : 79% (523 mg)

P.f. 198-199 °C, [Litt¹⁸ P.f. 199-200 °C]

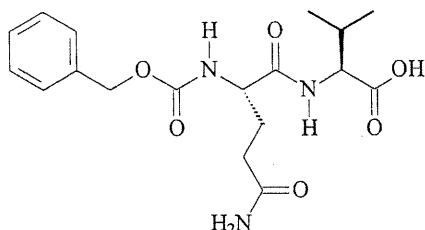
$[\alpha]_{20}^D = 4.7^\circ$ (1.0, DMF) [Litt¹⁸ $[\alpha]_D = 5.2^\circ$ (1.0, DMF)]

SMHR masse calculée pour $C_{22}H_{26}N_3O_6^+(MH^+)$ 428.18, trouvée, 428.18

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) : δ = 1.63-1.68 (m, 1H), 1.81-1.90 (m, 1H), 2.02-2.17 (m, 2H); 2.88 (dd, J = 13.6, 8.3Hz, 1H), 3.03 (dd, J = 13.9, 5.2Hz, 1H) 3.97-4.03 (m, 1H), 4.39-4.33(m, 1H), 5.01 (s, 2H), 6.76 (s, 1H), 7.19-7.42 (m, 12H), 8.11 (d, J = 7.7Hz, 1H)

RMN¹³C (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) : δ = 28.85; 32.50; 37.71; 54.42; 55.20; 66.44; 127.47; 128.72; 128.82; 129.19; 129.38; 130.20; 138.00; 138.38; 156.84; 172.65; 173.80; 174.78

Cbz-L-Gln-L-Val



Départ : 432 mg de Cbz-L-Gln (1.54 mmol, 1éq.) dans 100 mL d'acétonitrile.

Rendement : 44 % (259 mg)

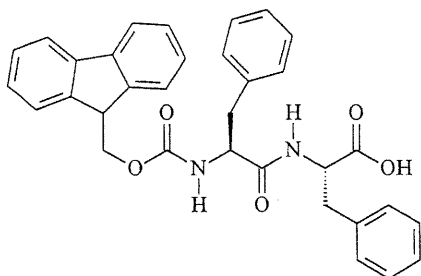
P.f. 191-192 °C, [Litt³⁴ P.f. 193-194 °C]

$[\alpha]_D^{20} < 3^\circ$ (1.06, 95% acide acétique) (valeur plus faible que la limite détectable avec la cellule utilisée) [Litt³⁴ $[\alpha]_D^{24} = 1.4^\circ$ (1.06, 95% acide acétique)]

SMHR masse calculée pour $C_{18}H_{26}N_3O_6$ 380.18, trouvée, 380.18

RMN¹H (400 MHz, CD₃OD, ppm) : δ = 0.90-0.99 (m, 6H), 1.89-1.96 (m, 1H), 2.04-2.12 (m, 1H), 2.16-2.22 (m, 1H) 2.34 (t, J = 7.6Hz, 2H), 4.22-4.26 (m, 1H), 4.33-4.37 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 7.27-7.37 (m, 5H)

RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD, ppm) : δ = 18.14; 19.52; 29.12; 31.67; 32.46; 55.65; 59.02; 67.66; 128.83; 128.98; 129.44; 138.11; 158.35; 174.56; 174.65; 177.89

Fmoc-L-Phe-L-Phe

Départ: 300 mg de Fmoc-L-Phe (0.77 mmol, 1éq.) dans 45 mL de dichlorométhane distillé. Solvant pour couplage : THF

Rendement : 82% (337mg)

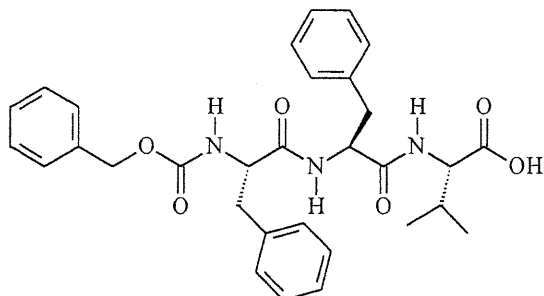
P.f. 190-192 °C

$[\alpha]_D^{20} = -6.2^\circ$ (2.0, DMF)

SMHR masse calculée pour $C_{33}H_{31}O_5N_3^+(MH^+)$ 535.22, trouvée, 535.22

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) : $\delta = 2.75$ (t, $J = 13.2$ Hz, 1H), 2.94-3.03 (m, 2H), 3.05-3.13 (m, 1H), 3.99-4.20 (m, 3H), 4.27-4.32 (m, 1H), 4.47-4.53 (m, 1H), 7.12-7.45 (m, 14H), 7.62 (dd, $J = 16.4, 8.7$ Hz, 3H), 7.87(d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 8.30(d, $J = 7.6$ Hz, 1H)

RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, ppm) : $\delta = 37.71$; 38.44; 47.57; 54.52; 57.00; 66.69; 121.10; 126.31; 126.39; 127.26; 127.49; 128.09; 128.66; 129.22; 130.20; 130.28; 138.40; 139.17; 141.68; 144.78; 156.73; 172.69; 173.82

Cbz-L-Phe-L-Phe-L-Val

Départ : de 461 mg de Cbz-L-Phe (1.54 mmol, 1éq.) dans 50 mL d'acétonitrile. Après 2 heures, l'acétonitrile est enlevé par évaporation sous vide et de l'eau distillée est ajoutée pour obtenir 230 mL de la solution. La solution est mise dans un bain de glace et

acidifiée avec une solution de HCl 6M. (pH < 2). Un précipité apparaît avec le temps. La solution est filtrée, et le solide retenu est rincé 3 fois avec une solution de HCl 1M. Le solide est séché sous vide une nuit à 50°C. Une fois séché, le solide est dissout dans 75 mL d'acétonitrile. Puis le dipeptide est activé de la même façon que précédemment. Après 10 minutes d'activation, un précipité apparaît, 30 mL d'acétonitrile sont alors ajoutés. Le précipité ne se solubilise pas. On laisse réagir pour 50 minutes puis, l'acétonitrile est enlevé par évaporation sous vide. Au solide obtenu, 75 mL d'acétone, 25 mL d'eau distillée et 8 µL de Et₃N sont ajoutés. Après 10 minutes, à température de la pièce, la solution du deuxième acide aminé est ajoutée goutte-à-goutte. La solution du deuxième acide aminé est préparée en mélangeant 721 mg de L-valine dans 50 mL d'eau distillée et 852 µL Et₃N. Le mélange réactionnel est trouble. Après 15 minutes, 40 mL d'acétone sont ajoutés. Après 1 heures 40 minutes, 40 mL d'eau distillée sont ajoutés. Après 2 heures 30 minutes, 100 mL d'éthanol 95% et 100 mL de chloroforme sont ajoutés. Après 3 heures de réaction, les solvants organiques sont évaporés sous vide. De l'eau distillée est ajoutée à la solution restante pour obtenir 250 mL de solution. Un solide est présent dans la solution, celui-ci est enlevé par filtration et séché sous vide à 50°C pour 4 heures (ce produit semble être, d'après la RMN¹H du dipeptide activé non réagit ≈ 0.16 mmol). Puis le tripeptide est précipité à 4 °C en ajoutant une solution de HCl 6M au filtrat. On laisse précipiter pour la nuit. Le solide obtenu est filtré et mis sous vide à 50°C pour 4 heures. Le tripeptide obtenu est presque totalement pur il contient moins de 10% de p-nitrophenol. Rendement 66% (559.5 mg). Le produit est ensuite recristallisé dans le toluène.

Rendement 36% (306,4 mg)

P.f.: 192-193°C

$[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ (2.0, DMF),

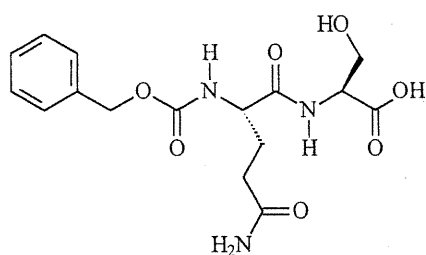
SMHR masse calculée pour C₃₁H₃₆N₃O₆⁺(MH⁺) 546.26, trouvée, 546.26

RMN¹H (400 MHz, CD₃OD, ppm) : δ = 0,85-0,97 (m, 6H); 2,10-2,18 (m, 1H); 2,70-3,17 (m, 4H); 4,26-4,41 (m, 2H); 4,74-4,79 (m, 1H); 4,97-5,02 (m, 2H); 7,10-7,33 (m, 15H)

RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD, ppm) : δ = 18.42; 19.57; 31.86; 38.74; 38.98; 55.73; 57.81; 59.11; 67.52; 127.69; 128.63; 128.88; 129.37; 129.41; 129.51; 130.28; 130.36; 130.47; 138.10; 138.33; 138.49; 158.13; 173.37; 173.86; 174.37.

5.4 Synthèse suivant le protocole général avec étape A, B et C avec produits finaux qui ne précipitent pas.

Cbz-L-Gln-L-Ser



Départ : 432 mg de Cbz-L-Gln (1.54 mmol, 1éq.) dans 100 mL d'acétonitrile. Lorsque la réaction est terminée, l'acétonitrile est enlevé par évaporation sous vide puis de l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume de 150 mL. La solution est mise dans un bain de glace et acidifiée avec une solution de HCl 6M. (pH=3.06). Aucun précipité n'apparaît avec le temps. La solution est donc extraite avec de l'EtOAc afin d'enlever le p-nitrophénol. La phase aqueuse est ensuite évaporée sous vide. Le solide obtenu est séché sous vide une nuit à 50°C. Ensuite, il est trituré avec du chloroforme à 0°C puis filtré et séché. Le solide est conservé sous vide une nuit. Puis il est trituré avec de l'eau à 0°C puis séché sous vide une nuit. Rendement : 30% (175.2 mg)

P.f. 216-217 °C

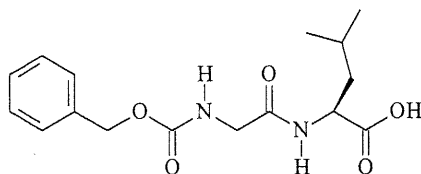
$[\alpha]_{20}^D = 14.3^\circ$ (2.0, DMF)

SMHR masse calculée pour C₁₆H₂₂N₃O₇⁺(MH⁺) 368.15, trouvée, 368.15

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) : δ = 1.66-1.71 (m, 1H), 1.88-1.91 (m, 1H), 2.09-2.16 (m, 1H), 3.60 (dd, $J = 10.9, 4.1$ Hz, 1H), 3.72 (dd, $J = 10.8, 4.8$ Hz, 1H) 4.04-4.08 (m, 1H), 4.21-4.27 (m, 1H), 5.01 (s, 2H), 6.75 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.28-7.36 (m, 5H), 7.44 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.00(d, $J = 7.8$ Hz, 1H) RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, ppm) : δ

= 28.96 ; 32.51; 55.19; 55.57; 62.38; 66.43; 128.71; 128.81; 129.39; 138.03; 156.93;
172.75; 172.91; 174.87

Cbz-Gly-L-Leu



Départ 418.4 mg de Cbz-Gly (2 mmol, 1éq.) dans 100 mL d'acétonitrile. Après 2 heures, l'acétonitrile est enlevé par évaporation sous vide et de l'eau distillée est ajoutée pour obtenir 400 mL de la solution qui est mise dans un bain de glace et acidifiée avec une solution HCl 6M (pH < 2). La phase aqueuse est ensuite extraite 4 fois avec 200 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique recueillie est ensuite séchée avec du MgSO₄. Le solvant est enlevé par évaporation sous vide. Le solide obtenu est purifié sur une colonne de gel de silice. L'éluant utilisé est un mélange 59/40/1 acétate d'éthyle/hexane/acide acétique changé ensuite pour un mélange 99/1 acétate d'éthyle/acide acétique après l'élution du p-nitrophénol. Après évaporation des fractions, un solide collant est obtenu, qui est mélangé à de l'éther diéthylique puis mis sous vide à quelques reprises, jusqu'à ce qu'un solide blanc soit obtenu.

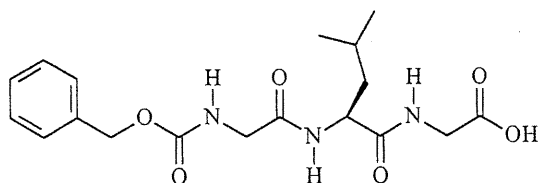
Rendement : 71% (457 mg)

P.f.: 100-101 °C [Litt³⁵ P.f. 100-102 °C, Litt¹⁸ P.f. 142.5-143 °C]

SMHR masse calculée pour C₁₆H₂₃N₂O₅⁺(MH⁺) 323.16, trouvée, 323.16

RMN¹H (300 MHz, CHCl₃-d₁, ppm): δ = 0.92 (s, 6H), 1.53-1.70 (m, 3H), 3.82-4.02 (m, 2H), 4.57-4.63 (m, 1H), 5.11 (s, 2H), 5.87 (m, 1H), 6.88-6.90 (m, 1H), 7.28-7.38 (m, 5H)

RMN¹³C (100 MHz, CHCl₃-d₁, ppm): δ = 21.68; 28.81; 24.79; 40.77; 44.27; 50.86; 67.30; 128.04; 128.27; 128.56; 135.97; 156.99; 170.09; 175.72.

Cbz-Gly-L-Leu-Gly

Départ: 444.7 mg de Cbz-Gly-L-Leu (1.38 mmol, 1éq.) dans 100 mL d'acétonitrile. Après 2 heures, l'acétonitrile est enlevé par évaporation sous vide. Ensuite, de l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final de 350 mL de la solution. Le mélange est acidifié avec une solution de HCl 6M (pH < 2). La phase aqueuse est ensuite extraite 5 fois avec 200 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique recueillie est ensuite sécher avec du MgSO₄. Le solvant est ensuite enlevé par évaporation sous vide. Le solide obtenu est ensuite purifié sur un colonne de gel de silice. L'éluant utilisé est un mélange 99/1 acétate d'éthyle/acide acétique.

