

2M11.2826.7

Université de Montréal

**Études cinétiques des réactions catalysées par la γ -glutamyl transpeptidase
purifiée des reins de rats**

par

Roselyne Castonguay

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

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

28 août 2000

©Roselyne Castonguay, 2000



QD
3
N54
2001
N.008

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Études cinétiques des réactions catalysées par la γ -glutamyl transpeptidase
purifiée des reins de rats

présenté par :
Roselyne Castonguay

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. R. Giasson (F.A.S. - Chimie)	Président-rapporteur
Dr. J. W. Keillor (F.A.S. - Chimie)	Directeur de recherche
Dr. J. Pelletier (F.A.S. - Chimie)	Membre du jury

Mémoire accepté le : _____

Sommaire

La γ -glutamyl transpeptidase (GGT) est une enzyme hétérodimérique transmembranaire hautement glycosylée. Elle est présente dans les cellules ayant une fonction de sécrétion ou d'absorption, comme celles des reins et du foie. Elle est impliquée notamment dans la détoxification cellulaire par la formation d'acides mercapturiques et l'activation de prodrogues. De plus, elle aurait un rôle à jouer dans l'apoptose et la maladie de Parkinson.

La GGT reconnaît le glutathion (γ -glutamylcystéinyglycine) *in vivo* et transfère la portion γ -glutamyle de ce substrat donneur à un substrat accepteur, généralement un acide aminé ou un peptide, en passant par la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme. Elle peut effectuer trois réactions avec ce substrat : la transpeptidation, l'autotranspeptidation et l'hydrolyse, selon la nature du substrat accepteur. Les acides aminés impliqués dans la reconnaissance du substrat donneur ont été partiellement déterminés par mutagénèse dirigée, mais cette technique implique parfois des changements de conformation de l'enzyme pouvant compliquer l'interprétation des résultats. De plus, les acides aminés impliqués dans la catalyse de l'étape d'acylation au cours de la transpeptidation ne sont pas connus avec certitude. Afin de mieux déterminer le mécanisme de transpeptidation de la GGT, des études cinétiques avec des substrats analogues au glutathion ont été effectuées.

Plusieurs substrats contenant une portion γ -glutamyle modifiée (absence d'un groupement amine primaire, longueur de la chaîne carbonée différente, etc) et une portion *p*-nitrophénolate ont été synthétisés. En les utilisant comme substrats donneurs de la GGT, il est possible de connaître les éléments importants dans la reconnaissance par l'enzyme de ces substrats. Ceux-ci se sont avérés très instables, avec leur lien ester activé se clivant facilement en présence de molécules d'eau. Une deuxième série de substrats, ayant le même squelette carboné que ceux de la première série mais avec un lien amide primaire à la place du lien ester activé, a été synthétisée. Ces substrats ont été utilisés comme inhibiteurs de la réaction de transpeptidation par la GGT du substrat synthétique L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide et du substrat accepteur glycylglycine. Les composés contenant uniquement le groupement

amine primaire ou acide carboxylique se sont révélés être de faibles inhibiteurs et se liaient surtout au site de liaison du substrat accepteur. Il y a donc probablement un site de liaison du substrat donneur très spécifique et formé par un acide aminé chargé négativement et un acide aminé chargé positivement pour la reconnaissance de la portion γ -glutamyle.

Pour un peu mieux étudier l'étape d'acylation, des études ont déjà été effectuées avec des substrats analogues au substrat donneur L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, mais contenant différents substituants électrodonneurs ou électroattracteurs en *para*. Les résultats cinétiques alors obtenus avaient permis de générer un graphique de Hammett où les vitesses maximales obtenues sont placées en fonction d'un dérivé du pK_a de l'aniline libérée. Une courbe dirigée vers le haut avait été obtenue, ce qui peut être expliqué par un changement de géométrie à l'état de transition selon le substituant du substrat donneur. Des études de l'effet de la température ont été effectuées avec trois substrats donneurs typiques ayant les substituants méthoxy, hydrogène et nitro. Des valeurs d'entropie d'activation autour de -20 cal/mol/K ont été obtenues, démontrant le haut degré d'ordre nécessaire. L'enthalpie d'activation était d'environ 8 kcal/mol.

Puisque le premier produit est une aniline relâchée sous sa forme NH_2 , et non NH^+ , un acide aminé présent au site actif doit fournir un proton. Plusieurs profils pH-vitesse ont été effectués à différentes températures, ce qui a permis de déterminer à chacune d'entre elles la valeur du pK_a . Une courbe de van't Hoff a pu être générée et a permis d'associer le pK_a à une histidine.

Toutes ces informations ont permis de proposer un mécanisme pour l'étape d'acylation de la GGT. Après la formation d'un intermédiaire tétraédrique, il y a simultanément bris du lien C-N entre le carbonyle de la portion γ -glutamyle et l'aniline et protonation de l'atome d'azote de l'aniline. Selon les substituants présents sur l'aniline, les liens seront plus ou moins longs à l'état de transition, ce qui change la géométrie de l'état de transition et explique les valeurs fortement négatives de l'entropie d'activation. La protonation est probablement effectuée par l'histidine identifiée par les études de van't Hoff.

Table des matières

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
DÉDICACE	xvii
REMERCIEMENTS	xviii

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Qu'est-ce que l'enzymologie ?.....	1
1.2 La γ -glutamyl transpeptidase.....	2
1.2.1 Généralités.....	2
1.2.2 Rôles physiologiques.....	3
1.2.3 Structure de la GGT	4
1.2.4 Réaction catalysée	4
1.2.5 Acides aminés impliqués dans la reconnaissance et la catalyse.....	6
1.2.6 Mécanisme proposé.....	8
1.2.7 Objectifs de recherche	9
1.2.7.1 Synthétiser des substrats analogues pour la GGT	9
1.2.7.2 Tester les molécules synthétisées	10
1.2.7.3 Étudier l'état de transition de la réaction limitante catalysée par la GGT.....	10
1.2.7.4 Étudier l'effet combiné du pH et de la température sur l'acylation de la GGT	10

Chapitre 2 : Synthèse de substrats analogues

2.1 Introduction	12
2.2 Résultats	16
2.3 Discussion	19

Chapitre 3 : Tests cinétiques des molécules synthétisées

3.1 Introduction	22
3.2 Résultats	25
3.2.1 Molécules agissant comme substrats donneurs	25
3.2.2 Molécules contenant un lien amide primaire.....	29
3.3 Discussion	33

Chapitre 4 : Études de l'état de transition de la réaction limitante dans l'étape d'acylation

4.1 Introduction	38
4.2 Résultats	42
4.3 Discussion	43

Chapitre 5 : Effets simultanés du pH et de la température

5.1 Introduction	47
5.2 Résultats	49
5.3 Discussion	54

Chapitre 6 : Conclusion.....57

Chapitre 7 : Partie expérimentale

7.1. Synthèse de substrats analogues.....	67
7.1.1 Matériel	67
7.1.2 Méthode expérimentale	67
7.2. Études cinétiques impliquant les composés synthétisés.....	79
7.2.1 Matériel	79
7.2.2 Méthode.....	79
7.2.2.1 Composés contenant un lien ester activé.....	79
7.2.2.2 Composés contenant un lien amide primaire.....	80
7.2.2.3 Études cinétiques à l'aide de la spectroscopie RMN	81
7.3 Tests cinétiques pour les courbes de Eyring	82
7.3.1 Matériel	82
7.3.2 Méthode.....	83
7.3.2.1 Courbes étalons pour la <i>p</i> -nitroaniline à pH 8,0	83
7.3.2.2 Cinétiques avec le substrat donneur L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide	83
7.3.2.3 Cinétiques avec les substrats donneurs L- γ -glutamyl- <i>p</i> -méthoxyanilide et L- γ -glutamylanilide	84
7.4 Études cinétiques pour la courbe de van't Hoff.....	86
7.4.1 Matériel	86
7.4.2 Méthode.....	86
7.4.2.1 Courbes étalons pour la <i>p</i> -nitroaniline à différents pH	86
7.4.2.2 Études cinétiques à différents pH et températures	87

Références.....88

Annexe 1 : Concepts cinétiques

1. Équation de Michaelis-Menten (1).....	xix
1.1 Approximation de l'équilibre.....	xx
1.2 Approximation de l'état stationnaire.....	xx
2. Mécanisme ping-pong modifié (1,39).....	xxiii
3. Inhibition réversible d'une enzyme (60).....	xxv
3.1 Inhibition compétitive	xxv
3.2 Inhibition incompétitive	xxx
3.3 Inhibition non-compétitive	xxxii
3.3.1 Inhibition non-compétitive simple	xxxiii
3.3.2 Inhibition non-compétitive mixte.....	xxxiv
4. Théorie de l'état de transition (51,8,50).....	xxxvi
5. Le profil pH-vitesse d'une enzyme (1,61).....	xxxviii
6. Détermination du pK_a à partir des courbes Lineweaver-Burk	xxxix

Annexe 2 : Tableaux de constantes cinétiques.....	xli
--	------------

Liste des figures

Figure 1 :	Graphique de l'énergie d'un système où une réaction catalysée par une enzyme est comparée à une réaction non-catalysée. E représente l'enzyme, S et P sont le substrat et le produit, respectivement, et A, B, C et D sont les intermédiaires formés au cours de la réaction. ΔG° est la différence de l'énergie libre de Gibbs.	2
Figure 2 :	Nature des réactions catalysées par la GGT. CysH-Gly représente la cystéinyglycine.	5
Figure 3 :	Mécanisme ping-pong modifié proposé pour les réactions catalysées par la GGT. E représente l'enzyme. X est le nucléophile impliqué au site actif. R, R' et R'' sont des chaînes carbonées.	8
Figure 4 :	Structure du L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide. La partie en gras représente la portion γ -glutamyle.	13
Figure 5 :	Molécules désirées contenant une portion <i>p</i> -nitrophénolate.	15
Figure 6 :	Molécules désirées contenant une portion amide primaire.	15
Figure 7 :	Schéma réactionnel menant à la synthèse du L- γ -glutamate de <i>p</i> -nitrophényle 2a et au L- γ -isoglutamate de <i>p</i> -nitrophényle 2b	16
Figure 8 :	Schéma réactionnel menant à la synthèse du glutarate de <i>p</i> -nitrophényle 3 et du 4-aminobutyrate de <i>p</i> -nitrophényle 6	17
Figure 9 :	Schéma réactionnel menant à la synthèse du 4-carboxybutyramide 7 et du 4-aminobutyramide 9	18
Figure 10 :	Réaction de transpeptidation catalysée par la GGT.	23
Figure 11 :	Réaction de transpeptidation de la GGT en présence d'un inhibiteur.	24
Figure 12 :	Réaction de transpeptidation entre 0,051 U de GGT et 500 μ M du substrat donneur acétate de <i>p</i> -nitrophényle en présence de 20 mM de glycylglycine dans un tampon 0,1 M MOPS pH 7,0. Le premier graphique contient de la GGT, alors que le deuxième est le test témoin sans enzyme.	26
Figure 13 :	Réaction de transpeptidation catalysée entre 0,051 U GGT et 500 μ M du substrat donneur L- γ -glutamate de <i>p</i> -nitrophényle	

	en présence de 20 mM de glycylglycine dans un tampon 0,1 M MOPS pH 7,0. Le premier graphique représente le test en présence d'enzyme, alors que le deuxième n'en contient pas.....	26
Figure 14 :	Courbe Lineweaver-Burk pour la transpeptidation par 0,0034 U GGT du L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide en présence de 20 mM glycylglycine et de concentrations constantes de l'inhibiteur (I) 4-carboxybutyramide dans 0,1 M MOPS pH 7,0.....	30
Figure 15 :	Courbe de Dixon pour la transpeptidation de différentes concentrations du L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide (S) par la GGT en présence de différentes concentrations de l'inhibiteur 4-carboxybutyramide dans 0,1 M MOPS pH 7,0.....	31
Figure 16 :	Structure des composés L- γ -glutamylanilides <i>p</i> -substitués avec différents groupements électrodonneurs et électroattracteurs.....	38
Figure 17 :	Méthode de révélation d'anilines, libérées par la GGT, par la technique de diazotation.....	39
Figure 18 :	Courbe de Hammett pour la transpeptidation des substrats donneurs L- γ -glutamylanilides <i>p</i> -substitués dans des conditions saturantes du substrat accepteur glycylglycine. σ représente le paramètre de Hammett. Un ratio de la constante de vitesse d'un anilide <i>p</i> -substitué X sur la constante de vitesse de l'anilide (avec l'hydrogène comme substituant) est placé en ordonnée.....	40
Figure 19 :	Courbe de Eyring pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamylanilide en présence de 20 mM du substrat accepteur glycylglycine dans un tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 à différentes températures.....	42
Figure 20 :	Profil pH-vitesse pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide en présence de 20 mM glycylglycine à 37 °C.....	48
Figure 21 :	Profil pH obtenu pour la transpeptidation, par la GGT, du L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide en présence de 20 mM glycylglycine à 37 °C. Les triangles représentent les données expérimentales et la ligne est la courbe théorique tracée par l'ordinateur selon le modèle proposé dans le chapitre 7.....	50

- Figure 22 :** Courbe Lineweaver-Burk pour la transpeptidation du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 37 °C..... 51
- Figure 23 :** Courbe secondaire où les pentes de la courbe Lineweaver-Burk (L-B, figure 22) sont placées en fonction de l'inverse de la concentration de protons (directement relié au pH)..... 52
- Figure 24 :** Courbe de van't Hoff pour la transpeptidation, par la GGT, du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de 20 mM glycylglycine à différents pH et températures. 53
- Figure 25 :** Proposition d'un mécanisme impliquant un changement de géométrie de l'état de transition selon la nature du substituant en position *para* des substrats donneurs L- γ -glutamyl-anilides. Nuc est le nucléophile présent au site actif, GED correspond à un groupe électrodonneur et GEA, à un groupe électroattracteur. R est la portion γ -glutamyle du substrat donneur..... 60
- Figure 26 :** Graphique de More-O'Ferrall/Jencks pour le substituant hydrogène..... 61
- Figure 27 :** Graphique de More-O'Ferrall/Jencks pour le substituant méthoxy..... 62
- Figure 28 :** Graphique de More-O'Ferrall/Jencks pour le substituant nitro..... 63
- Figure 29 :** Courbe de saturation correspondant à l'équation Michaelis-Menten. Les valeurs de K_M et V_{max} sont déterminées expérimentalement comme indiqué..... xxiii
- Figure 30 :** Courbe de type Lineweaver-Burk. Les valeurs de K_M et V_{max} sont déterminées expérimentalement comme indiqué..xxiii
- Figure 31 :** Réactions catalysées par la GGT dans le cadre d'un mécanisme ping-pong modifié. A et B sont les substrats donneur et accepteur respectivement. P, Q et R sont les produits libérés au cours des réactions. E est la forme libre de l'enzyme, alors que F est la forme liée à la portion γ -glutamyle. k est la constante de vitesse d'une réaction..... xxiv
- Figure 32 :** Allure de la courbe Lineweaver-Burk pour une inhibition compétitive.....xxviii

- Figure 33 :** Courbe secondaire de la courbe Lineweaver-Burk permettant de déterminer la valeur du K_i **xxix**
- Figure 34 :** Courbe typique de Dixon. L'intersection des droites donne la valeur du K_i **xxx**
- Figure 35 :** Courbe typique de Lineweaver-Burk pour l'inhibition incompétitive. **xxxii**
- Figure 36 :** Courbe typique de Lineweaver-Burk pour l'inhibition non-compétitive simple. **xxxiv**
- Figure 37 :** Courbe typique Lineweaver-Burk pour l'inhibition non-compétitive mixte lorsque $K_i < K_i'$ **xxxv**
- Figure 38 :** Courbe Lineweaver-Burk pour l'inhibition non-compétitive mixte lorsque $K_i' < K_i$ **xxxv**
- Figure 39 :** Graphique de Eyring selon l'équation (45). **xxxvii**
- Figure 40 :** Graphique de Lineweaver-Burk montrant l'effet inhibiteur des protons. **xxxix**
- Figure 41 :** Courbe secondaire du graphique Lineweaver-Burk menant à la détermination de la valeur du K_a **xl**

Liste des tableaux

Tableau I	Résultats cinétiques obtenus lors de l'utilisation des molécules contenant un lien ester activé comme substrats donneurs de la GGT en présence de 20 mM glycylglycine à pH 7,0.....	27
Tableau II	Valeurs de la constante d'inhibition K_i et type d'inhibition pour les molécules testées contenant un lien amide primaire	32
Tableau III	Enthalpie et entropie d'activation pour la transpeptidation par la GGT de différents substrats donneurs L- γ -glutamyl-anilides <i>p</i> -substitués en présence de 20 mM glycylglycine à différentes températures.....	43
Tableau IV	Valeurs du deuxième pK_a , obtenues à partir de profils pH à différentes températures, en utilisant la technique des courbes de Lineweaver-Burk	53
Tableau V	Valeurs des coefficients d'extinction molaire déterminés à différents pH dans différents tampons	87
Tableau VI	Constante de Michaelis (K_M) et vitesse maximale (V_{max}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine et de différentes concentrations de l'inhibiteur 4-carboxybutyramide sous certaines conditions réactionnelles	xli
Tableau VII	Constante de Michaelis (K_M) et vitesse maximale (V_{max}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine et de différentes concentrations de l'inhibiteur 4-aminobutyramide sous certaines conditions réactionnelles	xli
Tableau VIII	Constante de Michaelis (K_M) et vitesse maximale (V_{max}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine et de différentes concentrations de l'inhibiteur glutamine sous certaines conditions réactionnelles.....	xlii
Tableau IX	Constante de Michaelis (K_M) et vitesse maximale (V_{max}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine et de différentes concentrations de l'inhibiteur glutamine amide sous certaines conditions réactionnelles.....	xlii

- Tableau X** Constante de Michaelis (K_M) et vitesse maximale (V_{max}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine et de différentes concentrations de l'inhibiteur N-acétyl-glutamine sous certaines conditions réactionnelles**xl**
- Tableau XI** Constante de vitesse normalisée (k_{cat}^{norm}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-méthoxyanilide en présence de l'accepteur glycylglycine à différentes températures sous certaines conditions réactionnelles**xliv**
- Tableau XII** Constante de vitesse normalisée (k_{cat}^{norm}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamylanilide en présence de l'accepteur glycylglycine à différentes températures sous certaines conditions réactionnelles.....**xliv**
- Tableau XIII** Constante de vitesse normalisée (k_{cat}^{norm}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine à différentes températures sous certaines conditions réactionnelles.....**xliv**
- Tableau XIV** Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 15 °C**xl**
- Tableau XV** Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 25 °C**xl**
- Tableau XVI** Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 30 °C**xlvi**
- Tableau XVII** Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 37 °C**xlvi**
- Tableau XVIII** Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 40 °C**xlvii**
- Tableau XIX** Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 50 °C**xlvii**

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Arg	Acide aminé arginine
Asp	Acide aminé acide aspartique
Boc	Groupement protecteur <i>tert</i> -butoxycarbonyle
br s	Dans les spectres RMN : singulet élargi à la base
calc.	Masse calculée théorique correspondant à une formule empirique
ccm	Chromatographie sur couche mince
CHES	Acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonique : solution tamponnée
Cys	Acide aminé cystéine
d	Dans les spectres RMN : pic ayant l'allure d'un doublet
D	Isomère de configuration absolue "D"
dd	Dans les spectres RMN : pic ayant l'allure d'un doublet dédoublé
DMAP	4,4-diméthylaminopyridine
DMF	Solvant N,N-diméthylformamide
DMSO	Solvant diméthylsulfoxyde
E	Enzyme
EC	Enzyme Commission (numéro de classification correspondant à une enzyme)
ES	Complexe Michaelis : complexe enzyme-substrat
GEA	Groupe électroattracteur
GED	Groupe électrodonneur
GGT	γ -Glutamyl transpeptidase
Glu	Acide aminé acide glutamique
Gly	Acide aminé glycine
His	Acide aminé histidine
J	Dans les spectres RMN : constante de couplage
K _a	Constante d'équilibre d'un acide
kD	Kilodalton : unité de masse pour les enzymes, correspondant à 1000 g par mole

K_i	Constante d'inhibition
K_M	Constante de Michaelis
K_S	Constante de dissociation
L	Isomère de configuration absolue "L"
m	Dans les spectres RMN : pic ayant l'allure d'un multiplet
$(M + H)^+$	Dans les spectres de masse : masse de l'ion moléculaire additionnée de celle d'un atome d'hydrogène
$(M + K)^+$	Dans les spectres de masse : masse de l'ion moléculaire additionnée de celle d'un atome de potassium
m/z	Dans les spectres de masse : masse de l'ion moléculaire
MOPS	Acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique : solution tamponnée
<i>p</i>	Position <i>para</i> d'un substituant sur un cycle aromatique
pD	Logarithme négatif de la concentration de deutériums
p.f.	Point de fusion
pH	Logarithme négatif de la concentration de protons
pK_a	Logarithme de la constante d'équilibre d'un acide
qu	Dans les spectres RMN : pic ayant l'allure d'un quintuplet
RMN	Résonance magnétique nucléaire : technique de spectroscopie
S	Substrat
s	Dans les spectres RMN : pic ayant l'allure d'un singulet
Ser	Acide aminé sérine
SM	Spectre de masse : technique de spectrométrie
t	Dans les spectres RMN : pic ayant l'allure d'un triplet
<i>t</i> -Bu	Groupement protecteur <i>tert</i> -butyl lié à un oxygène
td	Dans les spectres RMN : pic ayant l'allure d'un triplet dédoublé
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane : solution tamponnée
U	Unité enzymatique
V_{max}	Vitesse maximale
α	Position α d'un substituant sur une chaîne carbonée
β	Position β d'un substituant sur une chaîne carbonée
δ	Déplacement chimique dans un spectre RMN

ΔG°	Différence d'énergie libre de Gibbs
ΔH	Énergie de dissociation
ΔH^\ddagger	Enthalpie d'activation
ΔS^\ddagger	Entropie d'activation
ε	Coefficient d'extinction molaire
γ	Position γ d'un substituant sur une chaîne carbonée
σ	Sigma : paramètre de Hammett

À mes parents, pour leur
support de tous les instants
et pour m'avoir transmis
le goût d'apprendre

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Prof. Jeffrey W. Keillor. Il m'a donné le goût de faire de la recherche et de toujours pousser plus loin les limites de mon savoir. De plus, il a toujours été présent avec ses conseils et ses encouragements, dans les bons et les mauvais moments. J'ai passé deux belles années de maîtrise et je suis sûre que cet environnement sera toujours présent au cours de mes études de doctorat dans son laboratoire.

Un gros merci est adressé à mes amis, ma famille et mes collègues de travail, anciens et présents. Anouk, Nicolas et surtout Annie, qui a débuté le projet sur lequel j'ai travaillé, ont été présents au tout début de ma maîtrise et m'ont aidée à plusieurs moments à surmonter les premières épreuves à se présenter devant moi. Paul, Stéphane, Claudio, Pierre, Judith, Danielle, Christian L., Christian G., Caroline et Nadia ont réussi à créer une ambiance propice au travail, au dépassement de soi, mais aussi à une franche camaraderie. Merci pour tout et j'espère que cela va continuer pour les prochaines années.

Je ne pourrais passer sous silence l'aide toute spéciale de Christian G. et Christian L. qui ont eu la gentillesse de lire ce mémoire de maîtrise. Un merci tout spécial est adressé à Christian L. pour toutes ses idées sur mon projet. J'espère sincèrement que nos longues et passionnantes discussions sur le projet GGT vont continuer pour les années de doctorat que nous traverserons ensemble.

J'ai également pu profiter, durant mes études de maîtrise, d'une bourse du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) et de la Bourse Louise et Bernard Lamarre à la recherche. Je tiens à remercier ces deux organismes subventionnaires pour leur support financier.

Chapitre 1

Introduction

1.1 Qu'est-ce que l'enzymologie ?

L'être humain est formé entre autres d'une multitude de macromolécules nécessaires au maintien de la vie. En effet, que ce soit au niveau de la réplication de l'ADN, de la digestion d'aliments ou de la respiration, ces molécules complexes jouent un rôle prépondérant. Par exemple, les phospholipides sont des acides gras se retrouvant notamment dans les membranes biologiques, assurant ainsi l'intégrité de la cellule. Les bases azotées, quant à elles, sont à la base de l'information génétique encodée dans les chromosomes et permettent ainsi la transmission de caractéristiques précises aux futures générations. Les sucres sont impliqués dans plusieurs fonctions régulatrices et de structure. Une classe très importante de macromolécules est formée par les protéines, type de "polymères" formés de l'agencement de plusieurs "monomères" de nature différente, les acides aminés. Il peut s'agir de protéines de transport (notamment dans la respiration, pour le transport de l'oxygène et du gaz carbonique), de récepteurs situés à la surface des cellules (nécessaires à toute voie de signalisation intracellulaire), de protéines structurelles (aidant à donner une forme rigide à une cellule) et également d'enzymes (1,2).

Les enzymes sont des protéines ayant la capacité de catalyser une réaction. Les réactions biologiques sont très défavorisées au niveau chimique et nécessiteraient de fortes conditions de réaction pour se réaliser, mais grâce à la présence d'un catalyseur, il est possible de les accélérer, de manière à ce qu'elles soient compatibles avec leur rôle chez le vivant. Une efficacité maximale est obtenue avec une enzyme, car il est possible de réguler cette dernière grâce à la liaison d'autres molécules (produits de la réaction catalysée par cette enzyme, par exemple). De plus, la spécificité du substrat reconnu par l'enzyme et les vitesses de catalyse atteintes permettent d'obtenir un contrôle très précis de réactions vitales. Les enzymes

permettent d'abaisser le niveau de la barrière énergétique à surmonter pour qu'une réaction se produise, comme il est indiqué à la figure 1.

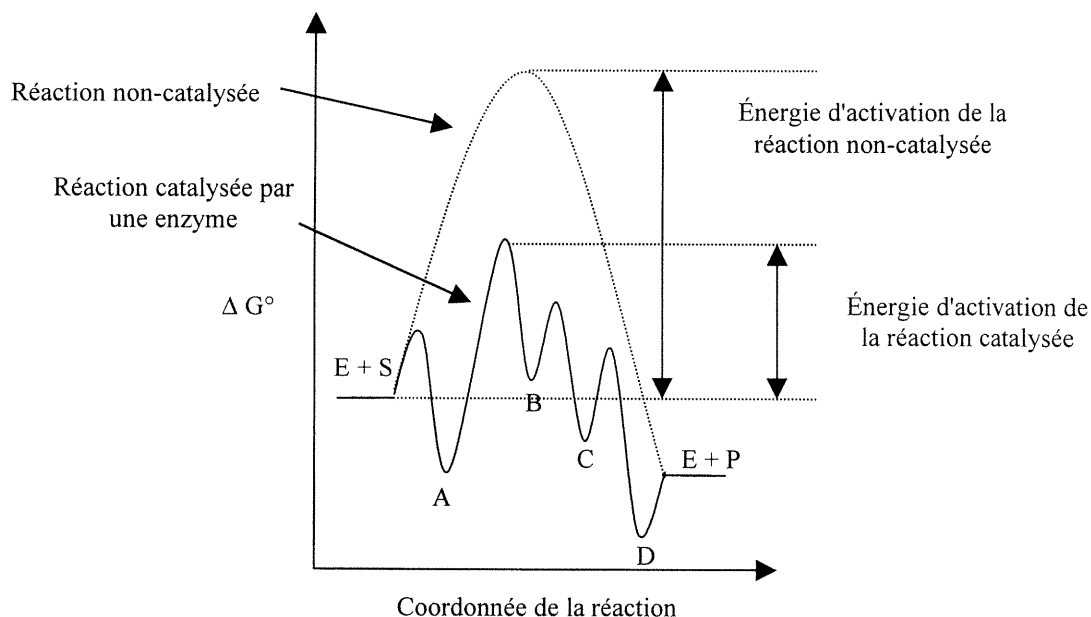


Figure 1 : Graphique de l'énergie d'un système où une réaction catalysée par une enzyme est comparée à une réaction non-catalysée. E représente l'enzyme, S et P sont le substrat et le produit, respectivement, et A, B, C et D sont les intermédiaires formés au cours de la réaction. ΔG° est la différence de l'énergie libre de Gibbs.

1.2 La γ -glutamyl transpeptidase

1.2.1 Généralités

La γ -glutamyl transpeptidase (GGT) (EC 2.3.2.2.) est une enzyme hétérodimérique fortement glycosylée liée à la membrane cellulaire (3). Elle se retrouve dans les bordures en brosse des cellules épithéliales des tubules proximaux du rein, les podocytes (4), le cerveau (5,6), le conduit biliaire, la vésicule séminale (7), les cellules lymphoïdes (8,9) et le système reproducteur masculin (10). Elle est donc principalement trouvée dans des cellules impliquées dans la sécrétion ou l'absorption de substances diverses. La GGT est la plus active et la plus concentrée

dans le rein, mais sa quantité dans le foie peut augmenter considérablement lors d'un cancer (3).

1.2.2 Rôles physiologiques

La GGT est impliquée dans plusieurs phénomènes physiologiques. Le substrat naturellement reconnu par la GGT est le glutathion (γ -glutamylcystéinyglycine), agent important dans la protection de la cellule contre les espèces oxydantes. Le glutathion peut, grâce à sa cystéine, se conjuguer à des composés chimiques pour faciliter leur retrait du corps humain, permettant ainsi une détoxification cellulaire. La GGT clive la portion γ -glutamyle du glutathion, de manière à ce que le dipeptide et la portion clivée puissent pénétrer dans la cellule. Par la suite, grâce au cycle γ -glutamyl, la synthèse du glutathion peut se refaire dans la cellule. La GGT est donc l'une des plus importantes pour contrôler la quantité de glutathion disponible (11). De plus, la portion γ -glutamyle peut être fixée par la GGT à un acide aminé à l'extérieur de la cellule (réaction de transpeptidation, expliquée plus tard). Ce γ -glutamyl-acide aminé peut être transporté dans la cellule et se séparer pour régénérer l'acide aminé libre et un dérivé du γ -glutamyle. Ainsi, la GGT semble être impliquée dans le transport d'acides aminés divers à travers la membrane cellulaire (12).

La GGT semble également former des peroxydes qui, en présence de fer, mènent à l'inhibition de l'apoptose (mort cellulaire programmée), pouvant ainsi aider à la prolifération des tumeurs (13,14). La GGT est aussi très active dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson (15). Elle sert à interconvertir des leucotriènes, molécules très importantes dans le système immunitaire de tout humain (16). Pour une raison inconnue, elle est présente en très grande quantité dans le foie lorsque des tumeurs s'y trouvent, servant donc de marqueur biologique dans des tests cliniques quotidiens (3). Malgré tous ces rôles de la GGT, il est très difficile de savoir son rôle exact et son mécanisme d'action dans ces situations.

1.2.3 Structure de la GGT

La GGT est formée de deux sous-unités protéiques dont les masses moléculaires varient en fonction de l'espèce. Par exemple, la GGT du rat est formée de la grande sous-unité de masse 51 kD et la petite sous-unité de 22 kD. Cependant, si la purification est effectuée en présence de papaine, la grande sous-unité est réduite par protéolyse à une masse de 46 kD (3). La grande sous-unité relie l'enzyme à la membrane cellulaire grâce à un fragment hydrophobe et la petite sous-unité se lie de manière non-covalente à la grande sous-unité (17). Ce fragment hydrophobe est justement clivé durant la purification à la papaine, ce qui explique la différence de masse moléculaire. Cependant, l'absence de ce fragment n'affecte en rien l'activité catalytique de l'enzyme (18). Les deux sous-unités proviennent d'un même précurseur propeptide clivé au niveau de la membrane pour former l'enzyme native (19,20). Il semble que le site actif de l'enzyme soit à l'interface des deux sous-unités (21).

1.2.4 Réaction catalysée

La GGT reconnaît principalement le glutathion comme substrat. Celui-ci agit comme substrat donneur d'une portion γ -glutamyle. Cette portion semble se positionner sur l'enzyme pour former un intermédiaire γ -glutamyl-enzyme qui n'a jamais été isolé. La nature du lien covalent ainsi formé est toujours controversée (22,23). Durant cette étape, il y a libération d'un premier produit (dans le cas du glutathion, il s'agit de la cystéinyglycine). Cet intermédiaire se lie à un substrat accepteur de la portion acyle (souvent un acide aminé ou un peptide) pour régénérer l'enzyme libre et libérer un deuxième produit γ -glutamyl-accepteur. La figure 2 montre les différentes réactions catalysées par la GGT.

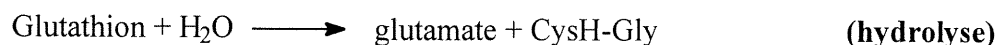
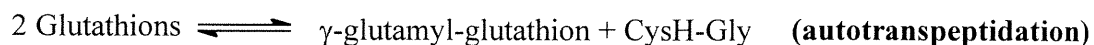
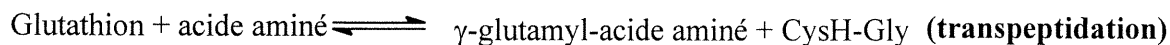


Figure 2 : Nature des réactions catalysées par la GGT. CysH-Gly représente la cystéinyglycine.

Si l'accepteur est un acide aminé, un nouveau lien amide dans le deuxième produit est formé, ce qui donne une réaction de transpeptidation. Si une deuxième molécule de glutathion est utilisée comme substrat accepteur, il y a autotranspeptidation. En présence d'une molécule d'eau, une hydrolyse irréversible du substrat donneur est observée. Il est cependant possible de choisir les conditions réactionnelles en laboratoire, de manière à ce qu'une des réactions soit favorisée par rapport aux autres (3,12). L'importance des réactions *in vivo* l'une par rapport aux autres est vivement discutée, car il faut tenir compte des concentrations relatives de certains acides aminés dans des conditions physiologiques précises (24,25).

Plusieurs substrats contenant une portion γ -glutamyle ont été utilisés afin d'étudier plus facilement la GGT. Par exemple, le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide libère, après sa catalyse par l'enzyme, une *p*-nitroaniline facilement détectable par spectrophotométrie. Ceci est en fait le substrat le plus souvent utilisé pour étudier la GGT (26). Le γ -glutamyl- α -naphthylamide, qui libère un composé fluorescent, a également été utilisé (27).

De façon générale, les substrats donneurs peuvent être de configuration D ou L sans problème pour la reconnaissance. De plus, la spécificité stérique est très large, car des molécules aussi grosses que des dérivés S-conjugués du glutathion sont facilement reconnus (3). Cependant, les sous-sites reconnaissant le substrat accepteur demandent une stéréospécificité beaucoup plus stricte. En effet, les acides aminés

agissant comme accepteurs ne doivent être que de la configuration absolue L. Dans l'utilisation d'un dipeptide, il est préférable que le deuxième acide aminé soit une glycine. De plus, certains acides aminés agissent comme de meilleurs accepteurs (28). Donc, en utilisant un substrat donneur de configuration L et un substrat accepteur, il y a un mélange de transpeptidation, d'autotranspeptidation et d'hydrolyse (toutes les expériences se font en milieu aqueux). Avec un substrat donneur de configuration D et un substrat accepteur, l'autotranspeptidation est impossible, car le substrat donneur ne peut pas agir comme accepteur et il y a alors seulement la transpeptidation et l'hydrolyse. En enlevant tout accepteur aminé possible et en utilisant un substrat de configuration D, seule l'hydrolyse est visible, malgré sa très faible vitesse (12).

1.2.5 Acides aminés impliqués dans la reconnaissance et la catalyse

Plusieurs acides aminés présents dans le site actif de l'enzyme sont impliqués dans la reconnaissance des substrats donneur et accepteur et dans la catalyse de différentes réactions. Les principaux résultats proviennent de l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques à un type d'acides aminés ou de la mutagenèse dirigée. Cette dernière technique a été largement utilisée pour l'identification d'acides aminés importants dans le site de liaison du substrat donneur. Le résidu Arg-107 de la grande sous-unité chez l'humain semble être impliqué dans la liaison du substrat grâce à son groupe guanidinium qui peut faire une interaction électrostatique et des ponts hydrogènes avec la portion acide carboxylique du γ -glutamyle du substrat donneur. Dans la même recherche, le résidu Glu-108 de la grande sous-unité a été identifié comme étant important dans la liaison de l'accepteur et dans la catalyse effectuée par l'enzyme (21). Le résidu Asp-423 de la petite sous-unité est également important dans la liaison du substrat donneur, car il semble stabiliser la charge positive du groupement amine primaire de la portion γ -glutamyle (29). Ces études ont été faites par mutagenèse dirigée, donc elles donnent de bonnes indications sur les acides aminés importants. Cependant, il est toujours possible que la mutation d'un résidu change énormément la conformation de l'enzyme, ce qui peut modifier

beaucoup la catalyse enzymatique et donner de faux résultats sur le rôle réel de l'acide aminé muté.

Certains chercheurs ont tenté de déterminer les acides aminés importants dans le site actif de l'enzyme. La présence d'une cystéine comme nucléophile dans la petite sous-unité a été rapidement oubliée, car sa mutation n'a causé aucun effet sur l'activité (29). Un groupement hydroxyle semble être impliqué, car l'utilisation de l'inhibiteur fluorure de phénylméthane sulfonyle (PMSF), spécifique à des protéases à sérine, a inhibé la GGT (30). De plus, l'acivicine (acide L-(α S,5S)- α -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacétique) a inhibé la GGT en formant un lien avec la thréonine 523 de la petite sous-unité (31,32,33). Cependant, il est possible que l'acivicine réagisse avec un résidu non-identifié jusqu'à maintenant et subisse ensuite une transestérification pour se fixer à la thréonine identifiée (12). Une mutation de sérines conservées dans la GGT de l'humain a permis d'identifier les résidus Ser-451 et Ser-452 de la petite sous-unité comme étant importants dans la catalyse et la liaison de l'acivicine (34). De plus, la sérine et le borate, placés ensemble, forment un complexe et peuvent agir comme inhibiteurs de la GGT en se liant probablement aux deux sérines, ce qui peut confirmer l'importance de celles-ci dans le site actif de l'enzyme, mais sans preuve réelle (35). Les résidus His-383 et His-505 de la petite sous-unité ont été mutés pour voir leur importance dans une catalyse acide-base éventuelle. Il s'est avéré qu'un faible pourcentage d'activité soit encore présent, ce qui pousse les auteurs à croire qu'il ne s'agit pas d'acides aminés importants (36). Cependant, il ne faut pas oublier que l'activité résiduelle peut être due à un autre type de catalyse (par approche des substrats dans le site actif, désolvatation, interactions électrostatiques, etc) et que les mutations ont pu empêcher la catalyse la plus probable effectuée par ces acides aminés, la catalyse acide-base générale.

Une des hypothèses avancées est la présence de trois sous-sites pour lier les substrats donneurs. En effet, puisque le glutathion, le substrat *in vivo* de la GGT, est formé de trois acides aminés, il semble y avoir trois endroits distincts pour effectuer la reconnaissance des substrats. Le sous-site 1 reconnaît la portion γ -glutamyle du

substrat donneur et est situé dans la petite sous-unité, comme il a été démontré par des études de marquage radio-actif (37). Les sous-sites 2 et 3 reconnaissent normalement la cystéine et la glycine du glutathion. Il semble que ces deux sous-sites soient impliqués dans la reconnaissance du substrat accepteur (38). Cela expliquerait très bien pourquoi les dipeptides dont le deuxième acide aminé est une glycine sont très bien reconnus comme substrats accepteurs. Les sous-sites 2 et 3 seraient situés à l'interface des deux sous-unités, compliquant ainsi un peu leur étude(3). Il n'y a cependant pas encore de structure cristalline de GGT de mammifère permettant de prouver la localisation des acides aminés présentés plus haut.