Rendement de 58% (303 mg)

P.f. 157-158°C, [Litt³⁶ P.f. 110°C]

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.9^\circ$ (4, DMF), [Litt³⁶ $[\alpha]_{\text{D}}^{19} = -14.7^\circ$ (4, DMF)]

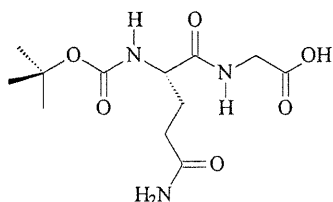
SMHR masse calculée pour C₁₈H₂₆N₃O₆⁺(MH⁺) 380.18, trouvée, 380.18

RMN¹H (400 MHz, CD₃OD, ppm) : $\delta = 0.87\text{-}0.97$ (m, 6H), 1.59-1.70 (m, 3H), 3.82 (s, 2H), 3.90 (s, 2H), 4.47-4.51 (m, 1H), 5.11 (s, 2H), 7.29-7.38 (m, 5H)

RMN¹³C (100MHz, CD₃OD, ppm) : 21.79; 23.51; 25.76; 41.69; 41.77; 44.90; 52.87; 67.86; 128.89; 129.02; 129.45; 138.05; 159.19; 172.26; 172.80; 175.09.

5.5 Autres synthèses analogues au protocole général avec de légères modifications

Boc-L-Gln-Gly



Activation suivant le protocole général étape A. Au départ 985 mg de Boc-L-Gln (4 mmol, 1 éq.) dans 200 mL d'acétonitrile.

Après 60 minutes, l'acétonitrile est enlevé par évaporation sous vide. Le solide obtenu est trituré avec de l'eau (environ 90 mL au total). Puis le solide conservé est dissout dans 100 mL d'acétonitrile. La solution du deuxième acide aminé est ajoutée goutte-à-goutte au mélange réactionnel. La solution du deuxième acide aminé est préparée en mélangeant 330.60 mg de glycine (4.4 mmol, 1.1 éq.) à 100 ml d'eau contenant 1.34 g de bicarbonate de sodium (16 mmol, 4 éq.). Après l'ajout de la solution du deuxième acide aminé, 48.8 mg de DMAP sont ajoutés (0.4 mmol, 0.1 éq.). Après une nuit, l'acétonitrile est évaporé sous vide. Puis, à la solution restante de l'eau fut ajoutée pour obtenir un volume de 200 mL. Le pH est ajusté à 4.67 avec une solution de HCl 6 M. La solution est extraite 6 fois avec 200 mL d'acétate d'éthyle afin d'enlever le p-nitrophénol. Puis la phase aqueuse est acidifiée à un pH < 2. Celle-ci est extraite 12 fois avec 200 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique de la deuxième extraction est séchée avec du MgSO₄. L'acétate d'éthyle est enlevé par évaporation sous vide. Le solide obtenu est recristallisé dans l'acétate d'éthyle/hexane.

Rendement : 35% (435 mg)

P.f. 85-90 °C

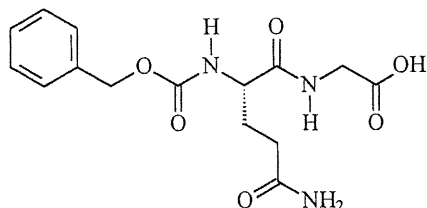
$[\alpha]_{D}^{20} = -7.5^{\circ}$ (2.0, DMF)

SMHR masse calculée pour C₁₂H₂₁N₃O₆ 303.14, trouvée, 303.14

RMN¹H (400 MHz, CD₃OD, ppm) : δ = 1.44 (s, 9H), 1.86-1.96 (m, 1H), 2.04-2.13 (m, 1H), 2.34 (t, J = 7.5Hz, 2H), 3.86-4.02 (m, 2H), 4.03-4.13 (m, 1H)

RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD, ppm) : δ 28.66; 29.25; 32.50; 41.82; 55.44; 80.70; 157.75; 172.82; 174.93; 177.99

Cbz-L-Gln-Gly



Activation suivant le protocole général étape A. Au départ À 560.6 mg de Cbz-L-Gln (2 mmol, 1éq.) dans 100 mL d'acétonitrile. Après 45 minutes l'acétonitrile est enlevé par évaporation sous vide. Le solide obtenu est trituré en 4 fois avec 10 mL d'eau distillée afin d'enlever le chlorure de Et₃NH⁺ et la Et₃N. Puis, le solide conservé est dissout dans 100 mL d'acétonitrile. Puis le protocole C est suivi mais en utilisant le NaHCO₃ plutôt que ET₃N. Après 1 heures 15 minutes de réaction 24.4 mg (0.2 mmol, 0.1 éq) de DMAP sont ajoutés. Le mélange reste ainsi pour environ 45 minutes. Ensuite le mélange est acidifié à pH < 3 avec une solution de HCl 6 M. L'acétonitrile est ensuite enlevé par évaporation sous vide. Le solide obtenu est trituré 3-4 fois avec 25 mL d'acétate d'éthyle. Puis le solide restant est mélangé avec 100mL d'éthanol 95% bouillant. La solution est filtrée. Le solide retenu sur le filtre poreux est rincé avec 10 mL d'éthanol 95%. Une grande partie du NaCl formé est ainsi conservée sur le filtre. L'éthanol est ensuite enlevé par évaporation sous vide. Le solide obtenu après avoir enlevé l'éthanol est rincé quatre fois avec 6 mL et une fois 3 mL d'eau distillée à 0°C. Le solide est séché pour 12 heures sous vide à 60°C.

Rendement : 65% (435.5 mg)

P.f 183-184 °C, [Litt.*P.f. 182-183 °C]

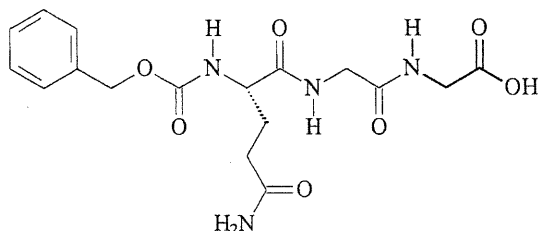
$[\alpha]_D^{20} = -3.9^\circ$ (1.0, DMF) [Litt.* $[\alpha]_D^{20} = -3^\circ$ (1.0, DMF)]

analyse élémentaire trouvée: N 12.23, C 53.43, H 5.87, théorique: N 12.46, C 53.41, H 5.68

RMN¹H (300 MHz, CD₃OD, ppm) : 1.86-1.98 (m, 1H), 2.05-2.16 (m, 1H), 2.33(t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.81-4.00 (m, 2H), 4.14-4.20 (m, 1H), 5.08 (s,2H), 7.26-7.41 (m, 5H).

*Valeurs de P.f. et de $[\alpha]_D^{20}$ comparées avec celles du produit commercial (Sigma Chemical Compagny, St-Louis, MO USA).

Cbz-L-Gln-Gly-Gly



À une solution 337.3 mg de Cbz-L-Gln-Gly (1 mmol, 1 éq.) dans 100 mL d'acétonitrile sont ajoutés 155 μ L de Et₃N (1.1 mmol, 1.1 éq.). La solution est ensuite mise dans un bain de glace et 222 mg CINp (1.1 mmol, 1.1 éq.) sont ajoutés. Après 5 minutes, 12.2 mg DMAP (0.1 mmol, 0.1 éq.) sont ajoutés. Après 30 minutes, 50 mL d'acétonitrile et 50 mL de dichlorométhane sont rajoutés au mélange réactionnel. Après 2 heures les solvants sont enlevés par évaporation sous vide. Le solide obtenu est trituré plusieurs fois avec de l'eau à 0°C (environ 50 mL au total). Puis, le solide conservé est dissout dans 100 mL d'acétone. La solution du deuxième acide aminé est ajoutée goutte-à-goutte au mélange réactionnel. La solution du deuxième acide aminé est préparée en mélangeant 330.3 mg de glycine (4 mmol, 4 éq.) à 100 mL d'eau contenant 336 mg de bicarbonate de sodium (4 mmol, 4 éq.). Après 10 minutes, 12.2 mg de DMAP sont ajoutés (0.1 mmol, 0.1 éq.) ainsi que 50 mL d'eau distillée et 50 mL d'acétone. La solution s'éclaircit après 20 minutes de réaction. On laisse réagir environ 2 heures puis l'acétone est enlevé par évaporation sous vide. De l'eau distillée est ajoutées au mélange pour obtenir un volume de 150 mL. Puis le pH est ajusté à 3.46 avec une solution de HCl 6M. La solution est ensuite extraite avec 4 fois 75 mL d'éther diéthylique afin d'enlever le p-nitrophénol. La phase aqueuse est ensuite enlevée par évaporation sous vide. Le solide obtenu est conservé sous vide pour une nuit. Le solide est ensuite dissout dans un minimum d'éthanol 95% bouillant. Puis la solution est filtrée, une partie du NaCl formé lors de l'acidification est ainsi enlevée. Le filtrat est évaporé sous vide. Le

solide obtenu après évaporation sous vide est rincé en plusieurs fois avec 40 mL d'eau à 0°C. Le solide non solubilisé est séché sous vide pour 2 heures 30 minutes à 70°C.

Rendement : 46% (183 mg)

P.f. 184-185 °C

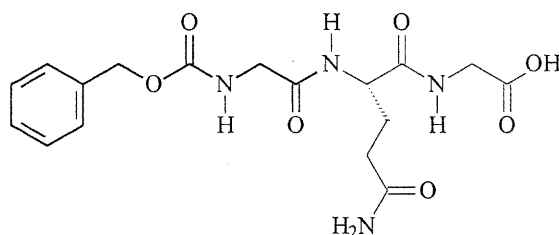
$[\alpha]_D^{20} < \pm 1^\circ$ (2.0, DMF)

analyse élémentaire trouvée N 14.05, C 51.98, H 5.78, théorique N 14.21, C 51.77, H 5.62

RMN¹H (300 MHz, CD₃OD, ppm) : δ = 1.91-2.01 (m, 1H), 2.02-2.12 (m, 1H), 2.32 (t, J = 7.5Hz, 2H), 3.82-3.95 (m, 4H), 4.07-4.13 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 7.27-7.38 (m, 5H)

RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD, ppm): 28.55; 32.40; 41.63; 43.55; 56.33; 67.89; 128.88; 129.03; 129.46; 138.00; 158.70; 171.94; 172.89; 174.85; 177.79

Cbz-Gly-L-Gln-Gly



Premier couplage selon les protocoles généraux A et C. Départ 836.8 mg de Cbz-Gly (4 mmol, 1éq.) dans 200 mL d'acétonitrile. Lorsque la réaction est terminée, l'acétonitrile est enlevé par évaporation sous vide. De l'eau distillée est ajoutée à la solution pour obtenir un volume final de 200 mL. La solution est acidifiée à pH= 4-5 avec HCl 6 M. La phase aqueuse est extraite 4 fois avec 200 ml d'acétate d'éthyle. Ensuite, la solution est acidifiée à pH < 2 et extraite 10 fois avec 200 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée avec du MgSO₄ puis le solvant est enlevé sous vide. Le solide obtenu (862.1 mg, 2.55 mmol.) avec un rendement de 64 % est presque pur d'après la RMN¹H et est solubilisé dans 128 mL d'acétonitrile. Les protocoles A et C sont répétés. Après 1 heure 30 minutes l'acétonitrile est enlevé sous vide. La solution est acidifiée à pH = 4-5 avec HCl 6 M. La phase aqueuse est extraite 4 fois avec 125 mL d'acétate d'éthyle. Ensuite, la solution est acidifiée à pH < 2 et laissée à 4°C pour deux

jours. Il n'y a pas de précipité. La solution est donc extraite en plusieurs fois avec un total de 3 litre d'acétate d'éthyle. Une solution saturée en NaCl est utilisée pour détruire les émulsions. La phase organique est séchée avec du MgSO_4 puis le solvant est enlevé sous vide. Le solide obtenu est recristallisé avec méthanol/chloroforme. Le filtrat de la recristallisation est concentré sous vide et le solide obtenu est recristallisé avec isopropyle alcool/dichlorométhane. Les deux solides sont combinés.

Rendement : 15% (241.7 mg)

P.f. 171-173 °C

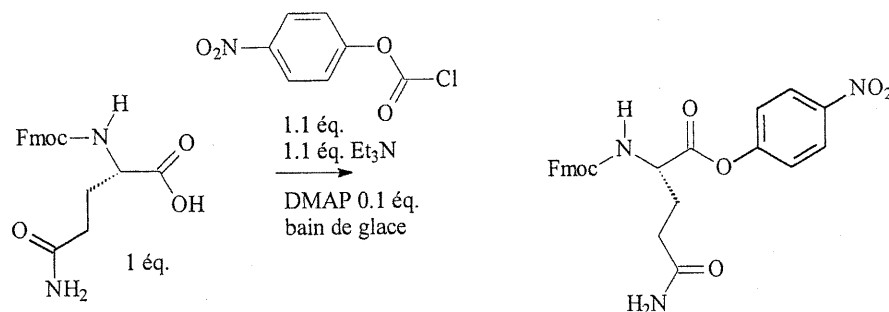
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13,0^\circ$ (2.0, CD_3OD)

SMHR masse calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_7^+(\text{MH}^+)$ 395.17, trouvée, 395.16

RMN^1H (300 MHz, CD_3OD , ppm) : $\delta = 1.90\text{-}1.99$ (m, 1H), 2.11-2.25 (m, 1H), 2.28-2.33 (m, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 4.41-4.46 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 7.27-7.38 (m, 5H)

RMN^{13}C (100 MHz, CD_3O , ppm) : $\delta = 28.87; 32.38; 41.74; 45.00; 53.90; 67.92; 128.88; 129.03; 129.46; 138.05; 159.24; 172.32; 172.82; 173.93; 177.92$

Fmoc-L-Gln-ONp (Arrêt après l'activation)



À une suspension de 736.8 mg de Fmoc-L-Gln (2 mmol, 1 éq.) dans 200 mL d'acétonitrile sont ajoutés 306.6 μL de Et_3N (2.2 mmol, 1.1 éq.). Le composé n'est pas totalement soluble. La solution est mise dans un bain de glace. Puis, 443.5 mg de ClNp (2.2 mmol, 1.1 éq.) sont ajoutés. Après 5 minutes, 24.4 mg de DMAP (0.2 mmol 0.1 éq.) sont ajoutés. Après 40 minutes 100 mL d'acétonitrile sont ajoutés. Après 45 minutes 278 μL de Et_3N (2 mmol, 1 éq.) sont ajoutés. On laisse réagir ainsi pour 12 heures en laissant revenir à la température de la pièce. À la fin la solution est beaucoup plus claire. Le

solvant est ensuite évaporé sous vide. Puis le solide obtenu est purifié sur une colonne de gel de silice. Éluant : 59/40/1 EtOAc/Hexanes/acide acétique jusqu'à l'élution complète d'une impureté, puis changement pour 99/1 EtOAc/acide acétique pour éluer le produit désiré assez rapidement.