1.2.6 Mécanisme proposé

Grâce aux informations recueillies par la mutagenèse dirigée et les différents substrats reconnus par la GGT, certains chercheurs ont proposé le mécanisme de type ping-pong modifié qui se retrouve à la figure 3.

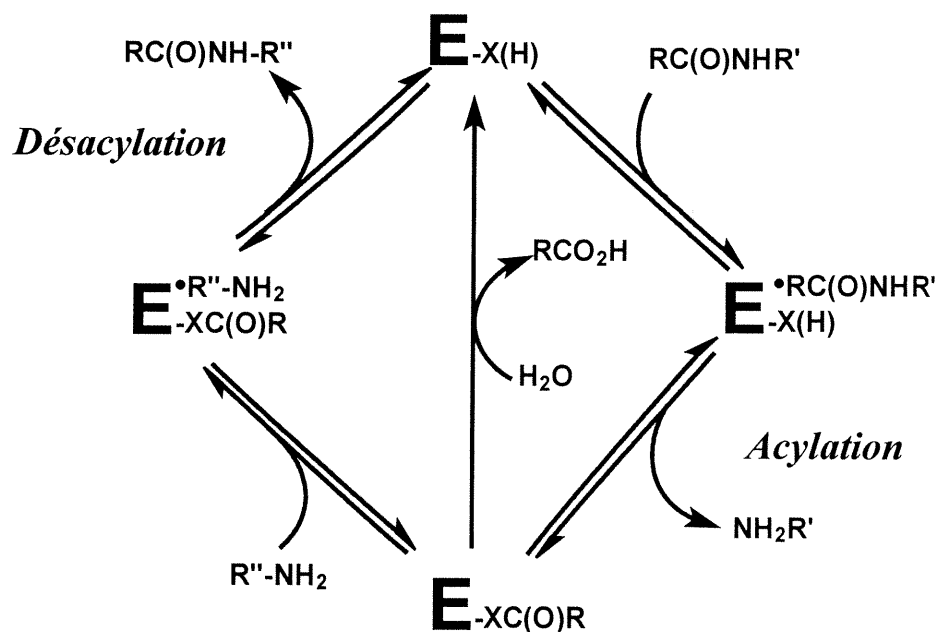


Figure 3 : Mécanisme ping-pong modifié proposé pour les réactions catalysées par la GGT. E représente l'enzyme. X est le nucléophile impliqué au site actif. R, R' et R'' sont des chaînes carbonées.

La transpeptidation est donc formée de deux étapes : l'acylation, menant à l'intermédiaire γ -glutamyl-enzyme et la libération d'un premier produit, et la désacylation, menant à la régénération de l'enzyme libre et la libération du deuxième produit. La réaction d'hydrolyse est représentée par la flèche au centre de la figure 3 (39). Cependant, certains auteurs croient que le mécanisme est plutôt séquentiel et implique la formation d'un complexe enzyme - substrat donneur - substrat accepteur (40).

1.2.7 Objectifs de recherche

Il manque encore beaucoup d'informations concernant le mécanisme chimique se déroulant dans le site actif de l'enzyme. De plus, les informations recueillies jusqu'à maintenant sur les acides aminés au site de liaison de la GGT peuvent être faussées de par la technique utilisée pour les identifier. Afin de pouvoir mieux préciser la nature des acides aminés impliqués dans la reconnaissance et la catalyse de la GGT et de proposer un mécanisme pour l'étape limitante de la transpeptidation, les objectifs de recherche suivants sont visés :

1.2.7.1 Synthétiser des substrats analogues pour la GGT

La mutagénèse dirigée offre l'avantage de substituer un acide aminé pour un autre, mais l'effet global sur la conformation de l'enzyme est rarement contrôlé. De façon à vérifier ces résultats, la synthèse de substrats dont la portion γ -glutamyle a été variée (longueur de la chaîne carbonée, présence des groupements amine primaire et acide carboxylique, etc) a été réalisée. Les schémas réactionnels menant à la synthèse de ces molécules sont représentés au chapitre 2 et les détails expérimentaux menant à leur synthèse, au chapitre 7.

1.2.7.2 Tester les molécules synthétisées

Les molécules synthétisées du chapitre 2 doivent être testées, de manière à voir leur efficacité ou non comme substrats donneurs de la GGT. Pour y arriver, différentes méthodes ont dû être utilisées et sont expliquées au chapitre 3. Les résultats expérimentaux sont discutés et une conclusion quant aux acides aminés importants dans la reconnaissance du substrat donneur sera indiquée. De plus, les résultats obtenus mettront en évidence la possibilité d'utiliser l'un des substrats synthétisés pour l'étude mécanistique de l'étape de désacylation de la GGT.

1.2.7.3 Étudier l'état de transition de la réaction limitante catalysée par la GGT

La nature des acides aminés nécessaires à la catalyse de l'étape d'acylation peut être déterminée en partie par une courbe d'énergie libre appelée courbe de Hammett. Des résultats antérieurs dans le laboratoire avaient permis de tirer certaines conclusions, mais il est nécessaire de confirmer les résultats obtenus. En effet, cette expérience avait permis de prédire que l'étape d'acylation était l'étape limitante dans la réaction de transpeptidation de la GGT. Pour confirmer ces résultats, une étude de l'effet de la température sur les vitesses de catalyse a été effectuée, de manière à pouvoir un peu mieux caractériser l'état de transition de cette étape limitante. Cette étude a été effectuée avec plusieurs substrats donneurs impliquant diverses techniques de détection colorimétrique pour assurer le suivi des réactions catalysées. Une explication de ces techniques et les résultats de ces études se retrouvent au chapitre 4.

1.2.7.4 Étudier l'effet combiné du pH et de la température sur l'acylation de la GGT

Durant l'étape d'acylation de la GGT, un premier produit, protoné, est libéré. Un acide aminé du site actif doit donc normalement fournir un proton durant la libération de ce produit. De manière à pouvoir connaître la nature de cet acide aminé,

une courbe de van't Hoff, combinant les effets du pH et de la température, sera présentée au chapitre 5. Cette courbe permet de voir le déplacement de profils pH-vitesse en fonction de la température. Ce déplacement est caractéristique de l'énergie de dissociation d'un acide aminé. Les résultats pourront par la suite être combinés à ceux du chapitre 4 pour proposer un mécanisme plausible pour l'étape limitante au cours de la transpeptidation de la GGT. Ce mécanisme sera proposé au chapitre 6.

Chapitre 2

Synthèse de substrats analogues

2.1 Introduction

Plusieurs études ont été réalisées sur la GGT pour tenter de découvrir les acides aminés impliqués dans la reconnaissance d'un bon substrat donneur. Que ce soit par la mutagenèse dirigée ou par des modifications chimiques, différents résultats ont été obtenus. Cependant, dans le premier cas, l'enzyme peut subir un changement de conformation à la suite de la mutation, ce qui peut mener à une diminution de l'activité sans aucun lien avec l'acide aminé muté. Dans le deuxième cas, l'inhibiteur peut réagir de manière non-spécifique avec un acide aminé présent dans le site de liaison ou le site actif de l'enzyme, mais l'acide aminé ainsi marqué n'est peut-être pas vraiment important dans la catalyse effectuée par l'enzyme.

Selon les résultats précédemment obtenus, il semble y avoir un acide aspartique et une arginine dans le site de liaison du substrat donneur de l'enzyme, ce qui démontrerait l'importance d'avoir un groupement chargé positivement et un autre chargé négativement sur le substrat donneur (21). La mutation de l'acide aspartique par l'acide glutamique (possédant encore une charge négative, mais avec une unité méthylène de plus) a diminué grandement l'activité (29), ce qui indique que l'effet stérique à cet endroit est très important. Les mesures d'activité sont souvent réalisées en utilisant un substrat donneur dont le clivage libère un chromophore assez facile à suivre par spectrophotométrie. Ce substrat, le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, est représenté à la figure 4.

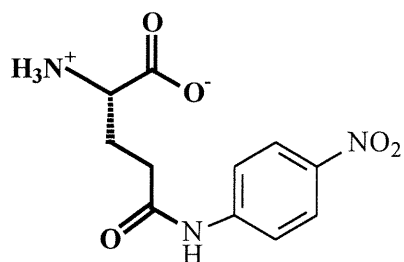


Figure 4 : Structure du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide. La partie en gras représente la portion γ -glutamyle.

Par le clivage du lien entre la portion γ -glutamyle et le groupement amine de l'aniline, il y a libération de la *p*-nitroaniline visible à 410 nm au spectrophotomètre. Ce substrat est plus utilisé que le glutathion, car ce dernier est plus difficile à manipuler dû à la présence de la cystéine dont l'état d'oxydation varie selon les conditions réactionnelles et il ne contient pas de chromophore facile à suivre au spectrophotomètre (26,3).

Pour confirmer les résultats précédemment obtenus par mutagenèse dirigée, certains chercheurs ont utilisé des substrats donneurs dont la portion γ -glutamyle est modifiée. De cette manière, la conformation de l'enzyme n'est pas modifiée et les différentes activités obtenues donnent des indications sur ce qui est nécessaire pour avoir un bon substrat donneur. Les substrats donneurs modifiés étaient de configuration D ou L, car la stéréochimie n'est pas très importante pour la reconnaissance du substrat donneur. Les substrats donneurs asparagine (un carbone de moins que le γ -glutamyle) et N-acétyl-glutamine (fonction amine bloquée par un groupement acétyle) ont été testés et ne sont pas reconnus du tout par la GGT (41). La présence d'un groupement méthyle en position α ne change pas beaucoup la liaison du substrat donneur pour la GGT, mais en position β , γ ou sur le groupement aminé, le substrat donneur n'est pas reconnu (42). L'adduit sur la fonction carboxylique en γ n'influence pas la liaison du substrat donneur, car il peut s'agir d'un fluorophore dérivé de la coumarine, d'un cycle aromatique ou tout simplement un

groupement NH_2 (3). Cependant, les études effectuées jusqu'à maintenant n'ont jamais montré l'importance même de la présence du groupement amine primaire ou du groupement acide carboxylique et si la reconnaissance est principalement de type électrostatique ou par ponts hydrogène.

Le but principal est donc de synthétiser des substrats analogues dont les caractéristiques structurales de la portion γ -glutamyle ont été modifiées. De plus, il serait intéressant de trouver un substrat donneur pouvant acyler très rapidement la GGT. Ceci permettrait une accumulation de l'intermédiaire γ -glutamyl-enzyme et l'utilisation de différents substrats accepteurs pour étudier l'étape de désacylation de l'enzyme. Pour y arriver, il est nécessaire de connaître toutes les composantes nécessaires à une bonne reconnaissance, par l'enzyme, du substrat donneur. De plus, il faut s'assurer que le lien clivé par l'enzyme soit suffisamment faible pour que la vitesse de la réaction soit rapide. Dans ce but, les synthèses proposées sont des modifications basées sur la structure du *L*- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide de la figure 4, mais avec un groupement *p*-nitrophénol ou amide primaire à la place d'un groupement *p*-nitroaniline. Ces deux types de groupements vont permettre de générer deux séries de tests cinétiques. Les molécules avec le groupement *p*-nitrophénol vont être utilisées comme substrats donneurs dans la réaction de transpeptidation. Celles avec un groupement amide primaire vont servir comme inhibiteurs compétitifs du *L*- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide dans la même réaction. Les tests cinétiques effectués pour suivre la catalyse de la GGT seront expliqués en détail au chapitre 3. Les molécules désirées sont représentées aux figures 5 et 6. Certaines sont commercialement disponibles, comme il est indiqué dans les figures.

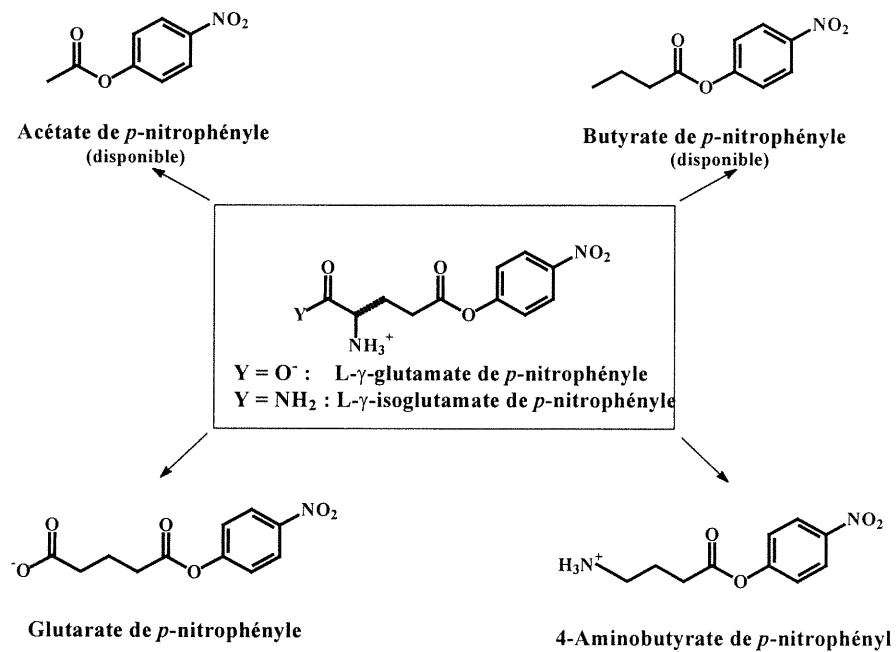


Figure 5 : Molécules désirées contenant une portion *p*-nitrophénolate.

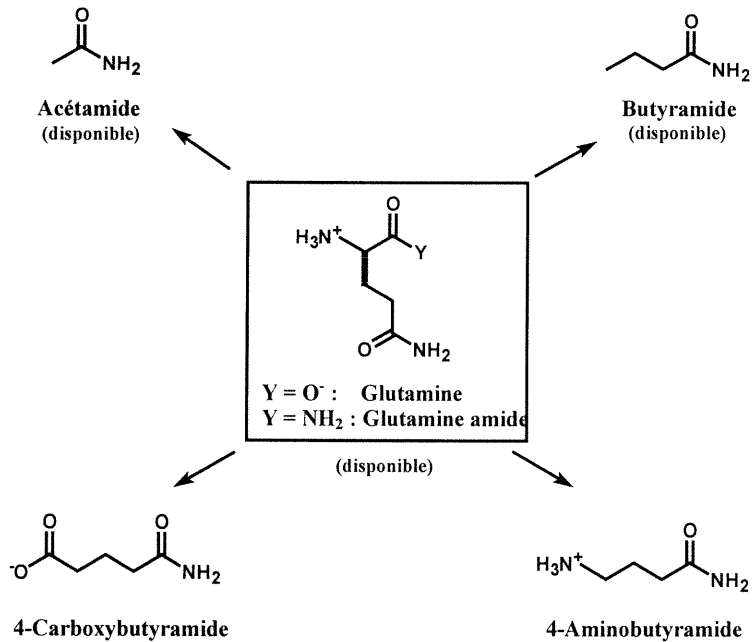


Figure 6 : Molécules désirées contenant une portion amide primaire.

2.2 Résultats

Les molécules non disponibles commercialement ont été synthétisées selon les schémas réactionnels indiqués aux figures 7, 8 et 9. Les protocoles expérimentaux sont donnés dans le chapitre 7.

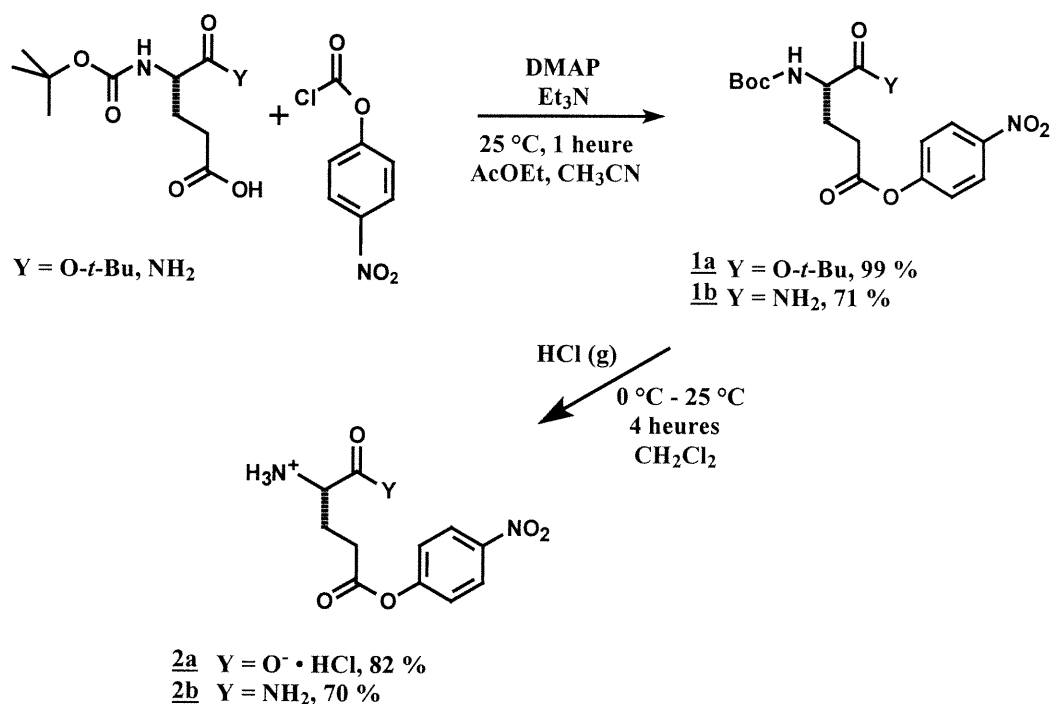


Figure 7 : Schéma réactionnel menant à la synthèse du L- γ -glutamate de *p*-nitrophényle **2a** et au L- γ -isoglutamate de *p*-nitrophényle **2b**

Un couplage se fait entre l'acide glutamique protégé avec un groupement *tert*-butoxycarbonyle (groupement protecteur Boc) sur la fonction amine primaire et avec un groupement *tert*-butyle sur la fonction carboxylique de la chaîne principale, et le *para*-nitrophényl chloroformate, de manière à former un lien *para*-nitrophényl ester activé (43). Cette réaction a été réalisée avec un bon rendement dans le cas de **1a** (99 %), mais un rendement un peu moindre pour **1b** qui a sa fonction acide carboxylique remplacée par une fonction amide primaire. Par la suite, la déprotection des groupements Boc et *tert*-butyl par du HCl gazeux donne des rendements appréciables de 82 % pour **2a** et de 70 % pour **2b**.

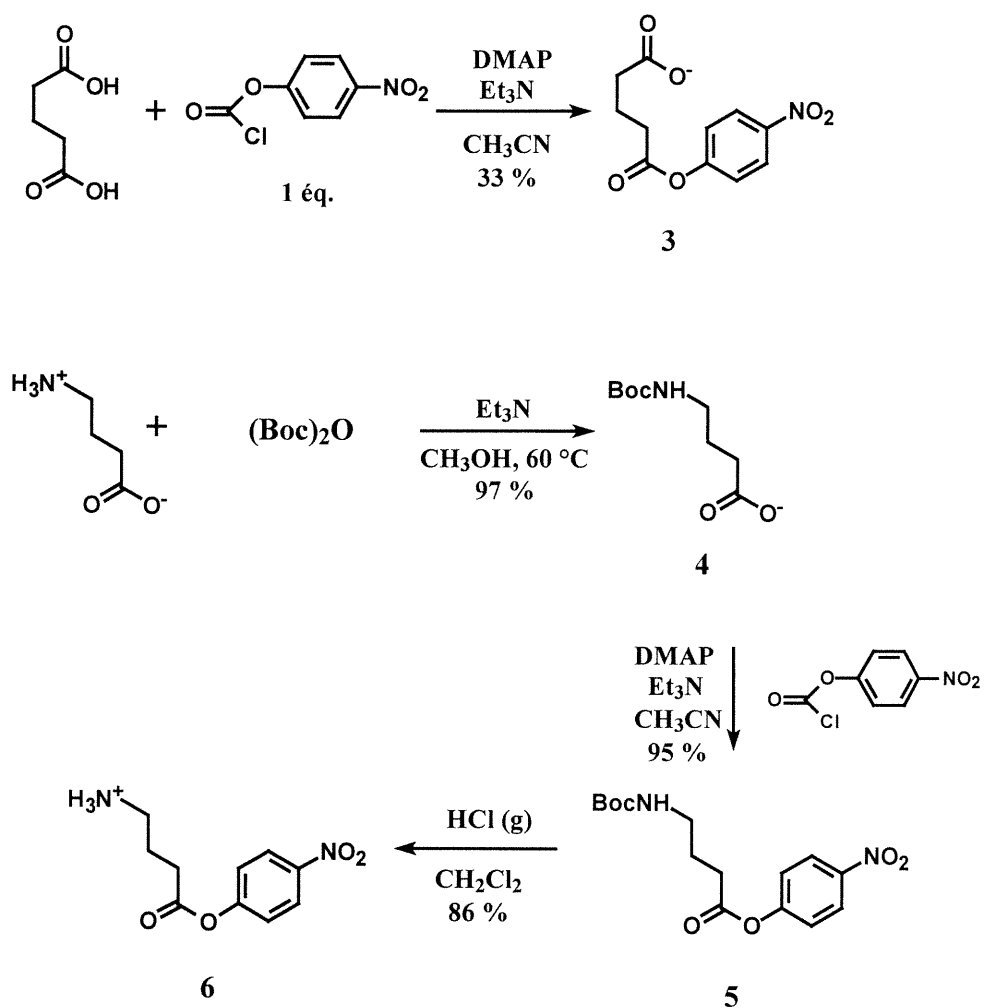


Figure 8 : Schéma réactionnel menant à la synthèse du glutarate de *p*-nitrophényle **3** et du 4-aminobutyrate de *p*-nitrophényle **6**.

Un couplage est fait, cette fois-ci, entre l'acide glutarique et le *para*-nitrophényl chloroformate pour donner le glutarate de *p*-nitrophényle **3** avec un faible rendement de 33 % qui sera expliqué dans la section Discussion.

Pour arriver à la synthèse du 4-aminobutyrate de *p*-nitrophényle **6**, l'acide 4-aminobutyrique est protégé par un groupement Boc sur la fonction amine primaire dans un rendement de 97 % pour donner **4**. Ensuite, le couplage de ce composé avec le *p*-nitrophényl chloroformate se fait dans un rendement de 95 % pour donner **5**.

Enfin, la déprotection du groupement protecteur Boc par du HCl gazeux donne la molécule désirée **6**.

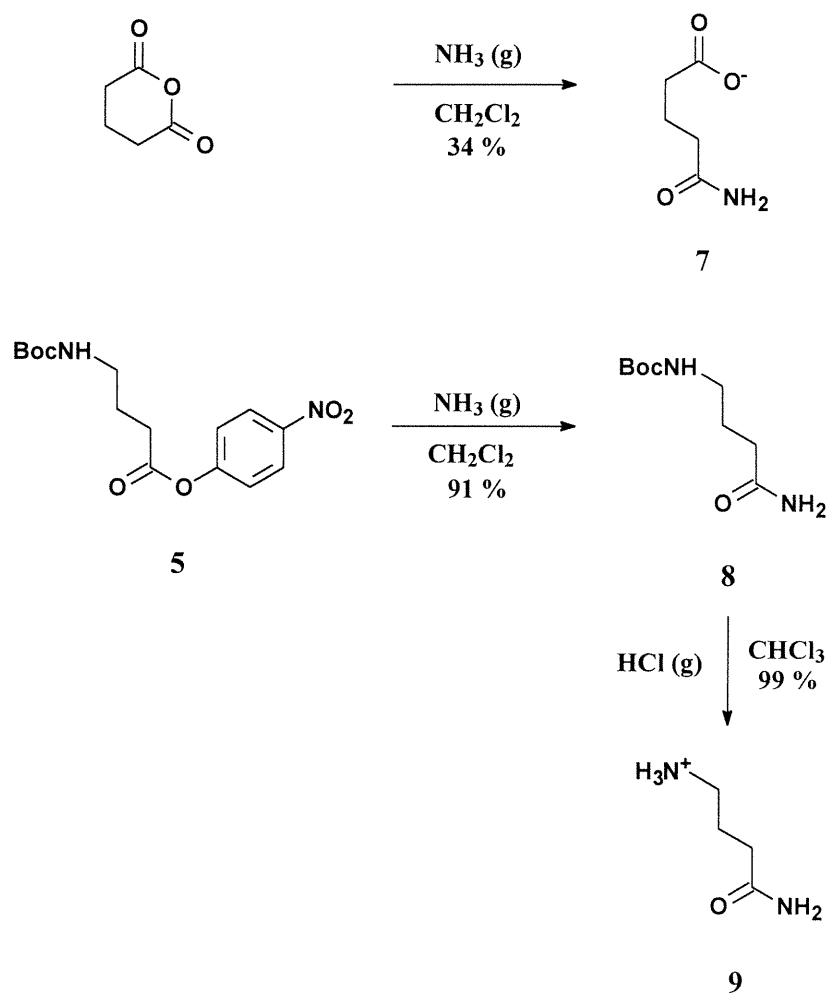


Figure 9 : Schéma réactionnel menant à la synthèse du 4-carboxybutyramide **7** et du 4-aminobutyramide **9**.

Les composés synthétisés dans le schéma réactionnel de la figure 9 sont une deuxième gamme de substrats à être testés avec la GGT. Ceux-ci vont agir comme "inhibiteurs" de la GGT. En effet, ils peuvent être reconnus par la GGT, mais ils ne possèdent aucun chromophore permettant de suivre aisément leur catalyse. Ils seront donc utilisés en présence d'un substrat donneur, le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide qui, après catalyse, libère un chromophore, la *p*-nitroaniline. Si l' "inhibiteur" se lie bien à l'enzyme, il y aura moins de catalyse du substrat donneur, donc moins de *p*-

nitroaniline libérée. Des schémas expliquant les tests cinétiques seront présentés au chapitre 3. Les composés de la figure 9 sont donc identiques à ceux de la figure 8, mais le lien *p*-nitrophényl ester activé est remplacé par un groupement amide primaire.

La synthèse du 4-carboxybutyramide **7** s'est réalisée grâce à l'ouverture de l'anhydride glutarique avec de l'ammoniac dans un rendement faible de 34 %.

Le 4-aminobutyramide **9** a été obtenu à partir de l'intermédiaire réactionnel **5** vu précédemment dans la figure 8. La molécule **5** a été mise avec de l'ammoniac gazeux pour donner le composé **8** avec un rendement de 91 %. Une déprotection du groupement protecteur Boc avec du HCl gazeux a été réalisée de manière quantitative pour donner le composé **9**.

2.3 Discussion

La synthèse s'est bien déroulée, car les rendements obtenus sont assez bons. De plus, ces réactions ont pu se faire à la température ambiante sans présence d'atmosphère inerte. Cependant, certaines réactions ont moins bien fonctionné et le rendement demeure faible. Le but de la synthèse était d'obtenir des substrats à tester avec la GGT, et non pas d'optimiser les réactions de manière à obtenir de bons rendements. Donc, il y aurait peut-être eu à quelques reprises d'autres chemins réactionnels envisageables, mais les quantités de substrats obtenues avec les schémas présentés plus haut ont été plus que suffisantes.

Le premier substrat à être synthétisé est le L- γ -glutamate de *p*-nitrophényle, car il est identique au L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, mais il contient un lien ester activé à la place d'un lien amide. Ainsi, la reconnaissance de l'enzyme pour le substrat devrait être plus ou moins la même et la réaction, être suffisamment rapide pour éviter une grande partie des réactions secondaires (cyclisation intramoléculaire, par exemple). Parallèlement, la synthèse du L- γ -isoglutamate de *p*-nitrophényle a été

effectuée pour voir l'importance de la charge sur le groupement acide carboxylique de la portion γ -glutamyle. Ces deux synthèses n'ont pas causé de problèmes au niveau du couplage avec le *p*-nitrophényl chloroformate pour former le lien ester activé. Cependant, les purifications devaient toujours être faites soigneusement pour éviter qu'un nucléophile ne vienne cliver ce lien. Ce problème a été très prononcé dans le cas de la purification des composés finaux **2a** et **2b**. En effet, ces substrats n'étaient pleinement solubles que dans l'eau, le N,N-diméthylformamide (DMF) et le diméthylsulfoxyde (DMSO). Des recristallisations ont été faites dans différents systèmes, mais il y avait toujours une perte importante de produit. Les rendements indiqués sont ceux avant recristallisation.

La synthèse du glutarate de *p*-nitrophényle **3** a été réalisée avec un faible rendement. En effet, les deux fonctions acide carboxylique de l'acide glutarique sont identiques, donc un des principaux produits secondaires a été le composé avec deux groupements *p*-nitrophényl ester. Cependant, il a été possible de les séparer par chromatographie "flash". Il aurait été possible de faire réagir le *p*-nitrophénolate en présence de l'anhydride glutarique pour obtenir le même composé avec de meilleurs rendements, mais les quantités obtenues avec la réaction indiquée ont été suffisantes pour faire les tests cinétiques présentés au chapitre 3.

La synthèse du 4-aminobutyrate de *p*-nitrophényle **6** s'est réalisée avec de bons rendements. Les mêmes problèmes (stabilité du lien ester activé, purification du composé final, etc) ont été rencontrés. Les réactions de protection-déprotection du groupement amine primaire se sont toujours bien déroulées.

La synthèse des composés contenant un lien amide primaire a été facilitée par l'absence du lien ester activé. Le composé 4-carboxybutyramide **7** a été fait dans un faible rendement, car l'ammoniac gazeux généré ne l'était pas de manière constante. Cependant, comme il a été expliqué plus tôt, la quantité de produit obtenue était suffisante pour faire les études cinétiques. Le 4-aminobutyramide **9** a été synthétisé

en faisant réagir le composé **5** avec de l'ammoniac. Cette fois-ci, un meilleur contrôle de l'ammoniac gazeux généré a été fait, ce qui explique le rendement plus élevé.

Tous les composés ont été caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C , ainsi que par spectrométrie de masse et point de fusion. Les détails expérimentaux se retrouvent au chapitre 7. Les composés se devaient d'être d'une très grande pureté, car il ne faut pas tirer de conclusions basées sur des études cinétiques erronées dues à une impureté. Les composés devant être testés dans des études cinétiques sont tous des solides, ce qui facilite les protocoles expérimentaux. Ceux-ci peuvent maintenant être utilisés dans des études cinétiques avec la GGT.

Chapitre 3

Tests cinétiques des molécules synthétisées

3.1 Introduction

Le chapitre 2 contient toutes les informations concernant la synthèse de molécules permettant de mieux connaître la nature des acides aminés impliqués dans le site de liaison du substrat donneur de la GGT. Le chapitre 3, quant à lui, rapporte les tests cinétiques effectués avec ces molécules. Les informations recueillies permettront de confirmer les résultats déjà obtenus par la mutagenèse dirigée, mais également de connaître les parties les plus importantes, pour la reconnaissance, dans la portion γ -glutamyle du substrat. Ainsi, il sera possible de tenter de synthétiser un substrat donneur acylant rapidement la GGT, de manière à pouvoir étudier l'étape de désacylation dans la réaction de transpeptidation.

La réaction de transpeptidation normalement catalysée par la GGT avec le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide est représentée à la figure 10.

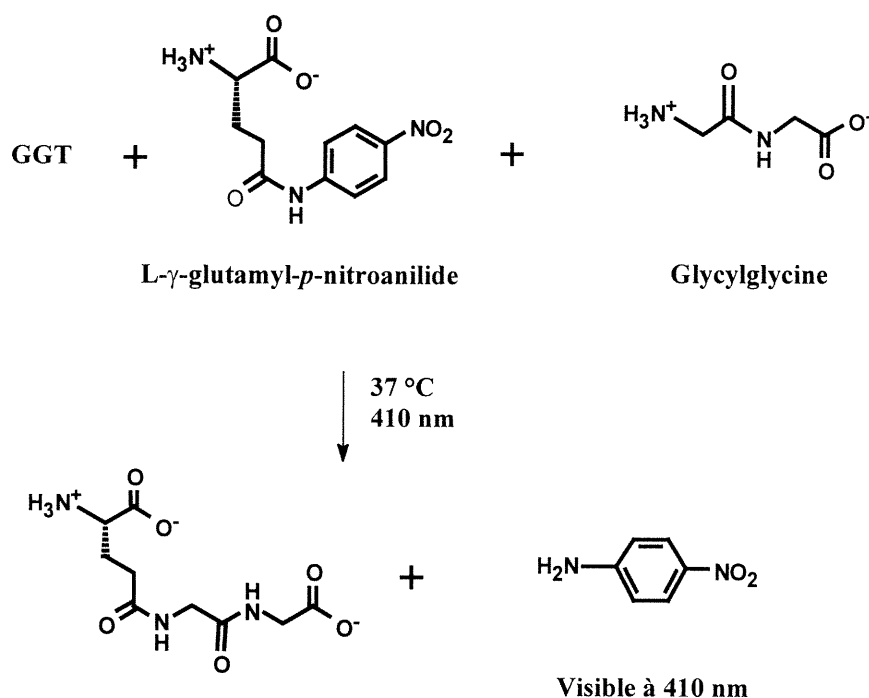


Figure 10 : Réaction de transpeptidation catalysée par la GGT.

La réaction représentée à la figure 10 est réalisée en présence de conditions saturantes de glycylglycine agissant comme substrat accepteur de la GGT pour rendre l'étape de désacylation très rapide. Ainsi, toutes les données cinétiques proviennent de l'étape d'acylation de la GGT. Il s'agit également de la réaction la plus couramment utilisée, dû à la grande facilité pour suivre la catalyse effectuée par l'enzyme (3).

Les substrats du chapitre 2 contenant une portion *p*-nitrophénolate devraient normalement être bien reconnus par la GGT, car la géométrie autour du lien clivé (lien amide dans le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide ou lien ester dans le L- γ -glutamate de *p*-nitrophényle) demeure à peu près la même. Ces substrats vont donc être utilisés à la place du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide comme substrat donneur dans la réaction représentée à la figure 10. De plus, en comparant les valeurs des paramètres cinétiques K_M et V_{max} (expliqués à l'annexe 1) obtenues pour chacun des substrats testés, il sera possible de connaître les parties essentielles à la bonne reconnaissance par l'enzyme.

Le lien ester étant particulièrement instable, des molécules contenant un lien amide primaire à la place du *p*-nitrophénolate ont été synthétisées au chapitre 2. Elles seront utilisées comme inhibiteurs dans la réaction indiquée à la figure 11.

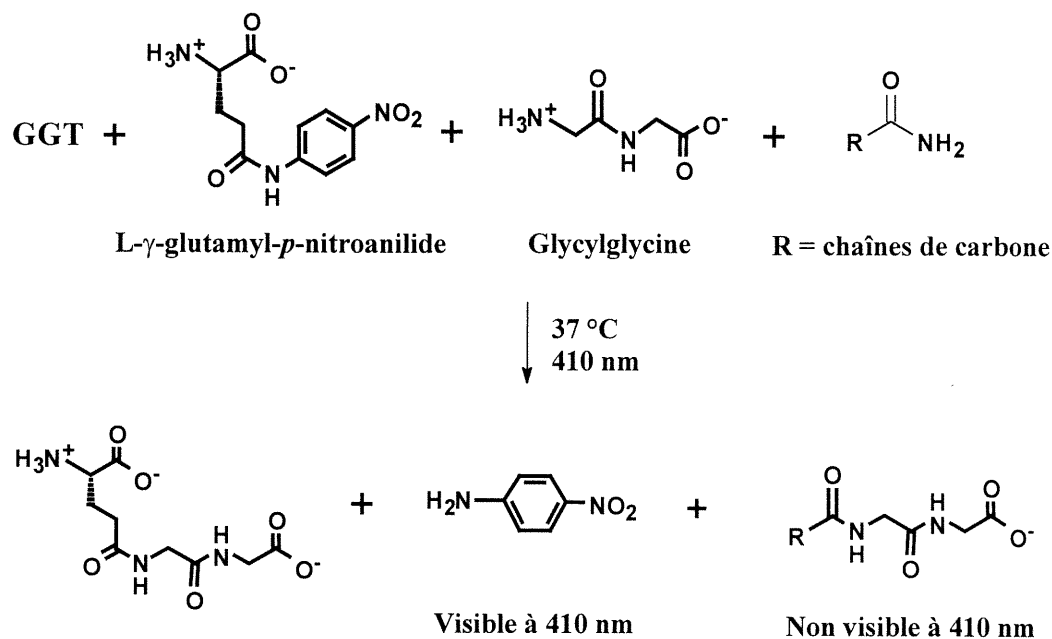


Figure 11 : Réaction de transpeptidation de la GGT en présence d'un inhibiteur.

La figure 11 montre la même réaction de transpeptidation indiquée à la figure 10, mais en présence d'un inhibiteur. Cet inhibiteur, s'il possède des éléments importants pour sa reconnaissance par l'enzyme, va pouvoir agir comme substrat donneur, mais ne formera pas un composé visible à 410 nm. En plus, il va empêcher le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide d'être lié par l'enzyme (s'il compétitionne pour le même site de liaison), donc la quantité de *p*-nitroaniline libérée sera plus faible, d'où son rôle comme "inhibiteur". Ainsi, la transpeptidation est étudiée en présence de concentrations croissantes de la molécule supposée inhibitrice. Les données cinétiques sont recueillies et servent à tracer des courbes de Lineweaver-Burk expliquées à l'annexe 1. Selon le type de courbe obtenue, il est possible de dire le type d'inhibition présent et de déterminer la valeur du K_i , constante d'inhibition donnant une indication de l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme. Alors, si la

molécule contenant un lien amide peut agir comme un bon inhibiteur, cela signifie qu'elle possède toutes les parties importantes à une bonne reconnaissance par l'enzyme. Plus le K_i sera élevé (moins bonne affinité), plus la modification effectuée au squelette du γ -glutamyle est importante.

Cependant, pour que ce système fonctionne, il faut s'assurer que l'absence du groupement aromatique sur la chaîne latérale du γ -glutamyle n'influence en rien la liaison de la molécule supposée inhibitrice à la GGT. Il est connu que la glutamine peut agir comme substrat donneur de la GGT (44,45). Ainsi, le test témoin important est d'utiliser la glutamine en compétition avec le substrat donneur. Ensuite, toutes les molécules contenant un lien amide primaire seront comparées avec la glutamine, de manière à voir l'importance de chaque portion du γ -glutamyle.

3.2 Résultats

Les tests ont été effectués en deux séries : les molécules synthétisées comme substrats donneurs et celles agissant comme inhibiteurs. Les protocoles expérimentaux se retrouvent au chapitre 7.

3.2.1 Molécules agissant comme substrats donneurs

Comme il est expliqué au chapitre 7, les molécules agissant comme substrats donneurs ont été testées avec la GGT. Le suivi de la réaction a été fait grâce au *p*-nitrophénolate libéré lors de la catalyse de ces molécules. La figure 12 est composée d'un graphique montrant la catalyse d'une concentration précise de l'acétate de *p*-nitrophényle par la GGT et d'un graphique contenant les mêmes composés, mais sans l'enzyme.