Rendement 40 % (420.3 mg)

P.f. 175-177 °C, [Litt⁵ P.f. 182-185 °C]

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -47.0^\circ$ (2.0, DMF/acide acétique 99/1), [Litt⁵ $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -40.3^\circ$ (1-2^a, DMF/acide acétique 99/)]. a) La littérature rapporte la concentration pour le $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ comme écrit ci-haut

SMHR. masse calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_7^+(\text{MH}^+)$ 490.16, trouvée, 490.16

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) : $\delta = 1.94\text{-}2.02$ (m, 1H), 2.11-2.19 (m, 1H), 2.28 (t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 4.26(t, $J = 6.8\text{Hz}$, 1H), 4.30-4.42 (m, 3H), 6.86(s, 1H), 7.28-7.43(m, 7H), 7.72 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 7.89 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 8.10 (d, $J = 7.1\text{Hz}$, 1H), 8.32(d, $J=9.1\text{Hz}$, 2H)

RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, ppm) : $\delta = 26.98$; 31.92; 47.64; 54.77; 66.83; 121.19; 124.05; 126.23; 126.44; 128.13; 128.70; 141.78; 144.76; 146.22; 156.24; 157.29; 171.67; 174.24

Deuxième Partie**Enzymologie**

6.1 Historique sur l'enzymologie

6.1.1 Les enzymes dans l'Antiquité

Les enzymes sont des macromolécules qui catalysent des processus biologique dans tous les organismes vivants. Leurs propriétés catalytiques sont des plus intéressantes et sont grandement étudiées. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués avec les enzymes est d'une aide précieuse pour la conception de médicaments, pour la fabrication d'aliments ainsi que pour des applications industrielles et environnementales^{37;38}. En ce qui à trait à la fabrication d'aliments, c'est sans doute cette application des enzymes qui est connue et employée depuis le plus longtemps par l'homme. La fermentation est à la base un processus enzymatique. Les premières références concernant l'utilisation de microorganismes comme source d'enzyme remonte à 2100 avant Jésus Christ. Les codex de Hammurabi dans l'ancienne Babylone décrivent une méthode de fabrication du vin³⁸. Dans la transformation des produits laitiers les enzymes furent utilisées depuis longtemps. De façon inusitée Homer publiait sur les processus enzymologiques dans les Iliade comme le rapporte de façon intéressante Copeland³⁸. Homer écrivait: "*As the juice of the fig tree curdles milk, and thickens it in a moment though it be liquid, even so instantly did Paeëon cure fierce Mars.*"³⁸ Copelend mentionne que la substance impliquée est le Ficin extrait des figuier. Par contre il ne mentionne pas comment Paeëon guérissa Mars...

De même, l'implication des enzymes dans la fabrication du pain est utilisé depuis l'antiquité³⁸. L'attendrissement des viandes par des enzymes est une autre utilité de ces dernières qui est utilisé depuis des siècles³⁸. Bien sûr, à cette époque les enzymes étaient utilisées à la suite d'observations empiriques mais on s'intéressait aux résultats et beaucoup moins à ce qui intervenait lors du procédé.

6.1.2 *Les premières études plus systématiques.*

Les premières études plus systématiques des phénomènes impliquant les enzymes remontent au 18^e et 19^e siècle. Il est très intéressant de voir comment les premières études furent effectuées. Le livre écrit par Copeland mentionne plusieurs expériences qu'il serait intéressant de mentionner. Mais, dans le but de ne pas trop alourdir ce bref résumé historique, il ne sera mentionné que les travaux de Réaumur (1683-1757). Celui-ci démontra que la digestion était un phénomène chimique plutôt que purement physique. Pour ce faire, il utilisa un tube de métal troué contenant un morceau de viande à l'intérieur. Il introduisit ce morceau de métal dans l'estomac d'une buse (sorte d'oiseau) et constata que le morceau de viande était digéré en 24 heures par les suc gastriques (qu'il appelait solvant) avec lesquels le morceau de viande était en contact. Il fit des expériences du même type avec un morceau d'os ou de plante. L'os fut grandement amolli tandis que le morceau de plante resta intact. Ceci correspond, toujours selon Copeland, aux premières études de spécificité d'une enzyme³⁸.

6.1.3 *La découverte des enzymes en tant qu'unité réactive et isolable*

C'est évidemment plus tard que l'existence des enzymes fut reconnue et que celles-ci furent isolées d'organismes. La première identification acceptable d'une enzyme se produisit en 1833, lorsque Payen et Persoz aperçurent qu'ils pouvaient isoler une substance thermolabile d'un précipité de l'alcool de malt³⁷. Ils avaient appelé cette substance diastase qui maintenant porte le nom d'amylase. Ensuite, au fil des premières études enzymologiques, la terminologie des enzymes se développa. Il est intéressant de noter que le mot enzyme viendrait de W. Kühne qui, en 1878, décrivait qu'il se produisait quelque chose dans la levure. Enzyme vient de l'allemand " en zyme" et signifie "dans la levure"³⁷. Au cours de ces années, une controverse entourait les enzymes. Liebig soutenait que la fermentation et les autres processus similaires étaient dus à l'action de substances chimiques. D'une autre part, Pasteur soutenait que le processus de fermentation ne pouvait être dissocié des cellules vivantes. Cette controverse trouva une fin lorsque Buchner réussit à obtenir une fermentation de la levure dans un extrait sans cellule³⁷. Tout au cours du 19^e siècle, une meilleure connaissance chimique des enzymes entraîna le développement des études de spécificité

et de réactivité des enzymes. C'est à celui que l'on appelle le père de l'enzymologie, Emil Fischer que l'on doit l'analogie de la clef et de la serrure "lock and key". C'est lui qui développa l'idée de l'importance de la structure enzyme substrat aux environs de 1894.

C'est vers 1920 que les purifications d'enzymes devinrent plus efficaces. Ceci permit donc la première recristallisation d'une enzyme, l'uréase, par Summer en 1926. Ces résultats furent publiés³⁸. Bien évidemment, un haut niveau de scepticisme accompagna toutes ces études^{37;38}. Qu'importe, cette découverte entraîna rapidement la recristallisation de plusieurs autres enzymes et 20 ans après la publication de Summer plus de 130 enzymes furent recristallisées³⁸.

À l'époque de Summer certains disaient que la séparation des enzymes était non acceptable pour des études et que pour avoir une idée des processus biologiques il fallait faire des études sur des cellules non endommagées. Depuis, il a été démontré que les études *in vitro* d'enzymes peuvent être représentatives des processus *in vivo*. D'autres doutaient aussi que les enzymes puissent être recristallisées. Ils croyaient plutôt que celles-ci étaient fixées sur des protéines inertes qui elles, pouvaient être recristallisées³⁷. " *La conception des enzymes a donc évoluées d'une vague influence ou propriété dans certaines préparations, à des substances chimiques jusqu'à finalement des protéines spécifiques* " ³⁷. Depuis le départ, les enzymes étaient surtout rattachées à la digestion et à la fermentation, ce n'est qu'en 1937 que des enzymes furent isolées de cellules. Cette nouvelle étape de l'enzymologie, entraîna une meilleure compréhension des processus vitaux, tels que la respiration et la photosynthèse. Deux autres étapes importantes du 20^e siècle, sont le séquençage des enzymes au cours des années 60 puis la détermination de leurs structures tertiaires dans les années 70.

Dans ce bref résumé historique, il est important de noter que c'est vers 1950 que les premières enzymes transglutaminases (TGases) furent isolées. Les premières études d'activités de la transglutaminase extraite de foie de cobaye reviennent à Waelsch et ses collègues en 1957-60³⁹. Bien que ces chercheurs étudièrent les premiers cette enzyme, la majorité des travaux de départ avec cette enzyme s'effectuèrent dans les laboratoires de Folk des années 1960 à 1980.

6.1.4 *De plus en plus de possibilités*

Il est donc intéressant de voir comment les enzymes ont franchi les âges pour devenir une entité étudiée de façon très précise par certains chimistes. L'enzymologie est aujourd'hui une science de pointe dans le domaine pharmaceutique ainsi que dans les biotechnologies environnementales et industrielles. Au fil d'une meilleure connaissance, de plus en plus de possibilités d'applications réalistes surgissent pour les enzymes.

Les enzymes sont impliquées dans une multitudes de processus biologiques et une meilleure compréhension de ces enzymes est impérative à la découverte de solution à certains problèmes de santé. De plus, la possibilité d'isoler ces macromolécules fait miroiter plusieurs possibilités dans le domaine de la catalyse. Par exemple, les enzymes peuvent grandement simplifier certaines étapes de synthèse et s'avèrent aussi être de bons catalyseurs dans le traitement d'eau contaminée⁴⁰.

7.1 Les transglutaminases

7.1.1 Informations générales

Les transglutaminases, sont une famille d'enzymes dépendantes de l'ion calcium qui catalyse la condensation entre un résidu glutamine dans un peptide et un résidu lysine dans un second peptide. On retrouve des transglutaminases dans plusieurs processus physiologiques. Le plus connu est sans doute celui de la coagulation du sang où l'enzyme catalyse la réaction de liaison dans les caillots de fibrine⁴¹. Ce type d'enzyme est, par exemple, aussi impliqué dans l'adhésion cellulaire de l'épiderme humain⁴². Par contre, une suractivité de ce type d'enzyme peut aussi entraîner des désordres physiologiques tels la formation des cataractes dans les cristallins humains⁴³ ainsi que la formation de plaques d'amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer⁴⁴. Ce type d'enzyme serait aussi impliqué dans l'apoptose des cellules immunitaires provoquée par le VIH⁴⁵.

Il est donc d'intérêt de mieux connaître la spécificité et la réactivité de ce type d'enzyme. De cette façon, les chercheurs peuvent espérer contrer certains des désordres physiologiques reliés à cette enzyme. Il y a d'ailleurs beaucoup d'activités de recherche concernant les TGases^{7;42-48}. Ces études concernent souvent le facteur XIIIa impliqué dans la coagulation du sang et qui est la seule transglutaminase cristallisée et caractérisée par diffraction aux rayons X à ce jour⁴²⁻⁴⁵. Un des pionniers dans l'étude de ce type d'enzyme, c'est-à-dire Folk, a beaucoup contribué au développement de substrats pour certaines TGases. Ses études se concentrèrent presque exclusivement sur le facteur XIIIa et la TGase extraite de foie de cochon d'Inde^{49;50}. D'autres chercheurs ont aussi étudié ces deux enzymes. Une bonne révision des travaux sur ce type d'enzyme entre les années 1960 et 1980 se retrouve dans un résumé publié par Folk⁷.

Dans les laboratoires du professeur Jeffrey Keillor, les études sur ce type d'enzyme se font sur la transglutaminase extraite de foie de cochon d'Inde (TGases, E.C 2.3.2.13). L'enzyme est extraite et purifiée dans ses laboratoires à l'aide d'un protocole légèrement modifié⁴⁸ provenant de la littérature.

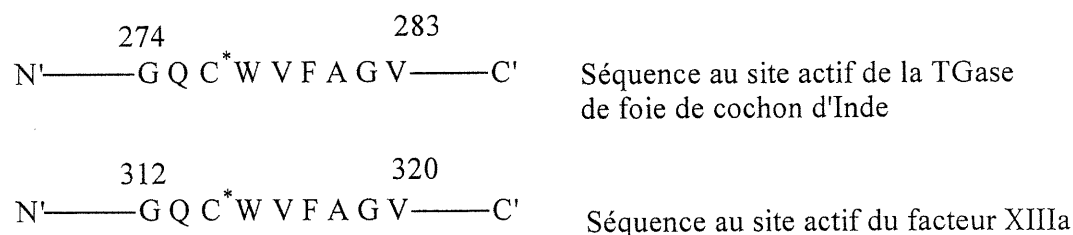
7.2 TGases de foie de cochon d'Inde facteur XIIIa et autres TGases du corps humain

7.2.1 Analogies

Une question qui peut être soulevée est la suivante: Pourquoi travailler avec une enzyme extraite de foie de cochon d'Inde? L'intérêt porté par les chercheurs envers cette enzyme provient de l'analogie de celle-ci avec le facteur XIIIa⁷ ainsi qu'avec toutes les TGases caractérisées à ce jour⁵¹. Les analogies sont, selon Folk, les suivantes: les deux ont besoin d'ions divalents pour réagir, la présence de métaux cations modifient leur conformation, ils ont la même structure primaire au site actif, ils possèdent une spécificité pour les amides aliphatiques, les intermédiaires enzymes-substrats sont formées par une interaction covalente, ces enzymes promeuvent l'acylation et les deux sont spécifiques aux résidus lysines. Il est donc généralement admis qu'ils réagissent selon un mécanisme catalytique commun⁷. Des études des séquences de ces deux enzymes ont démontré de très grandes analogies au niveau de la structure primaire du site actif (voir figure 7.1). Il est donc acceptable de faire les études sur la TGase venant du cochon d'Inde et de s'en servir comme support pour l'élaboration de solutions aux désordres physiologiques humain impliquant le facteur XIIIa. Cette analogie peut aussi être assumée pour d'autres TGases de l'Homme⁵¹⁻⁵³ ce qui laisse une porte ouverte pour résoudre des problèmes de santé impliquant différentes TGases. En fait, toute les TGases humaines présentent des analogies importantes au site actif⁵². Et encore plus convaincant, ces analogies se retrouvent avec les TGases de toutes les espèces animales⁵¹. Il y a donc lieu de croire que les informations obtenues avec la TGase extraite de foie de cochon d'Inde concernant le site actif seront applicables aux autres TGases. Le principal avantage d'utiliser l'enzyme de cochon d'Inde est que celle-ci est

très peu spécifique, comparativement à d'autres TGases, elle réagira donc facilement avec des substrats modifiés pour des fins d'analyses cinétiques. Par exemple, lors de l'étude de l'étape d'acylation de l'enzyme, une très grande panoplie de substrats fut essayée⁴⁷.