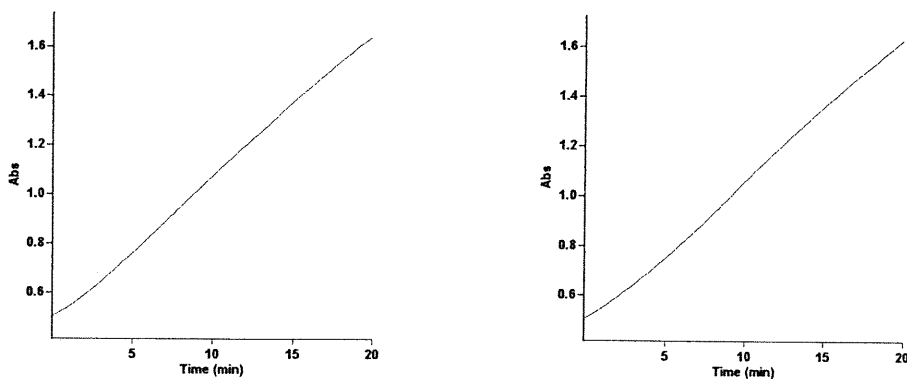


Figure 12 : Réaction de transpeptidation entre 0,051 U de GGT et 500 μ M du substrat donneur acétate de *p*-nitrophényle en présence de 20 mM de glycyglycine dans un tampon 0,1 M MOPS pH 7,0. Le premier graphique contient de la GGT, alors que le deuxième est le test témoin sans enzyme.

La figure 12 n'est qu'un graphique de l'absorbance en fonction du temps à une concentration précise du substrat donneur. Puisque les pentes des tests avec et sans enzyme sont identiques, le tableau I contient la mention "catalyse identique au test témoin". Ce résultat sera expliqué plus tard dans la section discussion.

La figure 13 représente un autre type de résultat ayant été obtenu avec les substrats donneurs (ici, le L- γ -glutamate de *p*-nitrophényle).

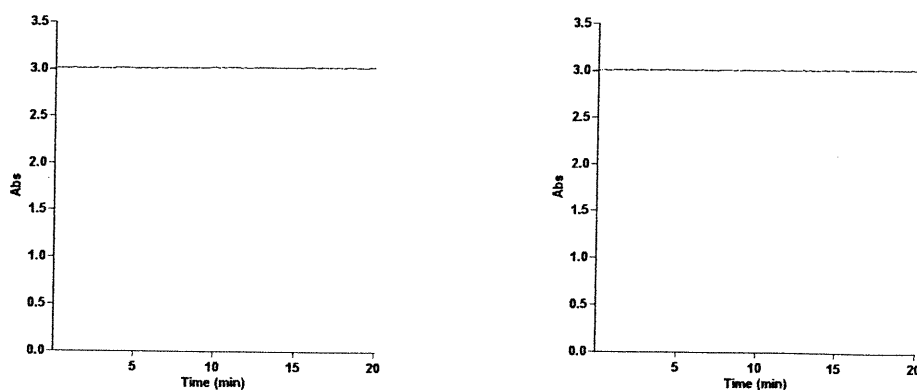


Figure 13 : Réaction de transpeptidation catalysée entre 0,051 U GGT et 500 μ M du substrat donneur L- γ -glutamate de *p*-nitrophényle en présence de 20 mM de glycyglycine dans un tampon 0,1 M MOPS pH 7,0. Le premier graphique représente le test en présence d'enzyme, alors que le deuxième n'en contient pas.

La figure 13 montre des pentes de valeur nulle, donc le tableau I indique la mention "Aucune catalyse détectable".

Le tableau I contient les résultats obtenus en testant différents composés de la figure 5 possédant un lien ester activé.

Tableau I Résultats cinétiques obtenus lors de l'utilisation des molécules contenant un lien ester activé comme substrats donneurs de la GGT en présence de 20 mM glycylglycine à pH 7,0

Molécules testées	Résultats cinétiques
Acétate de <i>p</i> -nitrophényle	Catalyse identique au test témoin
Butyrate de <i>p</i> -nitrophényle	Catalyse identique au test témoin
Glutarate de <i>p</i> -nitrophényle	Catalyse identique au test témoin
4-Aminobutyrate de <i>p</i> -nitrophényle	Aucune catalyse détectable
L- γ -glutamate de <i>p</i> -nitrophényle	Aucune catalyse détectable
L- γ -isoglutamate de <i>p</i> -nitrophényle	Aucune catalyse détectable

Dans le cas des trois premières molécules indiquées dans le tableau I, il n'y a aucune distinction entre le test témoin et le test en présence de GGT. Ce résultat peut être dû à une réaction d'hydrolyse chimique trop importante par rapport à la réaction enzymatique. Pour régler ce problème, il est possible d'ajouter de plus grandes quantités d'enzyme. Cependant, pour les molécules testées ici, différentes concentrations d'enzyme ont été testées sans montrer de différences significatives. De plus, il peut arriver que la concentration choisie du substrat donneur ne soit pas suffisamment élevée. Alors, l'enzyme ne peut pas reconnaître de trop faibles quantités. Toutefois, malgré l'utilisation de concentrations beaucoup plus élevées du substrat donneur, le résultat indiqué au tableau I a toujours été obtenu. Le choix du substrat accepteur est important, car il pourrait cliver le lien ester activé trop rapidement. La glycine éthyl ester a donc été utilisée comme substrat accepteur.

Malgré des vitesses de réaction un peu plus faibles, il n'y avait aucune différence entre les pentes du test témoin et du test contenant la GGT.

Les trois dernières molécules du tableau I ne montrent pas de différence entre le test témoin et le test en présence de la GGT. De plus, la pente obtenue est nulle. Cette dernière observation indique qu'il n'y a eu aucune hydrolyse ou une hydrolyse déjà complétée dès le départ. Dans le cas de la première hypothèse, l'ajout de NaOH aurait dû hydrolyser une grande quantité du lien ester activé non clivé. Cependant, lorsque ceci a été fait, aucune variation d'absorbance n'a été observée. De plus, les absorbances sont, dès le départ, très élevées et correspondent, en utilisant le coefficient d'extinction molaire du *p*-nitrophénol, à une hydrolyse complète du composé de départ. La deuxième hypothèse peut être vérifiée en utilisant de plus faibles concentrations du substrat donneur, de manière à voir une pente dans les premières minutes de la réaction. Cependant, en variant la concentration des substrats donneurs, une pente nulle a toujours été obtenue. Habituellement, la réaction est débutée par l'ajout d'enzyme. De manière à éviter une hydrolyse du substrat donneur laissé dans la cuvette avant l'ajout de la GGT, la réaction a été débutée par l'ajout du substrat donneur. Cela n'a rien changé aux données cinétiques obtenues. De plus, une importante couleur jaune (couleur du *p*-nitrophénolate) est instantanément obtenue lorsque ces trois dernières molécules du tableau I sont placées dans le milieu aqueux de la cuvette.

Puisqu'il semble y avoir une réaction d'hydrolyse importante des trois substrats donneurs dans l'eau, des tests utilisant la RMN ont été faits pour déterminer ce qui se passe dans le milieu réactionnel. Comme il est expliqué au chapitre 7, des cinétiques grossières ont été faites en plaçant le 4-aminobutyrate de *p*-nitrophényle dans du D₂O et en prenant un spectre RMN ¹H à différents temps. La libération du *p*-nitrophénolate a pu être constatée, ainsi que la formation du 2-pyrrolidinone, composé cyclique correspondant au 4-aminobutyrate. Le même type d'étude, sans être aussi exhaustif, a été réalisé pour le glutarate de *p*-nitrophényle, le L- γ -glutamate de *p*-nitrophényle et le L- γ -isoglutamate de *p*-nitrophényle. Pour ces deux derniers, il

semble y avoir formation du pyroglutamate (produit cyclisé avec la fonction amine primaire) correspondant. Cette cyclisation est vue dès le premier spectre dans le D_2O . Cependant, la cyclisation complète est observée après différents temps, selon les composés, avec une moyenne d'environ sept heures. Ainsi, comme il est expliqué au chapitre 7, les spectres RMN ont été pris dans le méthanol deutéré pour diminuer cette cyclisation possible dès le départ lorsque le composé est mis en contact avec l'eau.

Les données cinétiques obtenues avec les substrats donneurs contenant un lien ester activé ne permettent pas vraiment de dire s'il y a reconnaissance ou non de la part de l'enzyme. La stabilité des molécules semble être mise en cause, mais une analyse plus approfondie sera faite dans la prochaine section de ce chapitre. Il faudrait, pour y arriver, rigidifier la chaîne carbonée (par la présence, par exemple, d'une double liaison), mais ceci constitue le projet de recherche d'autres étudiants dans le groupe de recherche du Prof. J.W. Keillor. Pour obtenir l'information désirée concernant les éléments nécessaires à une bonne reconnaissance du substrat donneur, le test d'inhibition présenté à la figure 11 a été effectué avec les molécules contenant un lien amide primaire.

3.2.2 Molécules contenant un lien amide primaire

Une cinétique de type Michaelis-Menten (annexe 1) a été réalisée en absence d'inhibiteur pour déterminer les valeurs de K_M et V_{max} pour la transpeptidation du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide. Par la suite, la même expérience a été effectuée avec une concentration constante de la molécule supposée inhibitrice. Différents tests cinétiques faits avec différentes concentrations d'inhibiteurs permettent d'obtenir plusieurs valeurs de K_M et V_{max} à comparer avec celles en absence de l'inhibiteur. La figure 14 représente un graphique Lineweaver-Burk obtenu au cours de la transpeptidation du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de la molécule 4-carboxybutyramide.

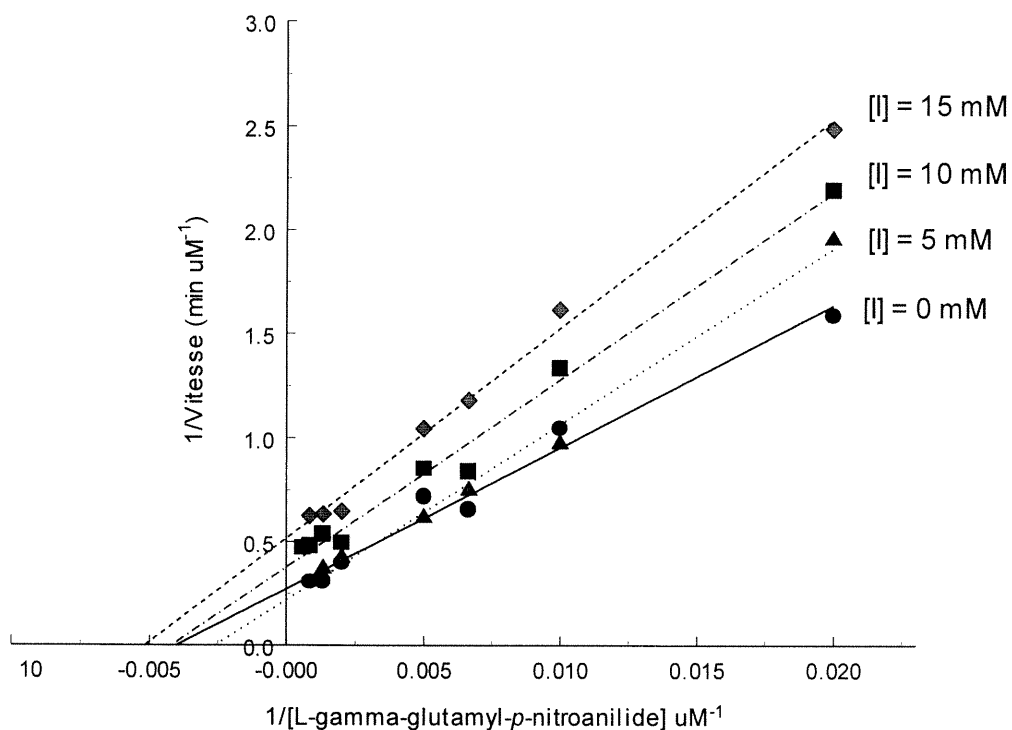


Figure 14 : Courbe Lineweaver-Burk pour la transpeptidation par 0,0034 U GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de 20 mM glycyglycine et de concentrations constantes de l'inhibiteur (I) 4-carboxybutyramide dans 0,1 M MOPS pH 7,0.

Les droites (sauf celle à une concentration d'inhibiteur de 0 mM) convergent, plus loin, vers un point précis, ce qui permet de penser à une inhibition de type non-compétitive mixte (annexe 1). Le K_i , constante d'inhibition pour l'inhibiteur, a été calculé grâce à une courbe de Dixon représentée à la figure 15.

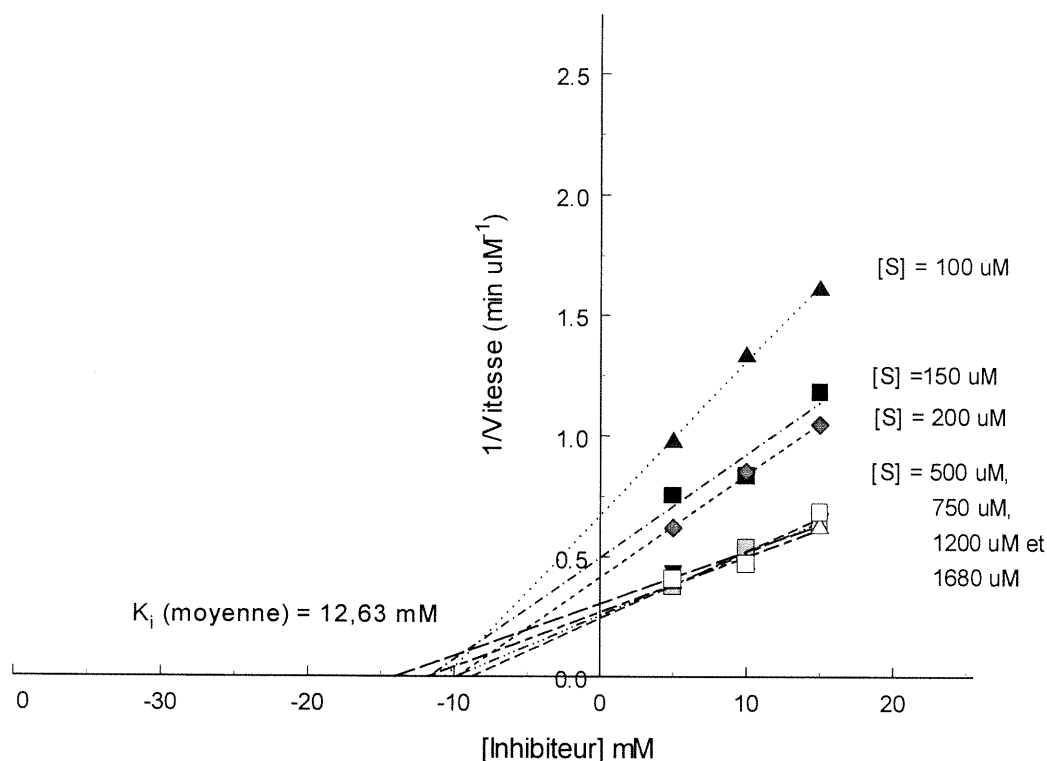


Figure 15 : Courbe de Dixon pour la transpeptidation de différentes concentrations du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide (S) par la GGT en présence de différentes concentrations de l'inhibiteur 4-carboxybutyramide dans 0,1 M MOPS pH 7,0.

Cette courbe confirme la présence d'une inhibition de type non-compétitive mixte. Dans le cas montré à la figure 15, les droites des quatre dernières concentrations semblent se croiser avant l'axe Y, et non pas au même endroit que les trois premières concentrations. Il faut dire que les valeurs des vitesses pour ces concentrations sont très similaires, si les erreurs expérimentales d'environ 5 % (dus aux manipulations et au fait que la réciproque des résultats est utilisée ici) sont considérées. Donc, ces quatre concentrations pourraient être considérées comme une seule droite. De plus, toutes les valeurs d'abscisse à l'origine de ces quatre droites sont concordantes avec celles des trois plus faibles concentrations. Cette situation est spécifique à cet exemple et ne se retrouve pas de la même manière pour les autres composés testés. Dans la littérature, des valeurs de K_i sont souvent déterminées avec beaucoup moins de concentrations de substrats. La valeur du K_i a été déterminée sur le graphique,

mais également par calcul, comme il est expliqué à l'annexe 1. Les différentes valeurs de la constante d'inhibition pour les molécules supposées inhibitrices testées ont été regroupées dans le tableau II.

Tableau II Valeurs de la constante d'inhibition K_i et type d'inhibition pour les molécules testées contenant un lien amide primaire

Molécules testées	Valeur de K_i (mM)	Type d'inhibition
Acétamide	N/o	---
Butyramide	N/o	---
4-Carboxybutyramide	12,63	Non-compétitif mixte
4-Aminobutyramide	23,20	Incompétitif
Glutamine	3,44	Compétitif
Glutamine amide	14,62	Compétitif
N-Acétyl-glutamine	183*	Compétitif

N/o : Aucune inhibition observée.

* Valeur extrapolée, car impossibilité de faire des tests cinétiques dont les concentrations d'inhibiteurs étaient du même ordre de grandeur que le K_i .

Les erreurs sur les valeurs de K_i sont d'environ 10 % et proviennent de la différence des abscisses à l'origine des différentes concentrations sur la courbe de Dixon, ou de l'erreur attribuable à la droite tracée par l'ordinateur sur les courbes secondaires des courbes Lineweaver-Burk. Les types d'inhibition ont été déterminés en fonction de l'allure des courbes d'inhibition de Lineweaver-Burk et de Dixon.

La N-acétyl-glutamine a été testée pour voir l'importance du groupement amine primaire libre et pour confirmer des résultats déjà obtenus par d'autres chercheurs (41).

3.3 Discussion

Les tests cinétiques ont été effectués à pH 7,0. En effet, sachant que la fonction amine primaire libre du substrat donneur pouvait faire de l'hydrolyse chimique (notamment pour un lien ester fortement activé), le pH a été choisi pour avoir la plus grande quantité des molécules sous la forme protonée à cet endroit sans trop diminuer la catalyse effectuée par l'enzyme. Cependant, avec les résultats obtenus, il semble que cette précaution n'ait pas été suffisante. De plus, les substrats donneurs avec le lien ester activé ont été solubilisés dans des solvants organiques, de manière à diminuer une catalyse pouvant être effectuée par des molécules d'eau.

Certains composés contenant un lien ester activé n'ont tout simplement pas été reconnus par la GGT. En effet, malgré le fait que l'acétate de *p*-nitrophényle est reconnu par la majorité des protéases (dont fait partie la GGT), il a été surprenant de voir une absence complète de reconnaissance de la part de la GGT. En cela, les résultats d'autres chercheurs ont été confirmés (46). Selon les données cinétiques obtenues, il y a effectivement une réaction, car la pente est non-nulle. Cependant, la valeur est la même, avec ou sans la GGT. Cela indique que la portion acétyle du substrat donneur n'est pas suffisante pour assurer la reconnaissance par l'enzyme. Ceci a été confirmé par le test d'inhibition en présence d'acétamide. En effet, il n'y a aucune inhibition, par rapport à la glutamine qui inhibe bien la GGT. Donc, la GGT semble avoir une très haute spécificité pour le substrat donneur. La réaction observée est assez lente et doit être due au clivage du lien ester activé par le substrat accepteur glycylglycine (ou glycine éthyl ester, contenant également un groupement amine primaire) ou par des molécules d'eau.

Parfois, une enzyme contient une poche hydrophobe qui doit être comblée par un substrat. L'acétate de *p*-nitrophényle a donc été remplacé par le butyrate de *p*-nitrophényle, molécule contenant le même nombre d'atomes de carbone que la portion γ -glutamyle. Malgré cette modification, aucune reconnaissance n'a été effectuée par la GGT, ce qui a été confirmé par l'absence d'inhibition du butyramide.

Il semble donc que les groupements amine primaire et acide carboxylique soient très importants pour la reconnaissance par l'enzyme.