Figure 7.1) Analogie au site actif entre deux TGases



* Cystéine impliquée dans la catalyse au site actif

N' = Fonction amine terminal du peptide

C' = Fonction carboxyl terminal du peptide

7.2.2 Différences entre les TGases

Hormis les ressemblances au plan catalytique, il semble que ces enzymes présentent beaucoup moins d'analogies au niveau de leurs affinités pour les substrats. Les résultats des recherches effectuées par Folk et Gormann^{19;54} ont démontré que la TGase du foie de cochon d'Inde et le facteur XIIIa ont des spécificités très différentes. Tout nous porte à croire qu'il en est de même pour les autres TGases. D'ailleurs, l'homologie de la structure primaire complète des 15 différents membres de la famille des TGases se situe entre 25-45%^{51;52}. Les régions de faibles homologies seraient dues à la nécessité d'accepter différents substrats pour les différents membres de la famille des TGases^{51;52}.

7.3 Les études de substrats

7.3.1 Idées de base

L'étude que nous avons faite contribue à faire la lumière sur les résultats du passé qui quelques fois sont un peu pêle-mêle (essai avec pH différents, concentrations de sel différentes, variance entre les substrats de référence) et difficiles à comparer. Du même coup, ces études nous permettent de mieux comprendre la structure de l'enzyme.

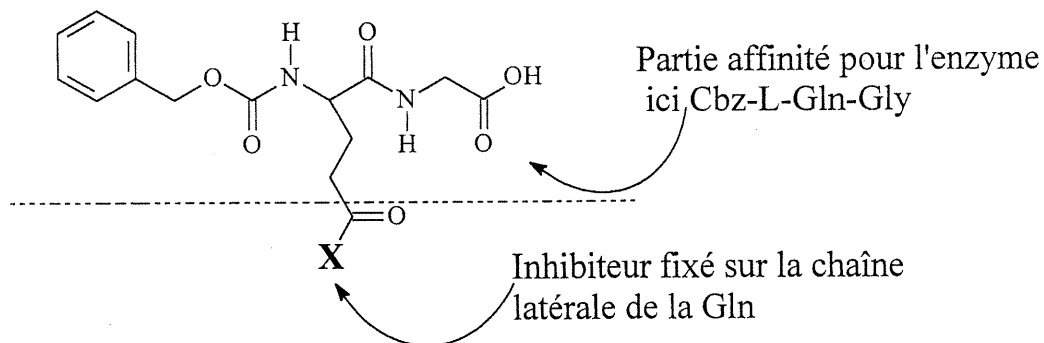
Au départ, vu les différences d'affinités enzymes-substrats pour les différentes TGases, il peut sembler plus ou moins utile d'étudier l'affinité entre l'enzyme du foie de cochon d'Inde et des substrats. Les meilleurs substrats développés pour la TGase du foie de cochon d'Inde pourraient s'avérer très mauvais pour les TGases impliquées dans les désordres pathologiques humains. Malgré ce fait, des études d'affinités enzyme-substrats pour la TGase de foie de cochon d'Inde comporte des intérêts. Manifestement, l'obtention d'un bon substrat pourrait être utile dans nos laboratoire étant donné que nous étudions intensivement cette enzyme.

Premièrement, un substrat plus efficace que la Cbz-L-Gln-Gly serait utile, dans des études d'inhibitions. Si l'on parvenait à synthétiser un substrat simple ayant une bonne affinité avec la TGase ce substrat pourrait être utilisé comme structure de base dans l'élaboration d'inhibiteur de la TGase de foie de cochon d'Inde. Comme il est démontré à la figure 7.2, la partie substrat peptidique pourrait être utilisée comme transporteur pour amener l'inhibiteur au site actif. L'inhibiteur serait fixé sur la chaîne latérale de la glutamine.

D'ailleurs, dans notre laboratoire certaines études d'inhibiteurs ont déjà été effectuées à l'aide de la Cbz-L-GLN-Gly comme structure de base. La chaîne latérale de la glutamine dans ce dipeptide était modifiée pour contenir l'inhibiteur⁴⁷. En développant un substrat possédant une meilleure affinité, il serait possible, entre autres, de tester plus facilement des inhibiteurs puisque ceux-ci seraient amenés de façon encore plus efficace au site actif. Les informations recueillies sur l'efficacité de la réaction de ces inhibiteurs au site actif de la TGase de foie de cochon d'Inde peuvent être utiles dans l'élaboration d'inhibiteurs pour d'autres TGases.

Deuxièmement, l'élaboration de meilleurs substrats pourrait être utile pour développer de nouveaux tests d'activités plus sensibles.

Figure 7.2) Inhibiteur de la TGase du foie de cochon d'Inde



Enfin, le développement de ces nouveaux substrats à l'aide de la méthode de synthèse développée dans nos laboratoires, sert à démontrer la pertinence de cette méthode de synthèse. Aussi, les différents substrats synthétisés peuvent servir comme librairie de base pour des études sur d'autres enzymes.

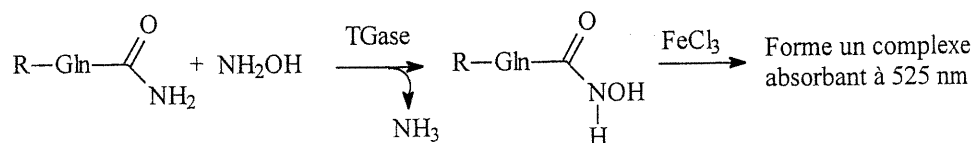
7.3.2 L'affinité TGase de foie de cochon d'Inde-substrat

Il est important de noter, à ce stade-ci, que les TGases lors de processus physiologiques doivent accommoder de très grosses molécules (e.g. fibrine). Cette caractéristique des TGases ne simplifie pas l'élaboration de petits substrats présentant de bonnes affinités. Les transglutaminases sont des enzymes qui présentent une spécificité plus ou moins grande dépendamment de leurs souches. La TGase extraite du foie de cochon d'Inde est par exemple moins spécifique que le facteur XIIIa. Ces deux dernières ont été beaucoup étudiées de façon conjointe due aux analogies mentionnées en introduction. Le substrat le plus communément utilisé, avec la TGase de foie de cochon d'Inde pour les études *in vitro*, est le Cbz-L-Gln-Gly. Celui-ci a probablement été choisi étant donné ses K_m et V_{max} acceptables par rapport à la simplicité de sa structure. Il est relativement simple à synthétiser et il ne compte qu'un stéréocentre. Sa structure est la plus simple trouvée pour un peptide qui réagira de façon acceptable avec

l'enzyme du foie de cochon d'Inde⁵⁰. Par contre, ses caractéristiques cinétiques peuvent être moins bonnes que celles de certaines macromolécules. Les caséines, spécialement la α_{s1} -caséine (voir figure 7.5) est un bon substrat pour l'enzyme^{19;55} (valeur de k_{cat}/K_m environ 10 fois plus élevée que pour Z-L-Gln-Gly). Cette partie de ce chapitre présente donc un résumé d'une certaine partie des travaux effectués par différents chercheurs pour mieux comprendre les différentes interactions qui régissent l'affinité TGase de foie de cochon d'Inde-substrats. Cette meilleure compréhension est nécessaire afin de développer de nouveaux substrats plus efficaces. Au fil des résultats, il sera décrit comment ceux-ci nous ont inspiré le développement de nos nouveaux substrats.

Premièrement, au point de vue de la littérature, il fut rapidement démontré que pour des études à l'aide de peptides, seule la glutamine permet la réaction d'acylation. Si celle-ci est remplacée par une asparagine, il n'y a aucune réaction. Il semble donc que l'enzyme soit spécifiquement adaptée pour accommoder la chaîne latérale de la glutamine dans son site actif⁷. De même, l'enzyme catalyse beaucoup moins efficacement les réaction avec la D-glutamine⁷. Cette TGase pourra dans certains cas présenter une certaine catalyse avec de petites molécules contenant un lien amide, tel l'acétamide et le propionamide⁷. Waelsch et ses collègues ont fait en 1961-62 des études avec de petits substrats peptidiques sur cette TGase. Leurs travaux bien que limités⁷ ont démontré une forte influence de certains acides aminés à proximité du résidu glutamine. Folk publia en 1965 certains résultats d'études des structures de substrats glutamine pour la même TGase⁵⁶. Le tableau VI résume ces études avec de petits substrats. La réaction étudiée est présentée à la figure 7.3. Le produit final (dérivé hydroxamate) absorbe à 525 nm lorsque mélangé avec du $FeCl_3$ ⁵⁷. De cette façon, l'auteur obtient des vitesses relatives, à l'aide des absorbances, en arrêtant la réaction par ajout de $FeCl_3$ au mélange réactionnel à différents temps³⁷.

Figure 7.3) Cinétique de Folk avec l'hydroxylamine (NH₂OH)



Ces résultats démontrèrent que le remplacement de la glycine par des acides aminés plus encombrés (L-Tyr, L-Leu) n'affectait pas l'affinité du substrat⁵⁶. Ces résultats manqueraient toutefois de précision à notre avis. En effet, Folk n'a fait que des études de vitesses de réaction à une concentration donnée sans déterminer de K_m ou de k_{cat} . Il utilise ces vitesses mesurées à une seule concentration pour dire que les résultats des composés 7 et 8 (voir tableau VI) démontrent que les acides aminés adjacents avec des chaînes latérales encombrées n'influencent pas l'efficacité des substrats. De même, il ne dit rien sur le fait que la tyrosine est un groupe polaire. Nos études ont entre autre servi à préciser ces résultats brutes de Folk.

Le fait que l'éthylester de la Cbz-LGln-Gly (voir tableau VII) ait une vitesse de réaction plus élevée que la Cbz-LGln-Gly suggère que l'ajout d'acides aminés devrait augmenter l'affinité pour le substrat comme mentionné par Folk⁵⁶. Il semblerait qu'un acide carboxylique près de la glutamine diminuerait l'affinité. On peut se demander pourquoi Folk n'a pas tenté de faire des cinétiques avec le composé Cbz-L-Gln-Gly-Gly. De cette façon, il aurait pu réellement démontrer que l'ajout d'un acide aminé améliorerait l'affinité comparé à la Cbz-L-Gln-Gly, tout comme l'ester de ce substrat.

Tableau VI) Cinétique de Folk avec de petits substrats à pH=8, incorporation de $\text{NH}_2\text{OH}^{56}$

#	Substrats ⁵⁶	60 minutes d'incubation		20 minutes d'incubation	
		5 μmoles substrats ^a		25 μmoles substrats ^a	
		Absorbance à 525 nm	Vitesse relative	Absorbance à 525 nm	Vitesse relative
1	Cbz-L-Gln-Gly	0.59	1	1.05	1
2	Cbz-L-Gln-Gly- OEt [*]	0.83	1.4	1.00	0.95
3	L-Gln	0		0	
4	Cbz-L-Gln	0		0	
5	L-Gln-Gly	0		0	
6	Gly-L-Gln-Gly	0		0	
7	Cbz-L-Gln-L- Tyr ^{**}	0.60	1		
8	Cbz-L-Gln-L- Leu	0.58	1		

*Au maximum de sa solubilité 12.5 μmoles

** Partiellement soluble à 5 μmoles

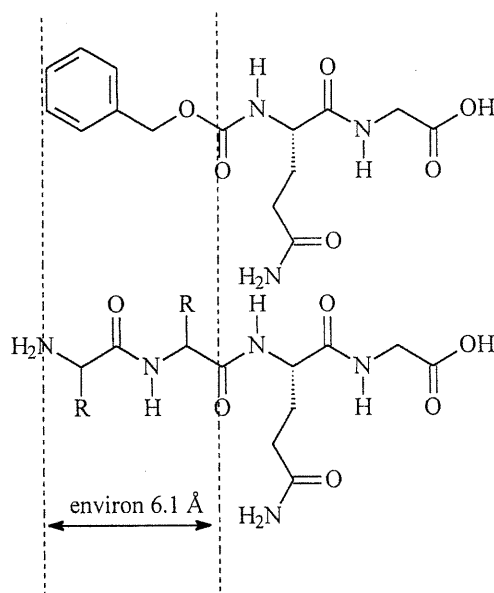
a) Le mélange réactionnel est incubé à 37 °C et contient du tampon Tris, pH = 8, 20 μmoles ; CaCl_2 , 5 μmoles ; GSH, 10 μmoles ; NH_2OH , 100 μmoles ; enzyme 1.4 mg; le tout dans un volume total de 1 mL.

Tableau VII) Constantes cinétiques, résultats de Folk à pH=8, incorporation de $\text{NH}_2\text{OH}^{56}$

Substrats ⁵⁶	K_m	V_{max}
Cbz-L-Gln-Gly	50.0	5.0
Cbz-L-Gln-Gly-OEt	5.7	2.3

Dans la même publication, des études avec le glucagon l'amènent à conclure que dans un peptide, pour fonctionner comme substrat, la glutamine doit être au moins le troisième acide aminé à partir du terminus NH_2 et au moins le deuxième résidu à partir du terminus COOH . Ceci est aussi en accord avec la structure du Cbz-L-Gln-Gly comme le démontre la figure 7.4. Il a été établi que la distance "NH₂ terminal ↔ glutamine" dans un térapeptide conforme aux exigences mentionnées par Folk versus la distance "Cbz ↔ glutamine" est comparable, à savoir environ 6.1 Å. Cette longueur a été déterminée par modélisation moléculaire, à l'aide d'une base de paramètre MM2.

Figure 7.4) Structure similaire térapeptide et dipeptide N-protégé



Folk suggère qu'il y a des interactions importantes au niveau du site catalytique qui sont distinctes des interactions secondaires dans les sous-sites de l'enzyme. Les interactions au site catalytique ont été étudiées à l'aide d'amides aliphatiques ainsi que de benzyloxy dipeptides de la méthyle glutamine^{7:49}. Ces études ont démontré que le résidu glutamine possédait les meilleurs affinités dans le site catalytique. Par contre, en ce qui a trait aux interactions sur les sous-sites de l'enzyme, la situation est plus complexe. Il y a bien sûr la position efficace de la glutamine dans le substrat qui a été

précédemment mentionnée. Pour ce qui est du reste, l'interprétation est moins claire. Des études plus systématiques des interactions autour de la glutamine, afin de mieux comprendre les interactions secondaires, ont été menées sur des oligopeptides. Folk utilisa le Formyl-Gly-Gly-Gly-L-Gln-Gly-Gly-Gly et échangea une à une chaque Gly pour une Leu⁴⁹. Ses résultats (voir tableau VIII) suggèrent une interaction dans l'enzyme du foie de cochon d'Inde qui s'étend au moins sur une distance de 4 ou 5 acides aminés⁴⁹. On voit par exemple un changement important de k_{cat}/K_m lorsque l'on compare les composés **A1** et **A5**. Mais même pour des acides aminés éloignés, l'effet se fait ressentir par exemple entre **A1** et **A7**.

Encore, il est intéressant de noter les valeurs k_{cat}/K_m lorsque l'on compare **B1** et **B3** par analogie avec **A1** et **A5**. On voit que dans le dipeptide, le remplacement de la glycine adjacente à la glutamine par une leucine n'influence pas l'affinité. Par contre dans l'heptapeptide la différence est frappante, bien que l'on change aussi la glycine adjacente à la glutamine par une leucine. Ceci laisse croire que les acides aminés près de la glutamine pourraient influencer le positionnement des acides aminés plus éloignés, de sorte que l'affinité peut augmenter dans l'heptapeptide **A5** tandis que pour le dipeptide **B3**, la leucine ne vient pas améliorer l'affinité en réorientant des acides aminés plus éloignés. Cette constatation est intéressante et indique la complexité des interactions enzyme-substrats de la TGase de foie de cochon d'Inde. Par contre, ces résultats ne montrent pas s'il y a des sites importants d'interactions hydrophobes ou d'interactions polaires.

Tableau VIII) Résultats de certaines études cinétiques de Folk⁴⁹

No.	Substrats ⁴⁹	$k_{cat}/K_{m(app)} \times 10^3$ pour l'incorporation de méthylamine*
A1	Formyl-Gly ₃ -Gln-Gly ₃	4.4 ± 1.6
A2	Formyl-Leu-Gly ₂ -Gln-Gly ₃	7.8 ± 2.3
A3	Formyl-Gly-Leu-Gly-Gln-Gly ₃	7.3 ± 1.0
A4	Formyl-Gly ₂ -Leu-Gln-Gly ₃	0.58 ± 0.16
A5	Formyl-Gly ₃ -Gln-Leu-Gly ₂	111 ± 34
A6	Formyl-Gly ₃ -Gln-Gly-Leu-Gly	8.7 ± 2.9
A7	Formyl-Gly ₃ -Gln-Gly ₂ -Leu	68 ± 24
B1	Formyl-Gly-Gln-Gly	1.4 ± 0.5
B2	Formyl-Leu-Gln-Gly	0.8 ± 0.2
B3	Formyl-Gly-Gln-Leu	1.8 ± .03
C1	Formyl-Gln-Gly	0.37 ± 0.10
C5	Méthoxycarbonyl-Gln-Gly	1.0 ± 0.2
C6	Cbz-Gln-Gly	20.1 ± 6.1

* La valeur de $k_{cat}/K_{m(app)}$ est généralement une bonne indication de l'affinité enzyme-substrat. Une valeur plus élevée indique une meilleure affinité. Cette valeur est la constante de pseudopremier ordre à de faible concentration du substrat glutamine pour l'incorporation de la méthylamine⁴⁹.

7.3.3 Études parallèle Facteur XIIIa et TGase du foie de cochon d'Inde

D'autres travaux intéressants qu'il est important de mentionner sont ceux de Gorman et Folk de 1979 à 1984^{19;54;58}. Ils étudièrent parallèlement le facteur XIIIa et la TGase de foie de cochon d'Inde. Ici seront mentionnés premièrement quelques résultats concernant le facteur XIIIa dont les conclusions seront utilisées pour nos propres recherches. La β -caséine est le meilleur substrat macromoléculaire découvert selon Gorman et Folk en 1980⁵⁸ pour le facteur XIIIa (voir figure 7.5). La β -caséine (voir

figure 7.5) contient plusieurs glutamines, les chercheurs ont donc tenté de voir quelles glutamines réagissent le plus lors de l'acylation. Ils ont donc fait réagir l'enzyme avec de la monodansylcadaverine (voir figure 7.6) et la β -caséine. Puis, la β -caséine ayant réagi avec la monodansylcadaverine fut digérée avec la trypsine. Des fragments recueillis, ils identifèrent par fluorescence que la glutamine 167 était celle qui réagissait le plus¹⁹. Ils ont donc décidé de faire des études en utilisant seulement un fragment autour de la glutamine 167 (Segment A voir figure 7.5) pour voir s'ils retrouveraient des valeurs cinétiques de même ordre que pour la β -caséine. Les chercheurs ont obtenu une très grande perte d'affinité lors de l'utilisation du meilleur segment (valeur de k_{cat}/K_m 12 fois plus faible) (voir tableau IX)^{7;58}.

Tableau IX) Constante cinétiques des Caséines

Substrats	Facteur XIIIa		TGase de foie de cochon d'Inde	
	k_{cat}	K_m	k_{cat}	K_m
α_{s1} -caséine	5.2 ± 0.8	0.068 ± 0.02	4.9 ± 0.5	0.021 ± 0.004
β -caséine	98.0 ± 0.5	0.031 ± 0.001	3.4 ± 0.1	0.043 ± 0.003
Segment A	475 ± 5	1.8 ± 0.05	87 ± 2	0.4 ± 0.04

pH = 7.45 à 25 °C pour l'incorporation de monodansylcadaverine

De plus, les chercheurs ont modifié le segment d'origine. Il est même arrivé qu'un segment modifié autour de la glutamine 167 présentait une meilleure valeur de k_{cat}/K_m que le segment non modifié^{7;58}. Tous ces résultats démontrent que les structures tertiaires des peptides seraient importantes pour orienter de façon efficace les substrats avec l'enzyme⁵⁸. Ces résultats nous emmenèrent à croire qu'il n'était pas prioritaire de faire des études de fluorescence avec la α -caséine, un bon substrat de l'enzyme de foie de cochon d'Inde. Puisque la bonne affinité de ce substrat ne serait pas nécessairement due à sa structure primaire autour des glutamines. Tout de même, pour être certain de ne pas négliger l'importance de l'affinité α -caséine-enzyme nous avons quand même étudié

la structure primaire de la α -caséine⁵⁹ pour voir si on ne trouverait pas un motif similaire autour des glutamines (voir figure 7.5). Nous n'avons trouvé aucun motif typique autour des glutamines et nous ne nous sommes donc pas inspirés de cette caséine comme point de départ pour la structure de nos substrats.

Nous avons plutôt décidé de faire une étude systématique de certains substrats en partant de la structure la plus simple à savoir le Cbz-L-Gln-Gly. Bien que, comme mentionné, Folk ait essayé de changer la Gly dans quelques autres substrats⁵⁶ de la TGase de foie de cochon d'Inde, ces travaux étaient très sommaires. Il n'avait fait que des études de vitesses de réactions à deux concentrations de substrats sans déterminer de K_m . Cette approche peut donner quelques informations mais est loin d'être précise. Nous avons donc décidé de nous attarder premièrement aux acides aminés à la droite de la glutamine (C-Terminal). Étant donné qu'il semble que le groupe Cbz présente de bonnes interactions avec l'enzyme comparativement à d'autres groupes protecteurs^{7;49}. Nous avons choisi de remplacer la glycine par différents acides aminés venant des différentes classes, à savoir, les chaînes latérales hydrophobes, polaires et aromatiques. De plus, il nous a semblé intéressant de faire quelques études sommaires avec un autre groupe protecteur que la Cbz. Nous avons aussi étudié l'effet de l'ajout d'une glycine entre la Cbz et la glutamine pour voir si cette modification rapprocherait la Cbz de son site d'affinité pour augmenter l'affinité. Enfin, nous avons testé la Cbz-L-Gln-Gly-Gly pour voir si l'ajout d'un autre acide aminé améliorerait l'affinité comme supposé par Folk⁵⁶.

Figure 7.5) Structure primaire de la *B*-caséine, de la α_{s1} -caséine, du segment A^{59;60}

B-caséine⁶⁰

H-Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys-His-Lys-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Gln-Pro-Phe-Thr-Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Pro-Leu-Leu-Leu-Gln-Ser-Trp-Met-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln¹⁶⁷-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu-Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-ValOH

Fragment utilisé par Folk autour de la glutamine 167 de la *B*-caséine (Segment A)⁵⁸

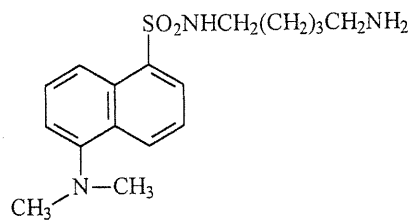
Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu

α_{s1} -caséine⁵⁹

HArg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Gln-Val-Phe-Gly-Lys-Glu-Lys-Val-Asn-Glu-Leu-Ser-Lys-Asp-Ile-Gly-Ser-Glu-Ser-Thr-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu-Asp-Ile-Lys-Glu-Met-Glu-Ala-Glu-Ser-Ile-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser-Val-Gln-Glu-Lys-His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser-Ala-Glu-Glu-Arg-Leu-His-Ser-Met-Lys-Glu-Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met-Ile-Gly-Val-Asn-Gln-Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gln-Leu-Asp-Ala-Tyr-Pro-Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys-Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp-OH

Figure 7.6) Structure de la monodansylcadaverine

Monodansylcadaverine

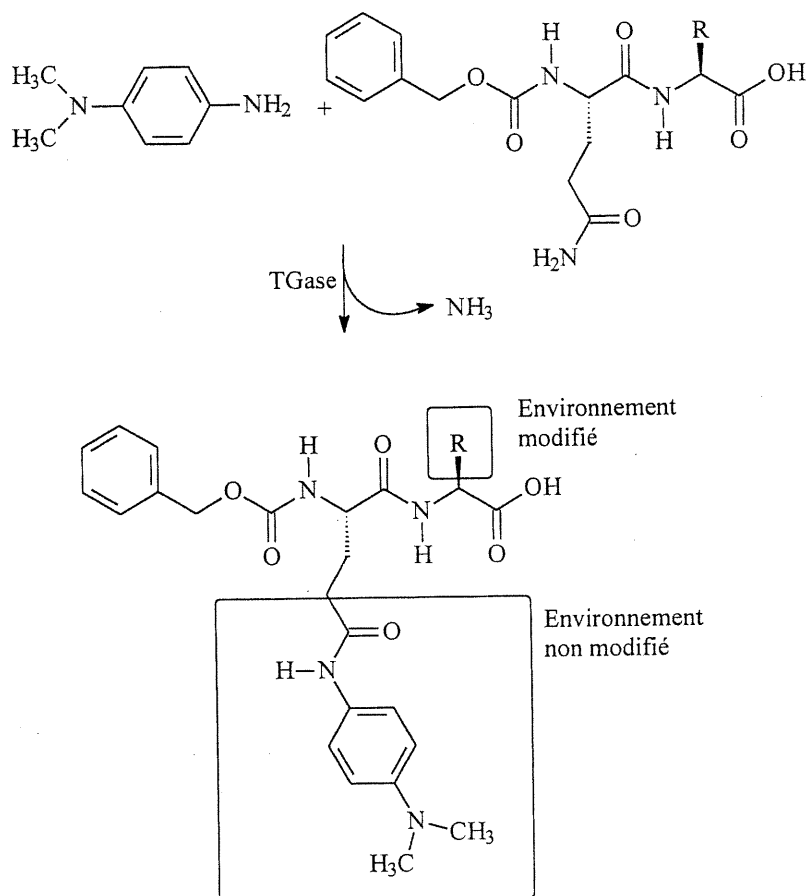


8.1 Obtention des résultats

8.1.1 La méthode utilisée pour déterminer les constantes cinétiques

Les tests cinétiques visant à trouver un meilleur substrat pour la TGase de foie de cochon d'Inde EC 2.3.2.13 ont été effectués à l'aide d'une méthode spectrophotométrique continue développée récemment dans les laboratoires du professeur Jeffrey Keillor⁴⁶. Cette méthode utilise une amine primaire comme substrat accepteur, la N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine (DMPDA) et un dérivé de la glutamine comme substrat donneur, généralement la Cbz-L-Gln-Gly (voir figure 8.1). En présence de la TGase l'acylation de la Cbz-L-Gln-Gly donne un produit final dont on peut suivre la formation à 278 nm. La valeur du coefficient d'absorption spécifique (ϵ) pour ce produit final est de $8940 \pm 55 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ tel que déterminé dans nos laboratoires. Pour les autres substrats la réaction a aussi été étudiée à 278 nm. La valeur de ϵ n'a pas été déterminée pour chaque produit final mais celle-ci n'est pas nécessaire pour déterminer les valeurs de K_m . Pour ce qui est des valeurs de k_{cat} celles-ci sont influencées par la valeur de ϵ . Par contre, il nous semble logique de considérer que les valeurs ϵ devrait tous être très semblables considérant la grande similitude de chaque composé. Comme l'absorbtion à 278nm est rattachée aux cycle aromatique et que l'environnement autour de ce dernier change peu (voir figure 8.1) d'un produit final à l'autre notre approximation semble justifiée.