Par la suite, le glutarate de *p*-nitrophényle a été testé. Cette molécule n'a pas été reconnue par l'enzyme, car il n'y avait qu'une réaction d'ordre chimique effectuée, encore, probablement par la glycyglycine et des molécules d'eau. Il y a eu inhibition par le 4-carboxybutyramide, car une valeur de K_i a pu être déterminée. Cependant, il est impossible de comparer cette valeur à celle de la glutamine (12,63 mM versus 3,44 mM), car il ne s'agit pas du même type d'inhibition. Il est tout de même possible de dire qu'il s'agit du même ordre de grandeur. L'inhibition de type non-compétitif mixte ou incompétitif est souvent vue lorsqu'une enzyme lie deux substrats (45). Le deuxième substrat peut se lier avant le premier et bloquer la liaison de ce dernier. En regardant bien la structure du 4-carboxybutyramide, une certaine ressemblance avec la glycyglycine est remarquée. Il y a des groupements carbonyles plus ou moins au même endroit que dans la glycyglycine et la conformation est presque la même. Donc, il est fort possible que le 4-carboxybutyramide puisse se lier au site de liaison du substrat accepteur. Le fait qu'il s'agisse d'une inhibition non-compétitive indique que le composé est également capable de se lier au site de liaison du substrat donneur.

Le 4-aminobutyrate de *p*-nitrophényle s'est probablement clivé trop rapidement. Malgré le fait que le groupement amine primaire soit probablement protoné à pH 7,0, il est possible qu'il y ait un échange de protons avec des molécules d'eau. Ainsi, une lente hydrolyse du lien ester activé et la formation du composé cyclique 2-pyrrolidinone (cycle à cinq atomes ... hautement stable!) ont été vues par RMN ^1H . Dans les véritables tests cinétiques en présence d'enzyme, il est possible que le substrat accepteur glycyglycine puisse également, de par son pK_a élevé, échanger un proton avec le groupement amine primaire du 4-aminobutyrate de *p*-nitrophényle, favorisant ainsi une cyclisation intramoléculaire.

Le composé 4-aminobutyramide a agi comme inhibiteur incompétitif pour la GGT. La valeur de K_i ne peut pas, encore une fois, être comparée à celle de la

glutamine. Cependant, il semble que ce composé ressemble suffisamment au substrat accepteur glycylglycine pour se lier plutôt à ce site de liaison.

Les composés 4-carboxybutyramide et 4-aminobutyramide, en se liant au site de liaison du substrat accepteur, montrent la nécessité d'avoir les deux groupements, amine primaire et acide carboxylique, pour s'assurer de la bonne reconnaissance au site de liaison du substrat donneur.

Le L- γ -glutamate de *p*-nitrophényle a agi de la même manière que le 4-aminobutyrate de *p*-nitrophényle. La fonction amine primaire étant commune aux deux molécules, il semble que le problème soit rattaché à cette fonction. Les études par RMN ^1H ont montré une cyclisation par la fonction amine (donnant un composé pyroglutamate), et non pas par la fonction acide carboxylique pour former un cycle à six atomes très stable aussi. La glutamine a agi comme inhibiteur compétitif du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide. Cela confirme que l'absence de cycle aromatique n'influence pas la liaison d'un substrat donneur à l'enzyme. La glutamine contient donc tous les éléments nécessaires pour bien se lier. Il s'agit donc vraiment de la référence à utiliser dans cette étude. De plus, c'est le composé qui possède la meilleure affinité avec la GGT.

Le L- γ -isoglutamate de *p*-nitrophényle n'a pas pu être étudié, car il était également trop instable avec sa fonction amine primaire. La substitution du groupement acide carboxylique par une fonction amide primaire n'a rien changé au problème. La fonction acide carboxylique n'est donc pas impliquée dans le bris du lien ester activé ou il ne s'agit pas du mécanisme principal de clivage. La glutamine amide a agi comme inhibiteur compétitif de la GGT. Cela indique que toutes les caractéristiques sont présentes pour une bonne reconnaissance par la GGT. Cependant, le K_i est plus élevé, donc la charge négative de la fonction acide carboxylique est très importante. À ce niveau, il y a probablement une reconnaissance des charges complémentaires, car un amide n'aurait pas pu jouer le

même rôle qu'un acide carboxylique. Il y a donc probablement un acide aminé chargé dans la GGT pour assurer une bonne reconnaissance du substrat donneur.

Donc, il semble que la présence d'un substrat accepteur comme la glycyglycine soit néfaste pour la stabilité du substrat donneur. Toutefois, si ces substrats doivent être utilisés dans l'étude de l'étape de désacylation, il devra toujours y avoir un substrat accepteur. De plus, les accepteurs reconnus par la GGT sont majoritairement des acides aminés dont la fonction amine primaire est libre. Donc, ce type de substrat contenant un lien ester activé ne pourra pas être utilisé pour l'étude de l'étape de désacylation. Ils pourraient être utilisés pour l'étude de la réaction d'hydrolyse. Cependant, les molécules d'eau pourraient tout de même aider les substrats donneurs à se cycliser.

D'un autre point de vue, il serait peut-être possible de bloquer la fonction amine primaire sur le substrat donneur pour éviter cette cyclisation. Cependant, comme il est indiqué avec le test d'inhibition en présence de la N-acétyl-glutamine, la fonction amine doit être libre. L'effet du groupement protecteur acétyle peut être dû à l'encombrement stérique ou à l'absence d'une charge positive. Certains chercheurs avaient utilisé la N-méthyl-glutamine comme substrat donneur, mais cette molécule n'avait pas été reconnue (42). De plus, la substitution d'un acide aspartique par un acide glutamique possiblement dans le site de liaison de la GGT a grandement diminué l'activité enzymatique (29). Il semble donc que la présence de la charge positive sur le groupement amine primaire ne soit pas suffisante. Il s'agit plutôt d'un problème d'encombrement stérique. Il est donc impossible de « bloquer » le groupement amine primaire pour éviter toute cyclisation.

Cette stratégie de synthèse est donc inutilisable pour étudier l'étape de désacylation de la GGT. En effet, l'enzyme doit cliver un lien rapidement pour créer une accumulation de l'intermédiaire acyl-enzyme. Ce lien est cependant trop faible et est clivé par d'autres nucléophiles présents dans le milieu réactionnel ou par cyclisation du substrat donneur. Très peu de modifications peuvent être effectuées

sur la portion γ -glutamyle sans risquer de perdre beaucoup de reconnaissance de la part de l'enzyme. La synthèse d'un autre substrat donneur (ou d'un inhibiteur) pour la GGT devra contenir les groupements amine primaire et acide carboxylique et une chaîne latérale composée de quatre carbones.

Le site de liaison de la GGT semble donc être très bien adapté à la présence d'une portion γ -glutamyle. La nécessité d'avoir un groupement amine primaire libre (donc chargé positivement) démontre la présence probable d'un acide aminé chargé négativement dans le site de liaison de l'enzyme. Le groupement acide carboxylique du substrat donneur est probablement lié par des interactions électrostatiques et par des ponts hydrogènes à un acide aminé chargé positivement dans la GGT. Le nucléophile est ainsi bien positionné pour attaquer la fonction carbonyle du substrat donneur afin de libérer le premier produit. Puisque le mécanisme de l'étape de désacylation ne peut pas être étudié avec la méthodologie proposée, les recherches se sont dirigées vers l'étude de l'étape d'acylation.

Chapitre 4

Études de l'état de transition de la réaction limitante dans l'étape d'acylation

4.1 Introduction

La réaction de transpeptidation semble, selon certains auteurs, être la réaction la plus importante *in vivo* (24). Des étudiants dans le groupe de recherche du Professeur J.W. Keillor ont donc débuté des études pour déterminer la véritable étape limitante dans le processus de la transpeptidation. En effet, en utilisant des conditions saturantes du substrat accepteur, l'étape d'acylation devient limitante. Cependant, il est possible, malgré ces conditions, que l'étape de désacylation soit limitante. Par exemple, la réaction chimique, et non pas enzymatique, dans le site actif de l'enzyme au cours de la désacylation peut contrôler la vitesse de la réaction. Pour y parvenir, il faut varier la force du lien clivé par l'enzyme au cours de l'étape d'acylation et ainsi connaître l'étape limitante. Une série de substrats donneurs, analogues au L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, a donc été synthétisée dans le laboratoire. Leur structure se retrouve à la figure 16 (47).

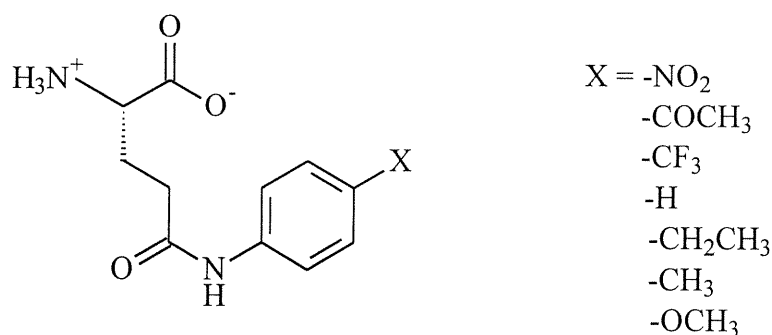


Figure 16 : Structure des composés L- γ -glutamylanilides *p*-substitués avec différents groupements électrodonneurs et électroattracteurs.

Ces composés ont servi de substrat donneur à la GGT en présence de conditions saturantes du substrat accepteur glycylglycine. La présence de différents groupements électrodonneurs et électroattracteurs à la position *para* du cycle aromatique rend le lien amide clivé par l'enzyme plus ou moins faible. Ainsi, il est possible de comparer les vitesses de clivage de ce lien en fonction du pK_a du groupement aromatique libéré durant la réaction et voir s'il existe une corrélation entre les données.

Cependant, contrairement à la *p*-nitroaniline, les anilines *p*-substituées avec d'autres groupements électroattracteurs ou électrodonneurs ne sont pas vraiment colorées. Donc, le suivi par spectrophotométrie est impossible. Une technique de diazotation est utilisée pour former un complexe coloré avec l'aniline libérée. Cette technique, mise au point dans le laboratoire par d'autres étudiants, est représentée à la figure 17 (48). Selon la nature du substituant de l'aniline, le temps et la température du développement de la couleur après l'ajout du N-(1-naphtyl)éthylènediamine et la longueur d'onde à laquelle le complexe coloré est observé varient.

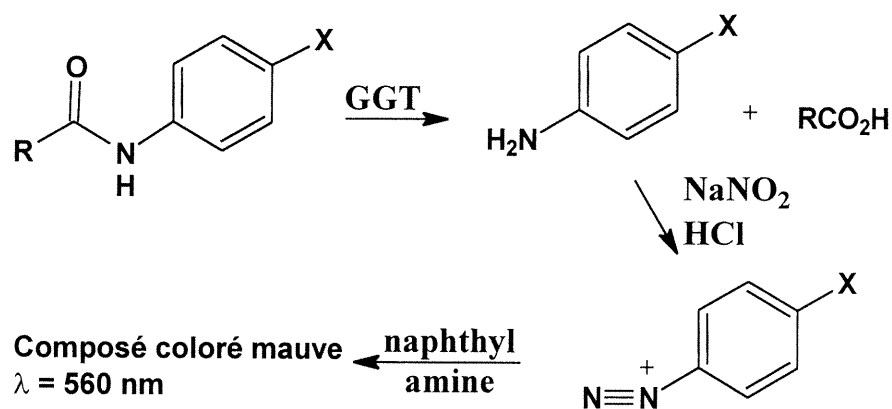


Figure 17 : Méthode de révélation d'anilines, libérées par la GGT, par la technique de diazotation. Le nom complet de la naphthyl amine est le N-(1-naphtyl)éthylènediamine•2HCl.

Après avoir obtenu des données de vitesse maximale pour chacun des substrats donneurs *p*-substitués testés, un graphique de Hammett peut être tracé. Les résultats obtenus dans le laboratoire sont indiqués à la figure 18 (47).

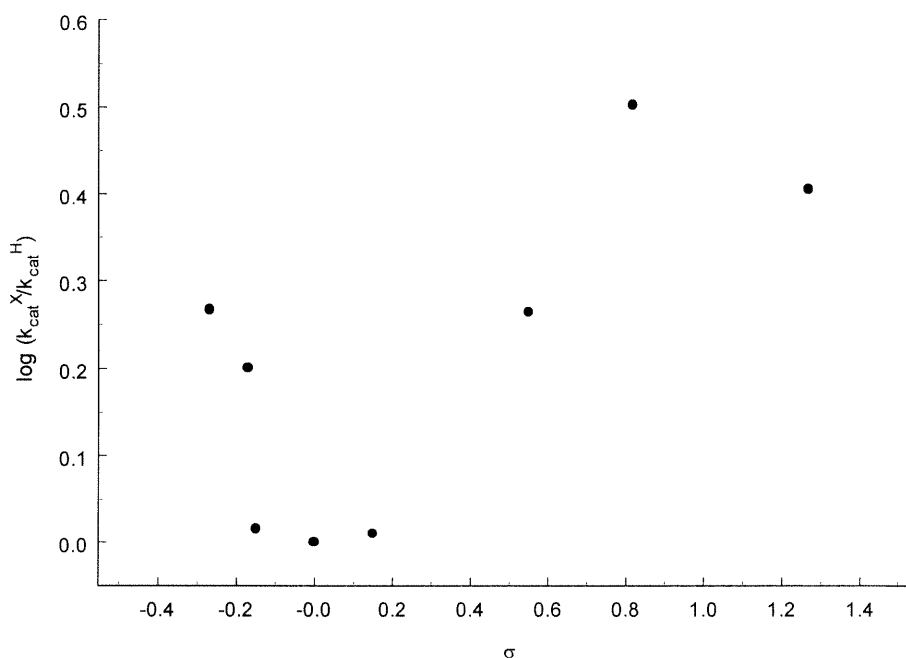


Figure 18 : Courbe de Hammett pour la transpeptidation des substrats donneurs L- γ -glutamylanilides *p*-substitués dans des conditions saturantes du substrat accepteur glycylglycine. σ représente le paramètre de Hammett. Un ratio de la constante de vitesse d'un anilide *p*-substitué X sur la constante de vitesse de l'anilide (avec l'hydrogène comme substituant) est placé en ordonnée.

Le paramètre σ est calculé selon l'équation suivante $\text{p}K_a(\text{X}) = \text{p}K_a(\text{H}) - \sigma$ (49). La figure 18 montre une courbe dont le centre est le substituant -H. L'erreur expérimentale est d'environ 10 % et a été déterminée grâce à des expériences faites au moins en duplicata pour chacun des points. S'il s'agit d'une véritable courbure, il y a un changement de mécanisme selon la nature du substituant ou un changement de géométrie de l'état de transition de la réaction limitante. S'il n'y a aucune corrélation entre les points, il n'y a donc aucune pente. Dans ce dernier cas, cela signifie que la

force du lien n'a aucun effet dans l'étape limitante de la réaction et que l'étape de désacylation chimique de l'enzyme est probablement limitante.

Il y a vraisemblablement une courbe à la figure 18 et plusieurs composés ont été utilisés pour la définir. De plus, les composés avec le substituant méthoxy ou nitro ou sans substituant (-H) ont été testés avec de l'enzyme provenant de deux différentes purifications, mais les mêmes résultats ont été obtenus en considérant l'erreur expérimentale de 10 % présente sur chaque point. Le bris du lien amide se fait probablement selon le même mécanisme, quelle que soit la nature du substituant. La courbure serait probablement due à un changement de géométrie de l'état de transition. L'usage de substrats donneurs avec différents substituants ne devrait pas faire beaucoup varier la valeur de l'entropie d'activation (ΔS^\ddagger), car le désordre dû à la différence de substituants ne devrait pas varier d'un substrat donneur à l'autre. Par contre, l'enthalpie d'activation ΔH^\ddagger devrait varier, car il s'agit d'un paramètre très sensible aux effets électroniques, ce qui est le cas ici.

Les paramètres d'enthalpie et d'entropie d'activation peuvent être trouvés pour une réaction enzymatique en faisant une courbe de Eyring (50,51). Eyring prétend que les réactifs d'une réaction franchissent un état de transition en forme de complexe activé. La courbe tracée selon l'équation indiquée à l'annexe 1 permet de déterminer l'enthalpie et l'entropie d'activation. De plus, l'entropie d'activation peut donner des informations intéressantes quant à la molécularité d'une réaction. En effet, si l'étape limitante d'une réaction implique une seule molécule, le ΔS^\ddagger est habituellement positif. Dans le cas où plusieurs molécules doivent interagir ensemble, le niveau d'ordre nécessaire pour créer ou briser de nouveaux liens est plus élevé et la valeur est habituellement négative.

Des courbes de Eyring sont obtenues en faisant un test d'activité enzymatique normal de la GGT, mais en faisant varier la température, pour le substrat donneur L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide. Cependant, dans le cas du L- γ -glutamyl-*p*-méthoxyanilide et du L- γ -glutamylanilide, le suivi de la réaction ne peut pas être effectué directement

au spectrophotomètre, car l'aniline libérée au cours de la réaction n'est pas vraiment colorée. Il faut donc utiliser la technique décrite à la figure 17.

En utilisant cette méthode avec les composés L- γ -glutamylanilides substitués avec un groupement méthoxy ou un hydrogène, il sera possible de connaître la vitesse de libération de l'aniline et de tracer des courbes de Eyring. Les informations obtenues seront très utiles pour caractériser l'état de transition de l'étape limitante au cours de la transpeptidation.

4.2 Résultats

Les courbes de Eyring ont été obtenues pour les substrats donneurs L- γ -glutamylanilides substitués à la position *para* par les groupements nitro, méthoxy ou un atome d'hydrogène selon la méthode expérimentale expliquée au chapitre 7. Une courbe typique obtenue est indiquée à la figure 19.

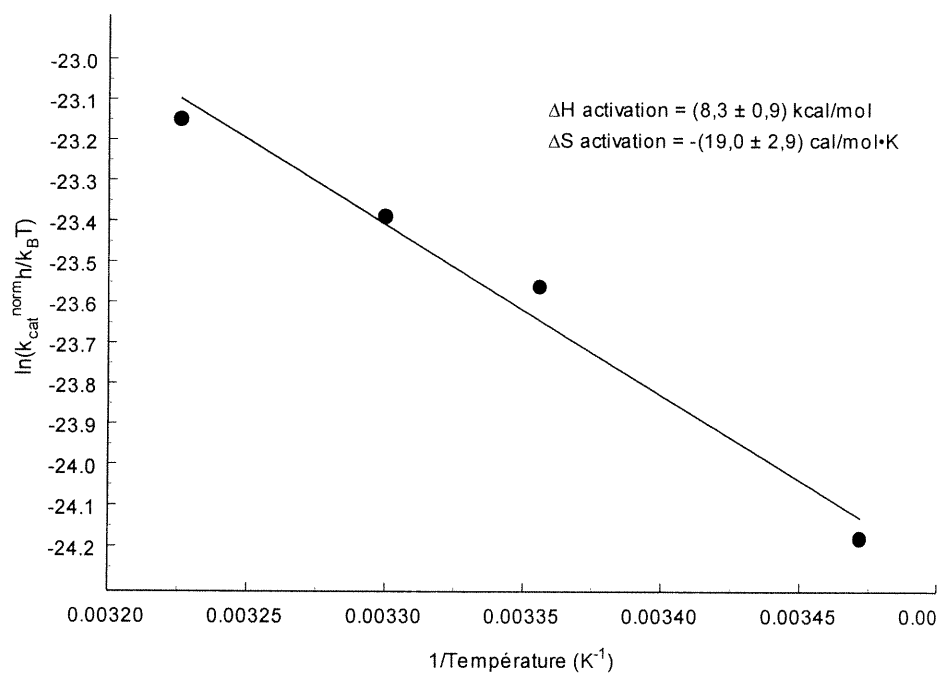


Figure 19 : Courbe de Eyring pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamylanilide en présence de 20 mM du substrat accepteur glycyglycine dans un tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 à différentes températures.