Figure 8.1) Réaction catalysée par la TGase *in vitro*

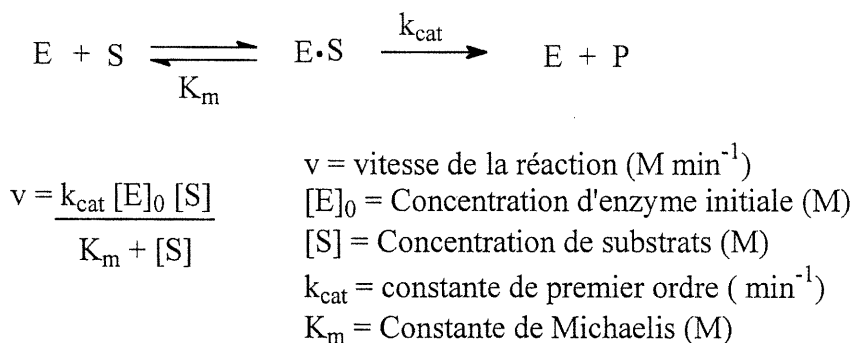


D'ailleurs, ce genre d'approximation fut utilisée par Folk lors de ses études afin de déterminer de bons substrats pour l'enzyme⁵⁶. Comme il sera indubitablement démontré sous peu, les nouveaux substrats développés ne montrent pas des améliorations assez intéressantes pour s'attarder à la détermination des ϵ des produits finaux. Nonobstant le peu d'améliorations de l'affinité, ces résultats nous permettent de confirmer et aussi de mieux comprendre certains détails structuraux de l'enzyme TGase extraite de foie de cochon d'Inde. Les différents substrats qui furent essayés avec la TGase de foie de cochon d'Inde et les résultats cinétiques sont présentés au tableau X.

8.1.2 Définition des constantes étudiées

Avant d'analyser les résultats de nos expériences voici une brève définition de l'interprétation des constantes utilisées. Les valeurs de k_{cat} et K_m furent obtenues à l'aide de régression non-linéaires des courbes de type Michaelis-Menten. Le rapport de ces deux valeurs, à savoir, k_{cat}/K_m est une représentation générale de l'affinité enzyme-substrat. Plus cette valeur est élevée plus l'affinité enzyme-substrat sera grande. Une bonne description de ces valeurs se trouve en référence⁶¹. C'est de cette référence que sont prises les informations dans cette section. L'équation chimique d'une réaction enzymatique qui fut proposée par Michaelis et Menten est la plus simple, elle est représentée à la figure 8.2. De même l'équation mathématique d'une courbe Michaelis-Menten y est représentée. Évidemment il se cache beaucoup de mathématiques derrière cette équation mais le but ici est de décrire ce que représente les constantes mathématiques. Tout bon manuel de biochimie décrira les équations mathématiques.

Figure 8.2) Équation chimique d'une réaction enzymatique



Tout d'abord, k_{cat} est une constante de premier ordre qui se réfère à la réactivité de l'intermédiaire enzyme-substrat. On peut dire que k_{cat} indique si la partie réactive du substrat est positionnée de façon à réagir facilement avec le site actif de l'enzyme, une fois le substrat positionné pour former le complexe. Dans le cas présent, k_{cat} décrirait si la fonction amide de la glutamine est bien positionnée dans le site actif de la TGase.

Ensuite, la valeur de K_m est la constante de dissociation apparente qui peut être traitée comme une constante de dissociation totale qui inclut tous les types de lien

nécessaires à la formation du complexe enzyme-substrats. On peut dire que K_m indique si le substrat peut se lier avec l'enzyme de façon à former un complexe enzyme-substrat. Plus le K_m est faible, meilleur est l'affinité, plus faible est la dissociation. Dans le cas présent K_m indique si nos petits substrats ont des parties possédant de bonnes affinités pour certaines sections de l'enzyme près du site actif.

Finalement, la valeur de k_{cat}/K_m est une constante de deuxième ordre apparente. Elle réfère aux propriétés réactives de l'enzyme libre avec le substrat libre. Cette valeur indique un peu l'effet total de k_{cat} et de K_m . Elle indique si l'affinité enzyme-substrat est bonne et si ce complexe oriente bien la partie réactive du substrat dans le site catalytique. Dans notre situation cette valeur nous indique si l'affinité de nos petits substrats est bonne et oriente bien la chaîne latérale de la glutamine au site actif de l'enzyme.

8.2 Résultats et discussions

8.2.1 Détails sur la méthode d'obtention des valeurs cinétiques

Comme il vient d'être expliqué la valeur de k_{cat}/K_m est une indication de l'affinité enzyme-substrats. Les valeurs de k_{cat} , K_m et k_{cat}/K_m sont résumés au tableau X. Comme on peut le voir la valeur de K_m obtenue pour le composé de référence, c'est-à-dire le Cbz-L-Gln-Gly est de 3.2 mM. Cette valeur est concordante avec la valeur donnée dans la littérature⁴⁶ pour ce substrat donneur avec la DMPDA. La littérature donne une valeur de 2.40 ± 0.05 mM. Les valeurs de K_m varient facilement et pour cette raison nous considérons comme acceptable la valeur présentée au tableau X. Comme le Cbz-L-Gln-Gly est un des substrats les plus utilisés pour faire des études avec la TGase extraite de foie de cobaye, nous avons donc comparé tous nos résultats avec ce composé. Folk a fait plusieurs études avec différents substrats pour la TGase de foie de cochon d'Inde. Malheureusement, ces études ont été faites en plusieurs occasions avec des conditions de réactions souvent différentes, différents pH, différentes concentrations de sels et différents substrats de référence. Quelques fois, il est donc un peu difficile de s'y retrouver. Les résultats que nous avons obtenus viennent souvent confirmer les résultats

de Folk et permettent aussi d'avoir une étude systématique de différents substrats généralement nouveaux.

Les valeurs de k_{cat} obtenues furent calculées pour une activité spécifique normalisée à 14 U/mg. Les détails de ces calculs sont donnés dans l'annexe **B**.

Par ailleurs, les valeurs de k_{cat} et de K_m ont été déterminées à l'aide de cinq ou six concentrations différentes de substrats donneurs. Nous ne nous sommes pas attardés à faire des mesures à plus de concentrations étant donné que les valeurs ne nous indiquaient pas que nous étions en présence d'un nouveau substrat qu'il faudrait étudier en profondeur.

8.2.2 *Interprétation des valeurs cinétiques*

Les différents composés synthétisés visaient à voir les effets de différentes modifications. La première série de composés (voir tableau **X**, composés **1** à **6**) visait à comparer des dipeptides du type Cbz-L-Gln-L-Xaa. Les L-Xaa sont différents acides aminés ayant des chaînes latérales hydrophobes de différentes grosseurs ou polaire. La conclusion générale pour l'étude de ces différents composés est que la polarité de la chaîne latérale ou la grosseur de la chaîne latérale hydrophobe du deuxième acide aminé ne semble pas grandement influencer l'affinité enzyme-substrat. Les valeurs de k_{cat}/K_m ne varient pas de façon drastique par rapport au Z-L-Gln-Gly pour la série de substrats étudiée ici.. Ce type de résultats fut d'ailleurs observé par Folk¹¹.

Il est intéressant de pousser un peu plus loin l'analyse des résultats pour ces composés. Les chaînes latérales des deuxièmes acides aminés tentaient de vérifier s'il n'y avait pas des interactions de différents types qui pourraient être positives ou négatives. Nous avons synthétisé un dipeptide pouvant donner de bonnes interactions dipôle-dipôle (composé **6**). Puis, on a synthétisé quatre autres dipeptides ayant des chaînes latérales hydrophobes et permettant aussi de voir l'encombrement stérique (composés **1-4**). De plus, un autre substrat hydrophobe mais aromatique fut synthétisé (composé **5**).

À la lumière des résultats pour ces composés, il semble qu'il n'y ait pas d'interaction de type dipôle-dipôle qui pourrait améliorer l'affinité enzyme-substrat. La valeur de k_{cat}/K_m pour le Cbz-L-Gln-L-Ser est un peu plus faible que pour le composé de

référence. Mais comme cette valeur est du même ordre que pour les composés **2** et **5** il semble que la polarité de la chaîne latérale n'influence pas de façon significative l'affinité. De même l'aromaticité de la chaîne latérale du composé **5** ne semble pas influencer l'affinité. La variation des paramètres cinétiques pourrait plutôt être attribuée à l'encombrement de la chaîne latérale car, à la lumière de nos résultats, l'encombrement stérique de la chaîne latérale semble influencer l'affinité (composé **1-4**). Folk avait obtenu des résultats et des conclusions brutes concordantes avec les nôtres comme mentionnés dans le chapitre 7.

Tableau X) Valeurs cinétiques pour les différents substrats

	Numéro des Substrats donneurs	k_{cat} min^{-1}	K_m mM	k_{cat}/K_m $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$
1	Cbz-L-Gln-Gly	96	3.2 ± 0.5	30
2	Cbz-L-Gln-L-Ala	51	1.9 ± 0.6	26
3	Cbz-L-Gln-L-Val	71	4.4 ± 0.4	16
4	Cbz-L-Gln-L-Leu	127	7 ± 1	18
5	Cbz-L-Gln-L-Phe	54	2.7 ± 0.8	20
6	Cbz-L-Gln-L-Ser	66	2.9 ± 0.6	23
7	Cbz-L-Gln-Gly-Gly	102	9.4 ± 0.5	11
8	Cbz-Gly-L-Gln-Gly	86	8 ± 2	11
9	Boc-L-Gln-Gly	Pas de reconnaissance significative à 40 mM; $K_m > 40$ mM		

*Valeur normalisée pour une activité spécifique de 14 U/mg

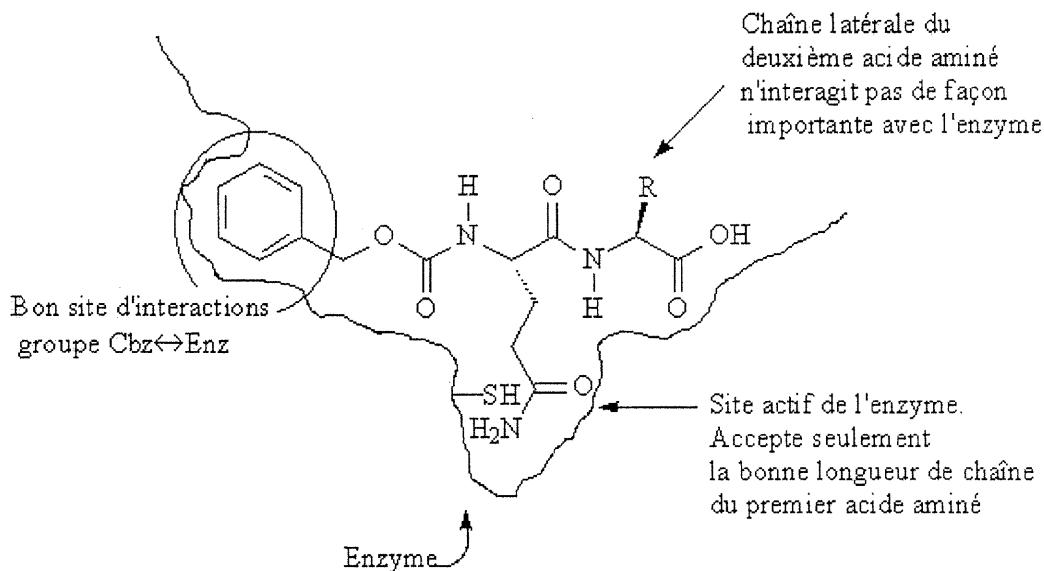
L'erreur pour les k_{cat} et k_{cat}/K_m est évaluée à $\pm 20\%$

En ce qui a trait à la série des composés ayant des chaînes aliphatiques (composés **2** à **4**), aucun de ceux que nous avons testés n'a démontré de valeur de k_{cat}/K_m plus élevée que pour le composé de référence. Il semblerait donc que l'ajout d'une chaîne

latérale augmenterait l'encombrement stérique et diminuerait la valeur de k_{cat}/K_m et donc probablement l'efficacité de la liaison enzyme-substrat. Même l'ajout de seulement un carbone (composé **2**) diminuerait l'efficacité. Par contre, l'ajout de plusieurs carbones (composé **4**) ne vient pas diminuer de façon drastique le k_{cat}/K_m . En fait, les valeurs de k_{cat}/K_m diminuent progressivement en allongeant la chaîne latérale. Par contre, les valeurs de k_{cat} et de K_m prises individuellement varient de façon plus aléatoire. Le K_m le plus faible, revient au composé **2** tandis que le k_{cat} le plus élevé revient au composé **4**. Ces faits intéressants amènent à se demander ce qui se passe autour de la glutamine lorsqu'elle arrive dans le site actif de l'enzyme. Comme mentionné, le site actif est assez exclusif pour empêcher toute réaction avec l'asparagine mais mis à part l'effet sur cette chaîne pour le premier acide aminé, l'environnement un peu plus éloigné serait peu influencé par le type de chaîne latérale du second acide aminé.

Folk avait tenté de représenter de façon schématique le site actif de l'enzyme⁷. Nous nous sommes inspirés de ce schéma pour faire une représentation de ce qui pourrait arriver pour expliquer l'importance de la chaîne latérale du premier acide aminé et le peu d'importance de la chaîne latérale du second acide aminé. Sur le dessin, la chaîne latérale du 2^e acide aminé ne présente pas d'interaction importante avec l'enzyme; parce qu'elle n'est pas orientée vers un site d'affinité de l'enzyme. Contrairement à cette situation, le groupe Cbz présente de bonnes interactions avec l'enzyme sur le dessin. Évidemment, la structure rayon X de l'enzyme avec le substrat lié n'est pas encore connue.

Figure 8.3) Représentation du site actif de l'enzyme



La précision de ces résultats ne nous permet pas de faire une analyse fine des valeurs mais celles-ci démontrent que dans certains cas une amélioration du K_m nuira à la valeur de k_{cat} et vice-versa. Donc la force du complexe externe formé et le bon positionnement des parties réactives enzyme et substrat varient de façons différentes.

Dans le même ordre d'idée, les tripeptides (composés **7** et **8**) sont aussi de moins bons substrats que le composé de référence. Il semble que le groupe protecteur Cbz soit positionné de façon optimum dans le composé de référence. Le déplacer de la distance d'un acide aminé (composé **8**) vient diminuer l'efficacité du substrat. Le groupe Cbz n'aurait plus le positionnement requis pour avoir les interactions présentées à la figure **8.3**. Aussi, l'ajout d'une glycine pour former un tripeptide analogue au composé de référence vient aussi diminuer l'efficacité (composé **7**). Ce résultat est contraire à ce que laissait présager les résultats de Folk avec la Cbz-L-Gln-Gly-OEt⁵⁶. Il semble que

d'éloigner le groupement chargé (acide) n'est pas suffisant pour améliorer l'affinité. Bloquer la charge en formant l'éthylester est plus efficace.

Pour ce qui est des essais avec d'autres groupes protecteurs, il semble que le Cbz soit un groupe très efficace. L'utilisation du composé Boc (composé 9) fait perdre toute affinité acceptable. La perte d'affinité peut être dû à la perte d'aromaticité ou à l'encombrement du groupe Boc. Ces deux possibilités sont en accord avec la figure 8.3 où l'on modifie la région du Cbz.

Les résultats obtenus confirment ce que laissait présager le résultat de la littérature à savoir que ce type d'enzyme accommode de grosses molécules où la structure tertiaire est importante pour l'affinité enzyme-substrat. Une façon qui pourrait permettre de synthétiser des substrats relativement petits et efficaces serait de regarder la structure tridimensionnelle de la TGase de foie de cochon d'Inde. Pour ce faire, il faudrait que quelqu'un cristallise cette enzyme puis en détermine la structure au rayon X. À l'aide de cette structure, il nous serait possible de faire des études de modélisation moléculaire pour tenter de synthétiser un substrat qui présenterait de bonnes interactions avec la TGase de foie de cochon d'Inde. Malheureusement, nous n'avons pu trouver la structure rayon X de cette enzyme.

8.3 Conclusion

8.3.1 À court terme

Dans un bref délai ces résultats n'ouvrent pas la porte à l'utilisation d'un nouveau substrat de référence beaucoup plus efficace que le Cbz-L-Gln-L-Gly. Les résultats obtenus ont pour le moins permis de démontrer clairement que l'enzyme est peu spécifique aux acides aminés qui entourent la Gln. Les règles de Folk disant que la Gln doit être au moins le deuxième acide aminé à partir du terminus NH_3^+ et le troisième de du terminus COO^- restent vraies.

Nos résultats démontrent clairement que la chaîne latérale du deuxième acide aminé dans un dipeptide du type Cbz-L-Gln-Xaa n'interagit pas de façon importante avec l'enzyme. Ils nous permettent aussi de démontrer l'utilité de notre méthode de

synthèse pour préparer certains substrats. Ces études sont simples et bien que faites à tâtons, elles sont justifiées par leur rapidité.

8.3.2 *À long terme*

Des travaux qui pourraient être intéressants d'effectuer à plus long terme seraient entre autres d'essayer de synthétiser des composés de type analogue du Cbz-L-Gln-Gly où la longueur de la chaîne latérale de la glutamine serait modifiée afin de voir si en rallongeant la chaîne la réactivité augmentera ou diminuera.

D'autres part, des études de même type pourraient être instituées sur des TGases impliquées dans des désordres pathologiques de l'Homme. Ces études pourraient être bien appuyées par l'obtention de la structure rayon X de l'enzyme étudiée.

9.1 Préparation des solutions

9.2 L'enzyme

Solution d'enzyme

L'enzyme est purifiée à l'aide d'un protocole légèrement modifié de la littérature⁴⁸. L'enzyme obtenue est extraite de foie de cochon d'Inde et est classée E.C 2.3.2.13 ($M_m = 80\,000$ g/mol)

9.2.1 Les solutions préparées à l'avance

Solution tampon (1 M Tris-acétate, pH 7.0, 100 mL)

Le Tris base (12.114 g) est dissout dans 85 mL d'eau désionisée. De l'acide acétique est ajouté pour atteindre un pH=7 (environ 5 mL). De l'eau désionisée est ajoutée pour obtenir un volume final de 100 mL.

Solution de chlorure de calcium (0.1 M CaCl_2)

Le chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (0.3675 g) est dissout dans 25 mL d'eau désionisée.

Solution de EDTA (0.02 M Na_4EDTA)

L'EDTA (146.1 mg) sous forme acide est dissout dans 5.0 mL d'une solution de 0.4 M NaOH. La solution est ensuite diluée avec de l'eau désionisée pour obtenir un volume final de 25 mL.

Solution réactionnelle

La solution réactionnelle contient une concentration suffisante de CaCl_2 de façon à activer l'enzyme lors des études cinétiques. Elle contient aussi de l' Na_4EDTA pour chélater des métaux nuisibles. Elle contient aussi une concentration de tampon Tris-acétate suffisante pour conserver le pH constant lors des cinétiques. La solution réactionnelle est obtenue en mélangeant 1 mL de la solution de tampon Tris-acétate (1 M), 0.25 ml de la solution CaCl_2 (0.1 M) et 0.25 mL de la solution d' Na_4EDTA (0.02 M). Le pH est ensuite amené à 7 en ajoutant environ 40 μL de NaOH 5 M. Ensuite on complète avec de l'eau désionisée pour obtenir un volume final de 4 mL. La solution réactionnelle est stable pour plusieurs jours.

Solution de Z-L-Gln-Xaa (100 mM) (exemple avec la Solution mère Z-L-Gln-L-Phe)**Solution mère Z-L-Gln-L-Phe (100 mM)**

Le Z-L-Gln-L-Phe (42.70 mg, 0.099 mmol) sont dissouts dans 400 μL d'eau désionisée. Puis, 40 μL de NaOH 2.5 M (1 éq.) sont ajoutés pour aider à dissoudre le composé. Si le composé n'est pas complètement dissout on peut rajouter un peu de la solution de NaOH. Puis le pH est ajusté à pH=7 avec des solutions de HCl 0.5 M et NaOH 0.5 M. Une fois le pH obtenu on complète avec de l'eau désionisée pour obtenir un volume final de 1mL. La concentration de la solution mère est de 100 mM et pH = 7. La solution mère est stable pour plusieurs jours. De même, les solutions des autres substrats sont préparées.

*9.2.2 Les solutions préparées quotidiennement***Solution d'enzyme.**

On ajoute 1 mL d'eau désionisée au tube Eppendorf contenant l'enzyme purifiée et lyophilisée selon une méthode développée dans les laboratoires du docteur Keillor⁴⁸. Chaque tube Eppendorf contient environ 1mg d'enzyme ainsi que les sels conservés après la lyophilisation. Cette solution d'enzyme est stable pour quelques heures à 0 °C.

La concentration de l'enzyme est déterminée à l'aide du test de Lowry⁴⁸ et son activité à l'aide de la méthode au FeCl_3 ⁴⁸.

Solution de N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine monohydrochloré (DMPDA) (100 mM)

Le DMPDA monohydrochloré (25.90 mg, 0.15 mmol) est dissout dans 1.5 mL d'eau désionisée. La solution est instable et doit être préparée chaque jour.

9.3 Les cinétiques et l'analyse des résultats

9.3.1 *Les conditions expérimentales*

Le spectrophotomètre utilisé est un Cary 100. Les cinétiques se déroulent à 37°C et à pH = 7. Les vitesses de réactions sont déterminées à l'aide de la pente pour les premières secondes de réaction (1 à 30 secondes). La longueur d'onde utilisée est 278 nm. Un exemple d'une vitesse de réaction est montré à la figure 9.1. Tout d'abord, on ajoute le volume nécessaire de la solution réactionnelle dans une cuvette de quartz. Ensuite on ajoute le volume d'eau nécessaire dépendamment de la quantité qu'on ajoutera de la solution mère de substrat accepteur. Puis on ajoute le volume nécessaire de substrat donneur. On laisse ensuite incuber pour trois minutes à 37°C. Ensuite, on ajoute 4 μL de la solution d'amine. Puis on agite et fait le blanc avec cette solution. Ensuite on ajoute rapidement la solution d'enzyme, on agite, puis l'on suit la variation d'absorbance. Le volume final lors de la réaction est de 500 μL . Les conditions finales apparaissent en annexe. Chaque concentration de substrats donneurs était testé une fois et si un résultat aberrant se produisait la concentration était testé de nouveau pour s'assurer qu'il n'y avait pas d'erreur. De cette façon, les études étaient faites rapidement

et de manière assez précise pour tenter de cibler un composé qui aurait démontré une affinité très différente de celle du Cbz-L-Gln-GLy.

9.3.2 Analyse des données expérimentales

Lors des cinétiques, des vitesses en absorbance par minute sont obtenues (voir figure 9.1). Ainsi, à l'aide de graphiques comme celui présenté à la figure 9.1, la vitesse v dans les premières secondes est obtenue à partir de la variation d'absorbance.

Ces valeurs sont transformées en vitesses à l'aide de la valeur de ϵ obtenue pour la réaction du Cbz-L-Gln-Gly avec le DMPDA. Cette approximation est justifiée comme mentionnée au chapitre 7. Les vitesses ainsi obtenues sont divisées par la valeur de concentration d'enzyme initiale $[E_0]$ qui sont ensuite normalisées pour une activité spécifique de 14 U/mg ($U = \mu\text{mol min}^{-1}$ de produit formé). Ces valeurs de $v/[E_0]$ sont par la suite mises dans un graphique en fonction de la concentration de substrat donneur correspondante (courbe de Michaelis-Menten). De cette façon on peut obtenir un k_{cat} ainsi que les valeurs de K_m (voir figure 9.2). Une brève description mathématique de l'obtention des résultats est donnée à la section 9.2.3)

Figure 9.1) Exemple d'une cinétique pour une concentration S de substrat donneur (Absorbance en fonction du temps)

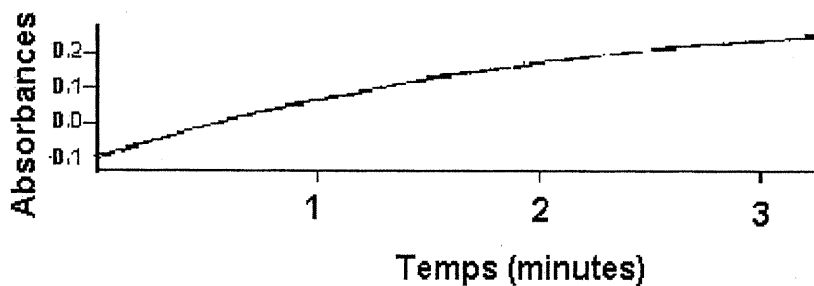
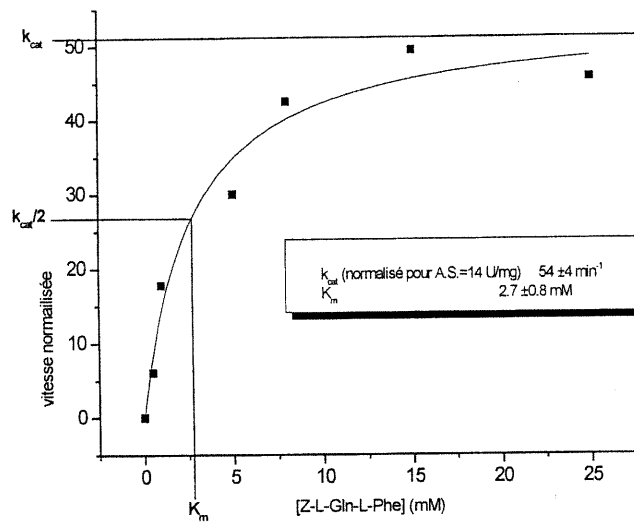


Figure 9.2) Courbe Michaelis-Menten pour la Cbz-L-Gln-L-Phe



Les données importantes concernant l'enzyme pour chaque substrats testés apparaissent au tableau **XI**.

Tableau XI) Données sur l'enzyme pour les différentes cinétiques

Substrats testés	Activité spécifique ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	[enzyme] dans la cellule (mg/mL)
Cbz-L-Gln-Gly	6.4 ± 0.3	0.048 ± 0.009
Cbz-L-Gln-L-Ala	12.83 ± 0.03	0.034 ± 0.003
Cbz-L-Gln-L-Val	9.8 ± 0.1	0.043 ± 0.004
Cbz-L-Gln-L-Leu	6.3 ± 0.3	0.048 ± 0.009
Cbz-L-Gln-L-Phe	12.5 ± 0.1	0.034 ± 0.003
Cbz-L-Gln-L-Ser	10.15 ± 0.06	0.047 ± 0.003
Cbz-L-Gln-Gly- Gly	14.9 ± 0.2	0.028 ± 0.003
Cbz-GLy-L-Gln- Gly	8.6 ± 0.8	0.052 ± 0.008
Boc-L-Gln-Gly	14.9 ± 0.2	0.028 ± 0.003

Annexe A

10.1 Détails des conditions des cinétiques

Tout dépendant des composés testés, la concentration de CaCl_2 , Na_4EDTA et de tampon peut varier légèrement. Ces variations n'influencent pas les valeurs des cinétiques car même les concentrations les plus faibles sont plusieurs fois au-dessus des concentrations requises pour assurer l'activité complète. Ces changements de concentrations ont été quelques fois nécessaires pour ajouter suffisamment de substrat donneur pour atteindre le plateau des courbes de Michaelis-Menten. Toutes ces données sont répertoriées dans les tableaux **XII** à **XVIII**.