Chacun des points de la figure 19 représente une expérience de type Michaelis-Menten où le V_{\max} obtenu a été transformé en constante de vitesse $k_{\text{cat}}^{\text{norm}}$ de manière à pouvoir correctement utiliser l'équation de Eyring. Cette équation contient une constante de vitesse k_{obs} ici remplacée par $k_{\text{cat}}^{\text{norm}}$. Une courbe similaire a été obtenue pour les deux autres substrats donneurs testés. Les résultats de l'enthalpie et l'entropie d'activation ainsi obtenues sont consignés dans le tableau III. Les erreurs expérimentales qui y sont indiquées ont été déterminées grâce aux incertitudes de la pente ou de l'ordonnée à l'origine, respectivement.

Tableau III Enthalpie et entropie d'activation pour la transpeptidation par la GGT de différents substrats donneurs L- γ -glutamylanilides *p*-substitués en présence de 20 mM glycylglycine à différentes températures

Substrat donneur testé	ΔH^\ddagger (kcal mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (cal mol ⁻¹ • K ⁻¹)
L- γ -glutamyl- <i>p</i> -méthoxyanilide	8,8 ± 1,6	-16,4 ± 5,4
L- γ -glutamylanilide	8,3 ± 0,9	-19,0 ± 2,9
L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide	7,3 ± 0,3	-21,1 ± 0,9

4.3 Discussion

Les courbes de Eyring offrent beaucoup d'informations sur l'état de transition de l'étape limitante d'un processus enzymatique. Ceci demande cependant beaucoup de manipulations mathématiques. Au niveau expérimental, il faut constamment vérifier le pH des solutions, car celui-ci varie d'environ 0,03 unité de pH par degré Celsius.

Les valeurs de l'enthalpie d'activation (ΔH^\ddagger) ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre. En effet, les erreurs expérimentales sont importantes dans le cas des substrats donneurs L- γ -glutamyl-*p*-méthoxyanilide et L- γ -glutamylanilide. Ces deux composés ont été testés en utilisant la technique de diazotation qui implique un suivi de manière discontinue de la réaction enzymatique. De plus, cette technique implique beaucoup plus de manipulations (ajout de trois composés pour faire la coloration, arrêt de la réaction enzymatique, etc), donc les erreurs expérimentales sont importantes et l'analyse graphique est plus difficile. L'erreur expérimentale sur les valeurs du substrat donneur L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide est plus faible, car le suivi de la réaction a été effectué de manière continue. En transformant les valeurs de vitesse maximale (V_{\max}) obtenues durant les expériences en constantes de vitesse ($k_{\text{cat}}^{\text{norm}}$), les deux techniques de détection peuvent être comparées, car l'effet du volume du milieu réactionnel, de la concentration de l'enzyme présente et des mesures dans différentes conditions au spectrophotomètre n'est plus présent (il a été pris en considération dans les calculs effectués).

En considérant les valeurs obtenues en fonction du paramètre σ de Hammett, il est impossible de tirer des conclusions. En effet, lorsque la courbe de Hammett donne une pente positive ou négative, il y a une baisse ou une hausse respective en fonction du paramètre σ de Hammett pour la valeur du ΔH^\ddagger . Ici, il est très difficile de faire ce type d'analyse, car la courbe est biphasique. Il serait possible de s'attendre à une valeur élevée pour le ΔH^\ddagger du substituant avec un atome d'hydrogène, une valeur intermédiaire pour le substituant méthoxy et une faible valeur pour le substituant nitro. En effet, plus le ΔH^\ddagger est faible, plus la barrière d'énergie est basse et plus la réaction peut se réaliser rapidement, ce qui est le cas du substrat donneur avec le substituant nitro. Les erreurs expérimentales étant trop importantes et difficiles à diminuer, il est difficile de tirer des conclusions valables à ce niveau. Cependant, il semble que la barrière d'énergie à traverser soit assez similaire pour trois composés ayant un substituant électronique très différent. D'autres techniques directes, comme l'infrarouge ou la spectroscopie RMN, pourraient être envisagées

pour diminuer les erreurs expérimentales, mais la présence de l'enzyme dans le milieu réactionnel peut compliquer sensiblement l'analyse des résultats.

Les valeurs de l'entropie d'activation (ΔS^\ddagger) sont très intéressantes. En effet, encore une fois, les erreurs expérimentales sont trop importantes pour voir une différence valable entre les valeurs. Cependant, il faut remarquer que toutes les valeurs sont largement négatives. Ceci implique donc, à l'état de transition de l'étape limitante, un très haut degré d'ordre. Ceci peut être expliqué par un changement structurel de l'enzyme ou un changement de polarité dû à une réorganisation des molécules du solvant (50).

Dans le premier cas, il a déjà été suggéré qu'une enzyme adopte une conformation plus "ouverte" lorsqu'elle se lie à un substrat, ce qui amène une hausse de l'entropie. Ensuite, la libération d'un premier produit mène à un repliement de l'enzyme (conformation plus "fermée"), ce qui diminue le désordre du système (certains ponts hydrogènes ou d'autres types de liens doivent être refaits). Cette situation a été vue pour une protéase à sérine, la chymotrypsine, dont le ΔS^\ddagger est autour de $-19,8 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ pour la conversion d'un complexe enzyme-substrat en un deuxième intermédiaire et la libération d'un premier produit (50). Une valeur assez similaire a aussi déjà été obtenue dans le cas de la chymotrypsine pour la conversion d'un intermédiaire en une enzyme libre et un deuxième produit (52). Une réorganisation des molécules de solvant peut également expliquer les valeurs négatives. Si, à l'état de transition, des charges sont formées, les molécules de solvant vont être liées plus fortement, ce qui nécessite une meilleure organisation de leur part et amène une baisse de l'entropie d'activation.

Un troisième facteur doit être considéré. Si un substrat donneur est chargé, la stabilisation offerte par des acides aminés, eux aussi chargés, dans l'enzyme va libérer des molécules d'eau et l'entropie d'activation sera alors plus élevée. Dans le cas inverse, si une charge est développée au cours d'une réaction, le complexe sera plus polaire que les substrats de départ et l'entropie d'activation va diminuer.

Dans le cas des substrats donneurs testés avec la GGT, les valeurs de ΔS^\ddagger sont toutes presque semblables, ce qui semble infirmer l'hypothèse d'un effet stérique de la part des substituants en position *para* sur le cycle aromatique. Plusieurs hypothèses peuvent être faites quant à l'étape limitante correspondant aux valeurs de ΔS^\ddagger obtenues. Il est cependant impossible, à partir uniquement de ces valeurs, de proposer un mécanisme, car il y a trop de possibilités. Un mécanisme sera proposé au chapitre 6 à partir des résultats de la courbe de Hammett, de la théorie de l'état de transition de Eyring (présent chapitre) et de l'effet du pH combiné à celui de la température dont il sera question au chapitre 5.

Chapitre 5

Effets simultanés du pH et de la température

5.1 Introduction

Les substrats donneurs similaires au L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, mais contenant un substituant électrodonneur ou électroattracteur à la position *para*, réagissent avec la GGT pour former probablement un intermédiaire acyl-enzyme covalent et libérer un premier produit, l'aniline correspondante. Cependant, cette aniline ne peut pas quitter le site actif de l'enzyme sans avoir été préalablement protonée au niveau de son atome d'azote, donc elle doit avoir un groupement NH₂ et non pas un groupement NH⁻. Pour y arriver, il y a probablement un acide aminé, dans le site actif de l'enzyme, qui protone le groupe partant. Cette information a été confirmée par la réalisation, par d'autres étudiants dans le groupe de recherche, d'un profil pH-vitesse pour la réaction de transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence du substrat accepteur glycyglycine, en utilisant la méthode de détection discontinue des anilines libérées (53). Ce profil se retrouve à la figure 20.

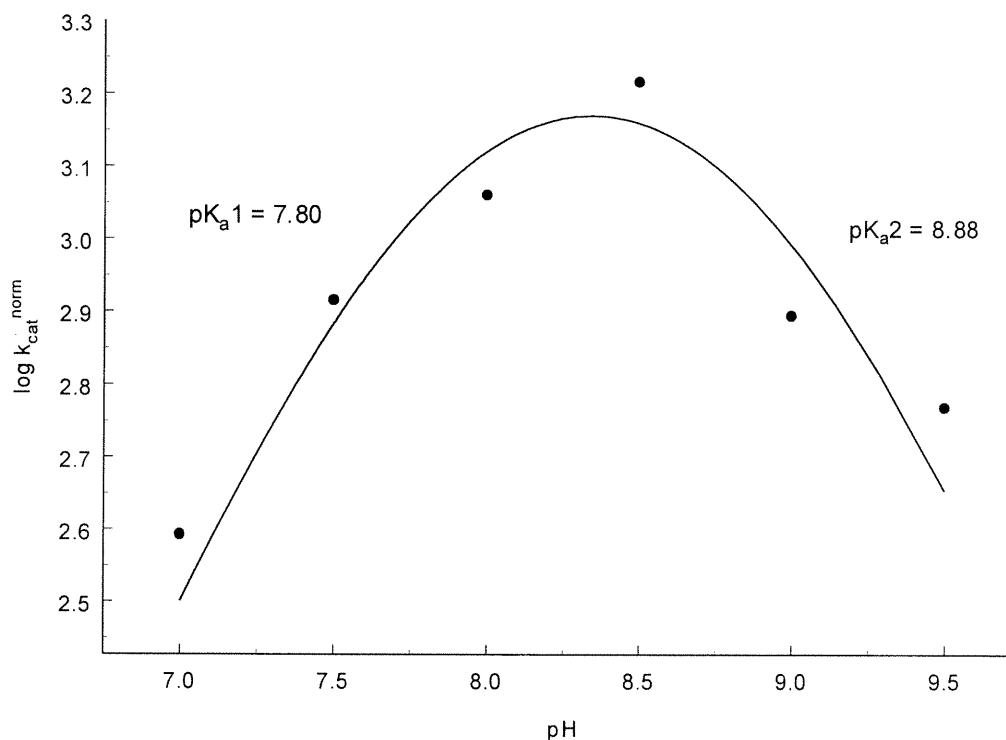


Figure 20 : Profil pH-vitesse pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de 20 mM glycylglycine à 37 °C.

Le pH a plusieurs effets sur une enzyme. En effet, l'état de dissociation de plusieurs acides aminés dépend de ce pH. Cependant, lorsque des études cinétiques sont réalisées en fonction du pH de la solution réactionnelle, les points d'inflexion d'un profil pH, comme celui indiqué à la figure 20, représentent des acides aminés directement impliqués dans la catalyse de la réaction étudiée. Ces acides aminés, dont l'ionisation est aussi importante, peuvent être présents dans le site actif, dans le substrat donneur (qui contient, comme il a été vu au chapitre 3, des groupements amine primaire et acide carboxylique obligatoires) ou dans le substrat accepteur. De plus, dans certains cas, il y a des acides aminés présents dans le site actif qui protonent ou déprotonent des acides aminés qui, eux, réagissent directement avec les substrats de l'enzyme. Les points d'inflexion alors obtenus sont dus à ceux qui protonent ou déprotonent.

Le premier pK_a déterminé dans le profil pH-vitesse de la figure 20 est probablement dû au substrat accepteur. En effet, il a déjà été observé qu'en changeant la nature du substrat accepteur utilisé au cours de l'étude de l'acylation, le pK_a varie (54). De plus, dans la même étude, il n'y a aucun pK_a entre pH 7 et 10 dans des profils pH pour la réaction d'hydrolyse (absence du substrat accepteur) de la GGT. Cependant, cet argument n'est pas très bon, car d'autres études ont été faites et un pK_a a pu être déterminé (36). Le substrat donneur est peut-être responsable du deuxième pK_a à la figure 20. En utilisant différents substrats donneurs pour faire le profil pH, aucune modification valable n'a été vue (53). La grande différence de pK_a des anilines libérées ne correspondait pas aux mouvements très faibles du profil pH. Il semble donc que le deuxième pK_a du profil de la figure 20 soit dû à un acide aminé présent dans le site actif de l'enzyme.

Il est possible de préciser la nature de l'acide aminé responsable du deuxième pK_a dans le profil pH-vitesse en réalisant une courbe de type van't Hoff. Des profils pH-vitesse doivent être effectués à différentes températures. Ceux-ci sont faits avec le substrat donneur L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, car il est représentatif des autres substrats donneurs précédemment utilisés et il peut être suivi directement par spectrophotométrie. La dissociation de l'acide aminé important est modifiée en fonction de la température, ce qui cause un déplacement du profil pH-vitesse. Le pK_a varie donc en fonction de la température. Une courbe de van't Hoff où le pK_a est placé en fonction de l'inverse de la température donne une pente dont la valeur est égale à l'énergie de dissociation du composé (ΔH) divisée par la constante des gaz parfaits R . Cette valeur est caractéristique d'un type d'acide aminé et donc permettra de proposer un acide aminé possiblement responsable de la catalyse acide générale vue dans les études de pH.

5.2 Résultats

La transpeptidation du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide a été suivie à différents pH et températures en présence de 20 mM glycylglycine. Les valeurs des paramètres

cinétiques K_M et V_{max} ont été obtenues. Les V_{max} ont été transformés en k_{cat}^{norm} , comme il est expliqué à l'annexe 1. Plusieurs profils pH-vitesse ont été obtenus et un profil typique, fait à 37 °C, est indiqué à la figure 21.

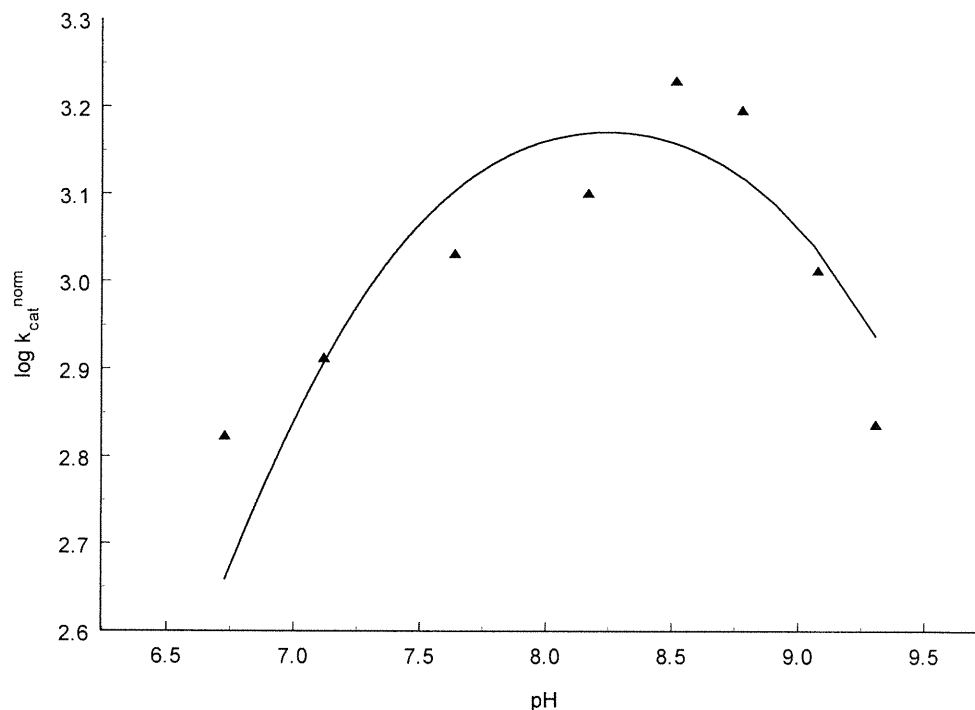


Figure 21 : Profil pH obtenu pour la transpeptidation, par la GGT, du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de 20 mM de glycylglycine à 37 °C. Les triangles représentent les données expérimentales et la ligne est la courbe théorique tracée par l'ordinateur selon le modèle proposé dans le chapitre 7.

Une courbe "théorique", tracée par l'ordinateur, se trouve à la figure 21. Le modèle proposé, celui d'un profil pH en forme de cloche, ne semble pas bien correspondre aux données expérimentales. Il y a un petit plateau autour du pH 8,0. Le profil de la figure 21 semble être formé de deux courbes superposées en forme de cloche. Puisque le modèle ne semble pas convenir, il a été décidé d'utiliser une autre technique, utilisant les courbes de Lineweaver-Burk, pour déterminer le deuxième pK_a autour du pH 9,0. Celle-ci est expliquée à l'annexe 1. Les protons sont considérés comme des activateurs ou des inhibiteurs de la réaction enzymatique. Tout aussi fiable que la technique avec le modèle informatique (55), des pK_a ont été

obtenus grâce au tracé d'une courbe Lineweaver-Burk et d'une courbe secondaire où les pentes de la courbe Lineweaver-Burk sont placées en fonction du pH. Un exemple typique de ces deux courbes se retrouvent aux figures 22 et 23.

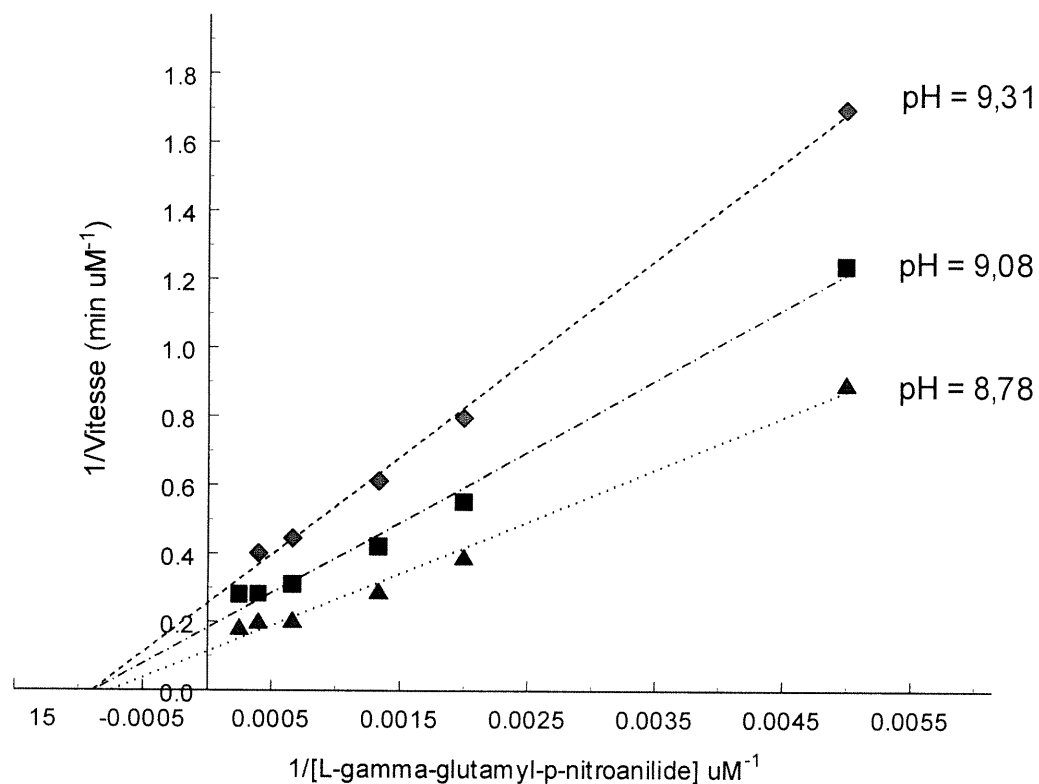


Figure 22 : Courbe Lineweaver-Burk pour la transpeptidation du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 37 °C.