Tableau XII) Conditions finales de réaction à $\text{pH} = 7$ pour les substrats donneurs 1,2,4,5,6 ou la concentration de substrat donneur varie

Cinétique #	substrat (mM)	amine (mM)	CaCl_2 (mM)	Tampon (mM)	Na_4EDTA (mM)
1	0.5	0.8	4.2	168	0.84
2	1	0.8	4.2	168	0.84
3	8	0.8	4.2	168	0.84
4	15	0.8	4.2	168	0.84
5	25	0.8	4.2	168	0.84

Tableau XIII) Conditions finales de réaction à pH = 7 pour le substrat donneur 3

Cinétique #	substrat (mM)	amine (mM)	CaCl₂ (mM)	Tampon (mM)	Na₄EDTA (mM)
1	0.5	0.8	3.89	156	0.78
2	1	0.8	3.89	156	0.78
3	8	0.8	3.89	156	0.78
4	15	0.8	3.89	156	0.78
5	25	0.8	3.89	156	0.78
6	30	0.8	3.58	143	0.72

Tableau XIV) Conditions finales de réaction à pH = 7 pour les substrats donneurs 7, 8, 9 et 10

Cinétique #	substrat (mM)	amine (mM)	CaCl₂ (mM)	Tampon (mM)	Na₄EDTA (mM)
1	0.5	0.8	3.58	143	0.72
2	1	0.8	3.58	143	0.72
3	8	0.8	3.58	143	0.72
4	15	0.8	3.58	143	0.72
5	25	0.8	3.58	143	0.72
6	30	0.8	3.58	143	0.72
7	35	0.8	3.58	143	0.72

Tableau XV) Volumes des solutions utilisées pour les cinétiques, $V_t=500$ uL, pH = 7 pour les substrats donneurs 1,2,4,5 et 6

Cinétique	Volume substrat (μL)	Volume eau (μL)	Volume amine (μL)	Volume enzyme (μL)	Volume solution réactionnelle (μL)
1	2.5	137.5	4	20	336
2	5	135	4	20	336
3	40	100	4	20	336
4	75	65	4	20	336
5	125	15	4	20	336

Tableau XVI) Volumes des solutions utilisées pour les cinétiques, $V_t=500$ uL, pH = 7 pour le substrat donneur 3

Cinétique	Volume substrat (μL)	Volume eau (μL)	Volume amine (μL)	Volume enzyme (μL)	Volume solution réactionnelle (μL)
1	2.5	122.5	4	60	311
2	5	120	4	60	311
3	40	85	4	60	311
4	75	50	4	60	311
5	125	0	4	60	311
6	150	0	4	60	286

Tableau XVII) Volumes des solutions utilisées pour les cinétiques, $V_t=500$ uL, pH = 7 pour les substrats donneurs 7 et 9

Cinétique	Volume substrat (μL)	Volume eau (μL)	Volume amine (μL)	Volume enzyme (μL)	Volume solution réactionnelle (μL)
1	2.5	147.5	4	60	286
2	5	145	4	60	286
3	40	110	4	60	286
4	75	75	4	60	286
5	125	25	4	60	286
6	150	0	4	60	286

Tableau XVIII) Volumes des solutions utilisées pour les cinétiques, $V_t=500$ uL, pH = 7 pour les substrats donneurs 8 et 10

Cinétique	Volume substrat (μL)	Volume eau (μL)	Volume amine (μL)	Volume enzyme (μL)	Volume solution réactionnelle (μL)
1	2.5	187.5	4	20	286
2	5	185	4	20	286
3	40	150	4	20	286
4	75	115	4	20	286
5	125	65	4	20	286
6	150	40	4	20	286
7	175	15	4	20	286

Annexe B

11.1 Description mathématique de l'obtention des résultats

Calcul de la vitesse de réaction pour les substrats donneurs

Abs = $\epsilon l c$ (loi de Beer Lambert).....Équation 1

ou " ϵ " est le coefficient d'absorption molaire ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

" l " est la longueur de la cellule (cm)

" c " est la concentration du substrat donneur acylé par le substrat accepteur (M)

Donc, la vitesse v de la réaction enzymatique est définie comme étant la variation d'absorbance par minute.

$v = \text{Abs } t^{-1} = \epsilon l c t^{-1}$ Équation 2

ou t = temps en minute

Selon l'équation de Michaelis-Menten,

$v = V_{\max} S / (K_m + S)$ Équation 3

Où S est la concentration de substrat donneur utilisée pour une vitesse obtenue.

(La vitesse v de la réaction varie avec l'activité spécifique de l'enzyme et peut être normalisée pour une activité choisie)

$v \times \text{activité spécifique choisie} / \text{activité spécifique lors des cinétiques} = v \text{ normalisée}$

Selon les équations de Michaelis-Menten on sait aussi que

$V_{\max} = k_{\text{cat}} E_0$Équation 4

Donc, à partir de la combinaison des équations 3 et 4 on obtient

$$v/E_0 = k_{cat} S / (K_m + S) \dots\dots\dots \text{Équation 5}$$

Puis, à partir de l'équation 5 combinée à l'équation 2

$$\text{Abs} / \varepsilon l t E_0 = k_{cat} S / (K_m + S) \dots\dots\dots \text{Équation 6}$$

A l'aide de cette dernière équation on obtient k_{cat} et K_m directement sur le graphique de Michaelis-Menten où S est en abscisse et les valeurs de v/E_0 normalisée pour une activité de 14 en ordonnée (voir figure 9.2).

Liste des références

- 1) Jones, J. *The Chemical Synthesis of Peptides*, Eds.: Clarendon Press: Oxford **1991**
- 2) Schröder, E.; Lübke, K.; Gross, E. *The Peptides Vol.1-2*, Eds.: Academic Press: New York **1965**
- 3) Gross, E.; Meienhofer, *The Peptides Analysis, Synthesis, Biology Vol.1-5*, Eds.: Academic Press: London **1979**
- 4) George, R.P. *Synthetic Peptides Vol.1-5*, Eds.: Elsevier Scientific Publishing Company: Amsterdam **1970**
- 5) Bodanszky, A.; Bodanszky, M.; Chandramouli N.; Kwei J.Z.; Martinez J.; Tolle J.C. *J.Org.Chem.* **1980**, 45, 72
- 6) Sunggak, K.L.J.I.; Kim Y.C. *J.Org.Chem.* **1985**, 50, 560
- 7) Folk, J.E. *Adv.Enzymol.& Relat.Areas Mol.Biol.* **1983**, 54, 1
- 8) Falb E.; Yechezkel T.; Salitra Y.; Gilon C. *J.Pept.Res.* **1999**, 53, 507
- 9) Bodanszky, M. *Nature* **1955**, 175, 685
- 10) Merrifield, R.B. *J.Amer.Chem.Soc.* **1963**, 85, 2149
- 11) Gross, E.; Meienhofer, J. *The peptides Analysis, Synthesis, Biology vol.2* Eds.: Academic Press: London **1980**
- 12) Eberle, A.; Geiger, R.; Frankfurt, A.M.; Wieland, T. *Perspecticves in Peptide Chemistry*, **2000**,

- 13) Kisfaludy, L.; Löw, M.; Nyéki, O.; Szirtes, T.; Schön, I. *Liebigs Ann.Chem.* **1973**, 1421
- 14) Kisfaludy, L.; Roberts, J.E.; Johnson, R.H.; Mayers, G.L.; Kovacs, J. *J.Org.Chem.* **1970**, *10*, 3563
- 15) Bodanszky, M.; Du Vigneaud, V. *J.Amer.Chem.Soc.* **1959**, *81*, 5688
- 16) Bodanszky, M.; Bodanszky A.; Tolle, J.C.; Bednarek M.A. "*Chemical Synthesis and Sequencing of Peptides and Proteins*" **1981**, 163
- 17) Carreno C.; Méndez M.E.; Kim Y.D.; Kim H.-J.; Kates S.A.; Andreu D.; Albericio F. *J.Pept.Res.* **2000**, *56*, 63-69.
- 18) Kemp, D.S.; Wrobel, S.J.J.; Wang, S.-W.; Bernstein, Z.; Rebek, J.Jr. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 3969
- 19) Gorman J.J.; Folk, J.E. *J.Biol.Chem.* **1980**, *255*, 419
- 20) Elliott, D.F.; Russell, D.W.C.&I. *Proceedings of the biochemical society* **1957**, 49p
- 21) Bodanszky, M.; Szelke, M.; Tömörkény, E.; Weisz, E. *Chem. & Ind.* **1955**, 1517
- 22) Sheehan, J.C.; Hess, G.P. *J.Amer.Chem.Soc.* **1955**, *77*, 1067
- 23) Bodanszky, M.; Sheehan, J.T.; Ondetti, M.A.; Lande, S. *J.Amer.Chem.Soc.* **1962**, *85*, 991
- 24) Glatthard, R.; Matter, M. *Helv.Chim.Acta* **1963**, *87*, 795
- 25) Sunggak, K.; Kim Y.C.; Lee J.I. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 3365
- 26) Gross, E.; Meienhofer, J. *The Peptides Analysis, Synthesis, Biology Vol.1*
Eds.: Academic Press: London 1980

- 27) Kisfaludy, L.; Schön, I.; Szirtes, T.; Nyéki, O.; Löw, M. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *19*, 1785
- 28) Kafarski, P.; Lejczak, B. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 7387
- 29) Oku, A.; Yamaura, Y.; Harada, T. *J.Org.Chem.* **1986**, *51*, 3732
- 30) Bodanszky M.; Deshmane, S.; Martinez, J. *J.Org.Chem.* **1979**, *44*, 1622
- 31) Wharton, C.W. *Biochem.J.* **1974**, *143*, 575
- 32) Castonguay Roselyne *Mémoire de Maîtrise, Université de Montréal* **2000**
- 33) Sondheimer, E.; Holley, R.W. *J.Amer.Chem.Soc.* **1954**, *76*, 2816
- 34) Klieger, E.; Gibian H. *Liebigs Ann.Chem.* **1961**, 183
- 35) Kricheldorf, H.R. *Liebigs Ann.Chem.* **1972**, 17
- 36) Clayton, D.W.; Farrington, J.A.; Kenner, G.W.; Turner, J.M. *Peptides* **1957**, 1399
- 37) Malcom, D.; Edwin C.W. *Enzymes, Eds.:Longmans: London* **1964**
- 38) Copeland R.A. *Enzymes.A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis, Eds.:VCH Publishers, Inc.:New York* **1996**
- 39) Cole, P.W.; Folk, J.E. *J.Biol.Chem.* **1966**, *241*, 5518
- 40) Glazier S.A.; Campbell R.E.; Campbell W.H. *Anal.Chem.* **1998**, *70*, 1511
- 41) Freund, K.F.; Kundan, P.D.; Stanley, L.G.; Claremon, D.A.; Remy, D.C.; Baldwin, J.J.; Pitzenberger, S.M.; Andrew, M.S. *Biochemistry* **1994**, *33*, 10109
- 42) Esposito, C.; Lombardi, M.L.; Vincenzo, R.; Cozzolino, A.; Mariniello, L.; Raffaele, P. *Mol.Cell.Biochem* **2000**, *206*, 57

- 43) Groenen, P.J.T.A.; Grootjans, J.J.; Lubsen, N.H.; Bloemendal, H.; de Jong, W.W. *Biol.Chem.* **1994**, 269, 831
- 44) Jensen, P.H.; Sorensen, E.S.; Petersen, T.E.; Gliemann, J.; Rasmussen, L.K. *Biochem.J.* **1995**, 310, 91
- 45) Amendola, A.; Giovanna, L.; Serafina, O.; Vittorio, C.; Piacentini, M. *FEBS Letters* **1994**, 339, 258
- 46) de Macédo, P.; Marrano C.; Keillor, J.W. *à être publié* **2000**,
- 47) de Macédo, P.; Marrano C.; Keillor, J.W. *à être publié* **2000**,
- 48) Leblanc, A.; Day, N.; Ménard, A.; Keillor, J.W. *Protein Expression and Purification* **1999**, 17, 89
- 49) Gross, M.; Whetzel, N.K.; Folk, J.E. *J.Biol.Chem.* **1975**, 250, 4648
- 50) Chung S.C.; Folk J.E. *Adv.Enzymol. & Relat.Areas Mol.Biol.* **1973**, 38, 109
- 51) Leblanc, A. *Mémoire de Maîtrise, Université de Montréal, Montréal* **1999**
- 52) Aeschlimann, D.; Paulsson, M. *Thrombosis ans Haemostasis* **1994**, 71 , 402
- 53) Leblanc, A.; Labelle, J.; Gravel, C.; Keillor, J.W. *soumis à J.Biol.Chem.* **2000**
- 54) Gorman J.J.; Folk, J.E. *J.Biol.Chem.* **1984**, 259, 9007
- 55) Ikura, K.; Kometani, T.; Yoshikawa, M.; Sasaki, R.; Chiba, H. *Agric.Biol.Chem.* **1980**, 44, 1567
- 56) Cole, P.W.; Folk, J.E. *J.Biol.Chem.* **1965**, 240, 2951
- 57) Folk, J.E.; Chung, S.I. *Methods in Enzymology* **1985**, 113, 358
- 58) Gorman J.J.; Folk, J.E. *J.Biol.Chem.* **1981**, 256, 2712

- 59) MercierJ-C.; Grosclaude F.; Ribadeau-Dumas, B. *Eur.J.Biochem.* **1971**, 23, 41
- 60) Ribadeau-Dumas, R.B.; Ghislaine, B.; Grosclaude F; MercierJ-C.
Eur.J.Biochem. **1972**, 25, 505
- 61) Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism*, Eds.:W.H.Freemann and
Company, New York 1985

Remerciements

Merci à Dieu pour sa Bonté. J'aimerais aussi remercier tous mes amis, ce qui inclus bien spécialement celle avec qui un jour je me marierai. Merci à mes parents Denise et Martin, mon frère Pierre et mon frère et coloc Daniel. Merci bien fort à Jeffrey mon directeur de recherche, en remerciant mes amis il est automatiquement remercié. J'aimerais pouvoir te rendre un jour aussi service que tu l'as fait pour moi.

Jean et Louise-Marie et votre chère fille Isabelle merci. Merci à ma tante Diane et sa famille, merci, Anne et Alice mes filleules, Alexandre, Jean-François, Marie-Madelaine. Merci au Père François.

Merci à Claude Lavarrière, merci à Marc Vessot pour votre gentillesse. Merci Élisabeth pour ton amitié et pour ton aide dans la vie, la rédaction et ... le jardinage, QDTB . À Paul B. merciiii pour ton amitié ... Merci à Marc D. pour ton aide de chimiste mais surtout ton amitié de tous les moments. Merci Yoan pour ton amitié, ... pis les soirées de hockeys.

Merci à Rosie la Riveuse, tu m'as beaucoup aidé dans l'achèvement de ma maîtrise. Stéphane, merci pour ton aide, et pour les parties de soccer. Merci à Rick, Nick, Anouck, Judith, Christian G., Danielle, Christian L., Claudio, Annie, Pierre D. et Martin S..

Merci au fond FCAR.

Merci à tout ceux que j'aime et tous ceux que j'ai plus de difficulté à aimer.