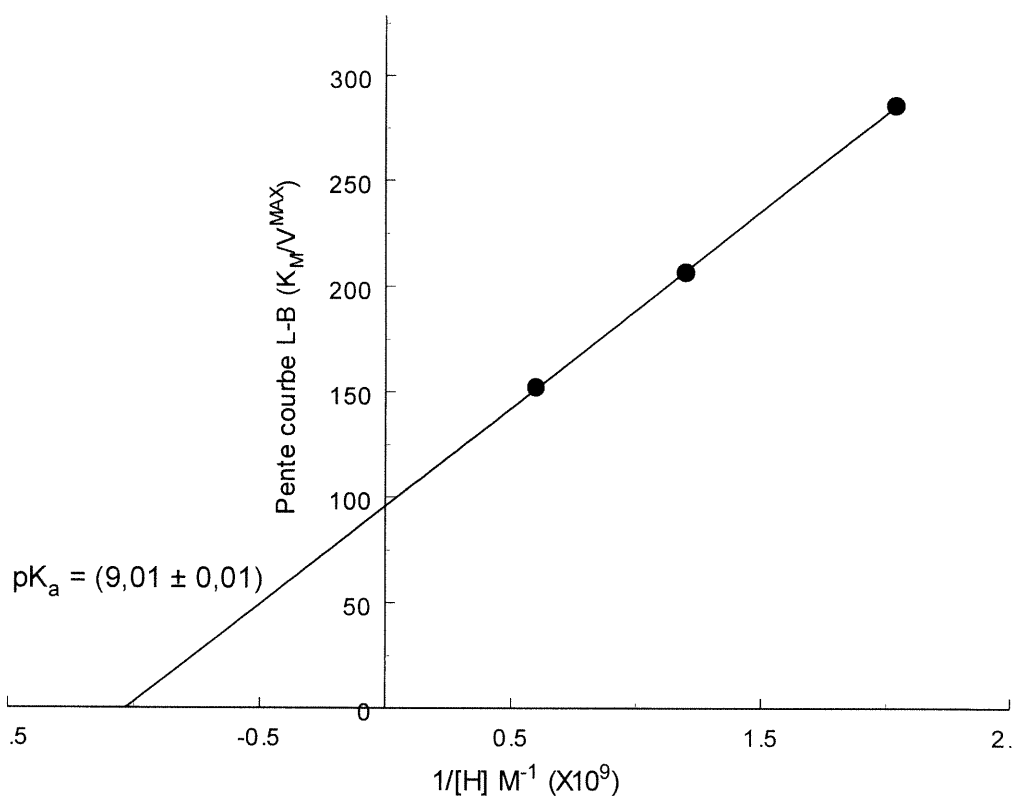


Figure 23 : Courbe secondaire où les pentes de la courbe Lineweaver-Burk (L-B, figure 22) sont placées en fonction de l'inverse de la concentration de protons (directement relié au pH).

Les pK_a déterminés à différentes températures sont placés dans le tableau IV. Le deuxième pK_a correspond probablement à un acide aminé du site actif de l'enzyme, ce qui est le but de la recherche.

Tableau IV Valeurs du deuxième pK_a , obtenues à partir de profils pH à différentes températures, en utilisant la technique des courbes de Lineweaver-Burk

Température du profil pH (°C)	Valeur du deuxième pK_a
15	$9,04 \pm 0,11$
25	$8,58 \pm 0,04$
30	$9,00 \pm 0,03$
37	$9,01 \pm 0,01$
40	$8,46 \pm 0,02$
50	$8,20 \pm 0,08$

Les erreurs expérimentales sont dues à la transformation des données à partir des courbes tracées dont un exemple se retrouve à la figure 23. À partir de ces données, il a été possible de tracer le graphique de van't Hoff, où le pK_a est placé en fonction de l'inverse de la température. Ce graphique se retrouve à la figure 24.

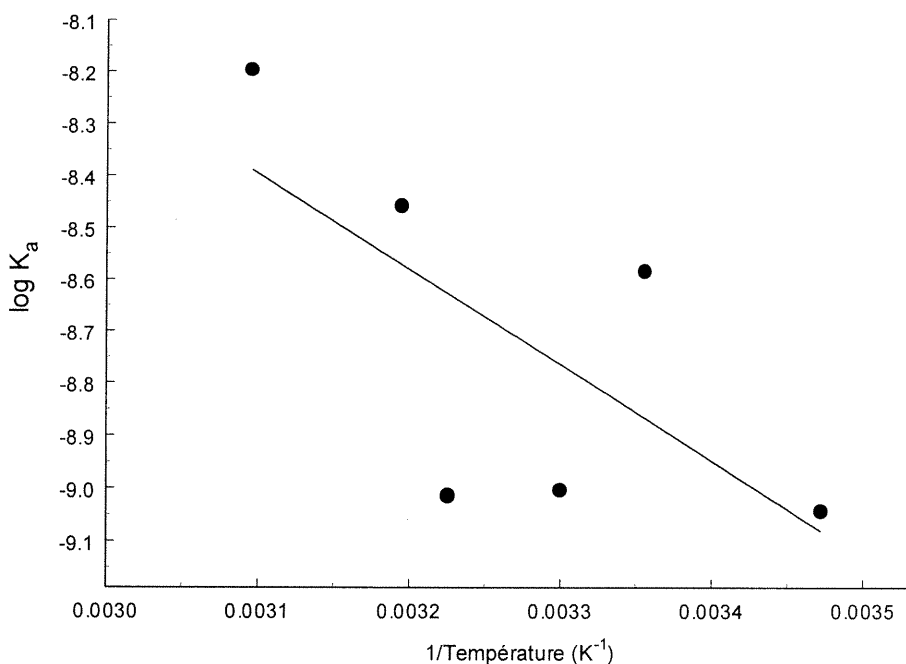


Figure 24 : Courbe de van't Hoff pour la transpeptidation, par la GGT, du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de 20 mM glycyglycine à différents pH et températures.

La valeur de l'énergie de dissociation ΔH , calculée à partir de la pente, est de (4 ± 2) kcal/mol. Cette valeur sera associée à un type d'acide aminé dans la section discussion.

5.3 Discussion

Plusieurs profils pH ont été effectués à différentes températures. Comme dans le cas des expériences d'Eyring effectuées au chapitre 4, le pH des milieux réactionnels a dû être vérifié et ajusté à chaque température, de manière à ce que les données expérimentales soient correctement interprétées. Il faut d'abord remarquer la différence dans la forme du profil pH entre les figures 20 et 21. Cette différence a été vue à toutes les températures testées. Puisque la figure 21 contient plus de valeurs expérimentales, la forme de la courbe est plus définie. De plus, plusieurs valeurs (notamment celles à pH 7,0 et 9,0) ont été refaites à plusieurs reprises, pour donner toujours le même résultat. La figure 21 provient d'expériences faites avec une méthode de détection continue, ce qui n'est pas le cas pour la figure 20. Cependant, les deux techniques de détection (en continu et en discontinu) sont équivalentes et donnent des résultats similaires, selon des expériences témoins effectuées (53). Il est possible que deux courbes d'ionisation soient superposées. En effet, la première courbe débiterait autour de pH 7,0 avec une pente ascendante pour se terminer avec un plateau à pH 8,0. Ceci pourrait correspondre au substrat accepteur, la glycyglycine, dont l'ionisation du groupement amine primaire est importante pour effectuer une désacylation efficace. Ensuite, une deuxième courbe, dont la pente ascendante débute vers pH 8,0, aurait une forme de cloche pour se terminer vers pH 9,5.

Plusieurs études de pH ont été effectuées dans la littérature, mais aucune d'entre elles n'a montré une forme comme celle de la figure 21 (56,57,21,58). Il faut dire que les substrats donneurs utilisés n'étaient pas les mêmes, mais il a été déterminé que la nature de ce dernier n'influence ni l'allure, ni le déplacement, de la courbe (53). Il est possible également que le complexe enzyme-substrat puisse avoir plusieurs états d'ionisation différents pour libérer les mêmes produits, ce qui peut

donner une courbe comme celle de la figure 21 (55). D'autres études doivent être effectuées pour éclaircir ce point.

La différence dans l'allure des profils pH est surtout vue pour la pente ascendante, autour des pH 7,0 à 8,5. La pente descendante est assez similaire dans les figures 20 et 21. Puisque le deuxième pK_a , celui situé dans cette pente, est celui sur lequel se basent les recherches, il a été décidé de prendre les profils pH obtenus et de déterminer les pK_a avec une autre méthode expliquée au chapitre 7 (55). Cette méthode est assez longue, car elle demande beaucoup de manipulations des données. Cependant, le nombre de valeurs expérimentales utilisées pour déterminer les pK_a était suffisamment grand pour obtenir une faible erreur expérimentale sur les données placées dans la courbe de van't Hoff. De plus, cette technique offre l'avantage de détecter la présence d'un phénomène plus complexe. Par exemple, si le graphique Lineweaver-Burk est formé par des hyperboles, et non pas des droites, il y a probablement un phénomène de coopérativité, où la liaison d'un proton va amener la liaison très rapide d'un autre proton. Cependant, cette situation n'a pas été vue dans les courbes tracées.

Les courbes de Lineweaver-Burk semblent indiquer que les protons agissent comme inhibiteur non-compétitif simple (annexe 1). Le pH aurait donc un effet sur l'enzyme libre et sur le complexe enzyme-substrat. L'acide aminé identifié grâce à la courbe de van't Hoff doit donc avoir une importance au niveau de la libération du produit.

La courbe de van't Hoff permet de déterminer l'énergie de dissociation d'un résidu important dans la catalyse enzymatique. L'erreur expérimentale est assez importante, en considérant les faibles erreurs expérimentales sur chacun des points. Il faut dire que plusieurs transformations mathématiques sont nécessaires pour arriver à former ce genre de graphique. L'erreur expérimentale de cette expérience ne peut pas être due à une déstabilisation de l'enzyme en fonction de la température. En effet, un test de stabilité de la GGT à différentes températures n'a pas donné de pertes

d'activité appréciables. Des études plus approfondies devront être effectuées pour tenter d'éclaircir ce point. Il est cependant possible de tirer des conclusions très intéressantes. En effet, un acide carboxylique (acide aspartique, acide glutamique) a un ΔH nul. Il est donc possible ici d'éliminer cette possibilité. Une histidine possède un ΔH de 7 kcal/mol, ce qui ressemble à la valeur obtenue ici. Cependant, le pK_a généralement observé est d'environ 6. Il ne faut pas oublier que cette valeur est fortement influencée par l'environnement de l'acide aminé. Si ce dernier est dans un milieu hydrophobe, l'acide aminé non-chargé sera plus stabilisé, donc le pK_a sera plus faible. Au contraire, si une histidine est près d'un résidu chargé négativement, la stabilité offerte va privilégier l'état protoné, donc le pK_a va augmenter. Donc, malgré le fait que le pK_a de l'acide aminé soit, sur les profils pH, autour de 9, il est possible que le résidu identifié soit une histidine. Une cystéine, quant à elle, a normalement un ΔH autour de 7 kcal/mol et un pK_a d'environ 9 (54).

Les données obtenues pourraient donc correspondre à une histidine ou une cystéine. Cependant, lors de la mutation de la cystéine conservée dans la petite sous-unité, résidu possiblement impliqué dans la catalyse enzymatique, aucune modification du K_M ou du V_{max} n'a été observée (29). Cependant, à la suite de la mutation d'histidines conservées dans plusieurs mammifères et bactéries, il semble y avoir une grande baisse d'activité de la GGT (36). De plus, pour la réaction d'hydrolyse, une courbe de van't Hoff, formée à partir de trois températures, a donné un ΔH de 5,4 kcal/mol qui a été assigné à un groupe imidazole, mais différent de ceux mutés dans la même étude. Il y a donc plusieurs évidences envers la présence d'une histidine importante au site actif, ce qui a été confirmé avec la présente étude de l'étape de transpeptidation.

Chapitre 6

Conclusion

Plusieurs objectifs de recherche ont été atteints au cours de ces années d'études. Ceux-ci visaient l'acquisition de connaissances concernant le mécanisme d'action et la nature des acides aminés impliqués dans la catalyse de la γ -glutamyl transpeptidase.

Pour débiter, les acides aminés impliqués dans la reconnaissance du substrat donneur dans la réaction de transpeptidation de la GGT ont été étudiés. Pour arriver, deux séries de molécules, contenant une portion γ -glutamyle modifiée, ont été synthétisées. La première est formée de molécules pouvant servir directement de substrat donneur pour la GGT, car toutes contiennent une portion *p*-nitrophénolate dont la libération peut être facilement suivie par spectrophotométrie. La synthèse de ces composés pose cependant quelques problèmes, dû à la présence d'un lien ester activé facilement clivable. La purification de ces composés doit donc être soigneusement effectuée. La deuxième série est formée de molécules contenant un lien amide primaire à la place du lien ester activé. Ces composés ne possèdent pas un chromophore pouvant être libéré par catalyse, donc ils ont plutôt été utilisés comme inhibiteurs de la réaction de transpeptidation généralement étudiée pour la GGT.

Avec ces composés en main, il a été possible de faire des études cinétiques pour évaluer la reconnaissance, par la GGT, des molécules testées. La première série de molécules s'est avérée de faible utilité. En effet, le lien ester activé que toutes contenaient était trop facilement clivé par le substrat accepteur, la glycylglycine, possédant un groupement amine primaire, ou par des molécules d'eau. De plus, il a été vu qu'une cyclisation intramoléculaire était possible. Aucune reconnaissance n'a donc pu être observée, car les réactions secondaires étaient trop importantes. Pour d'autres substrats donneurs de cette série, les réactions secondaires étaient moins présentes, mais la GGT ne semble pas reconnaître les molécules.

La deuxième série de composés, agissant comme inhibiteurs d'une réaction très bien connue pour la GGT, a permis d'obtenir beaucoup plus de résultats. Il a été vu, en comparant les valeurs des constantes d'inhibition K_i obtenues pour la glutamine et les autres composés synthétisés, que les groupements amine primaire et acide carboxylique présents dans la portion γ -glutamyle doivent être présents pour assurer une bonne reconnaissance du substrat donneur par l'enzyme. L'absence de l'un d'eux mène à une reconnaissance de l'inhibiteur au niveau du site de liaison du substrat accepteur. De plus, le groupement amine primaire, responsable dans la première série de composés synthétisés de la cyclisation intramoléculaire, doit être libre. Donc, la portion γ -glutamyle doit être intacte dans les substrats donneurs de la GGT pour assurer une bonne reconnaissance. Ceci implique probablement la présence d'un acide aminé chargé négativement, et d'un autre chargé positivement, pour aider à la reconnaissance du substrat. De plus, les composés contenant une portion *p*-nitrophénolate ne peuvent être utilisés dans l'étude de l'étape de désacylation de la GGT, de par leur trop grande instabilité.

La réaction de transpeptidation de la GGT est formée des étapes d'acylation et de désacylation. Puisque cette dernière ne peut pas être étudiée avec les composés proposés, l'étape d'acylation a été étudiée. Plusieurs résultats de recherche concernant cette dernière avaient déjà été obtenus par d'autres étudiants du laboratoire de recherche, mais étaient insuffisants pour proposer un mécanisme précis pour l'étape limitante. Donc, des études de l'effet de température ont été effectuées, de manière à pouvoir acquérir plus de données cinétiques concernant l'état de transition de cette étape. Les courbes de Eyring obtenues pour trois différents substrats donneurs ont permis d'obtenir des valeurs pour l'enthalpie et l'entropie d'activation. Les erreurs expérimentales étant trop importantes, il a été impossible de distinguer les valeurs obtenues pour les substrats donneurs. Cependant, l'entropie d'activation fortement négative implique un état de transition fortement ordonné.

Puisque le premier produit libéré au cours de l'étape d'acylation est une aniline se devant d'être sous forme NH_2 et non pas NH^- , il doit y avoir un acide aminé agissant comme acide général au cours de l'étape limitante. Ceci a été démontré par des études de pH où un pK_a autour de 9, dans une pente décroissante d'un profil pH-vitesse en forme de cloche, a été obtenu. Pour connaître la nature de cet acide aminé, des profils pH-vitesse ont été effectués à différentes températures, de manière à pouvoir générer une courbe de van't Hoff. Cette dernière a permis d'obtenir une énergie de dissociation pouvant être associée à une histidine.

Toutes les informations ainsi obtenues permettent de proposer un mécanisme pour l'étape limitante de l'étape d'acylation en tenant compte du caractère électrodonneur ou électroattracteur du substituant en *para* du groupement aromatique des substrats donneurs testés. Le mécanisme proposé se retrouve à la figure 25.

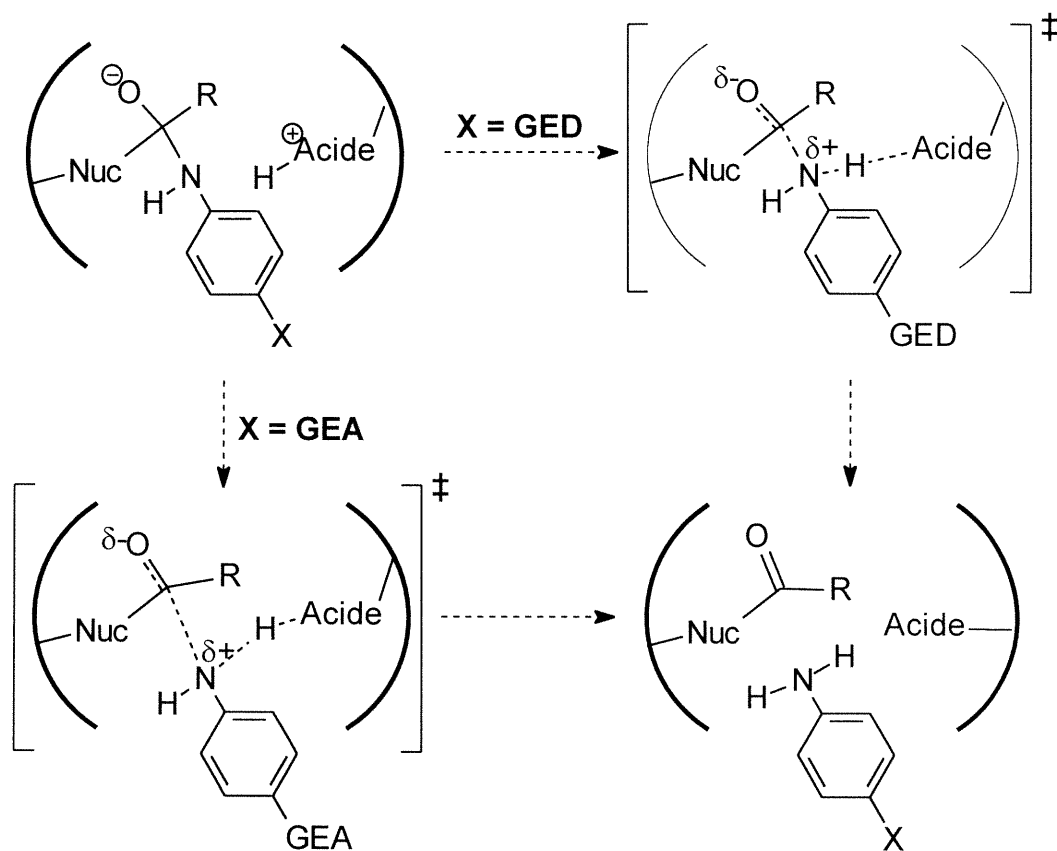


Figure 25 : Proposition d'un mécanisme impliquant un changement de géométrie de l'état de transition selon la nature du substituant en position *para* des substrats donneurs L- γ -glutamyl-anilides. Nuc est le nucléophile présent au site actif, GED correspond à un groupe électrodonneur et GEA, à un groupe électroattracteur. R est la portion γ -glutamyle du substrat donneur.

Comme il est indiqué à la figure 25, la nature du substituant sur les substrats donneurs L- γ -glutamylanilides modifie la géométrie à l'état de transition. Après l'attaque d'un nucléophile sur le carbonyle de la portion γ -glutamyle du substrat donneur, un intermédiaire tétraédrique est obtenu. Celui-ci se décompose en impliquant deux réactions à la fois : le bris du lien C-N pour permettre la libération de l'aniline et la protonation de l'azote pour en faire un bon groupe partant. Puisque deux liens sont impliqués, le graphique de More-O'Ferrall/Jencks permet d'avoir une idée plus globale du positionnement de l'état de transition. Les figures 26, 27 et 28 représentent ce type de graphique pour différents substituants en *para*.

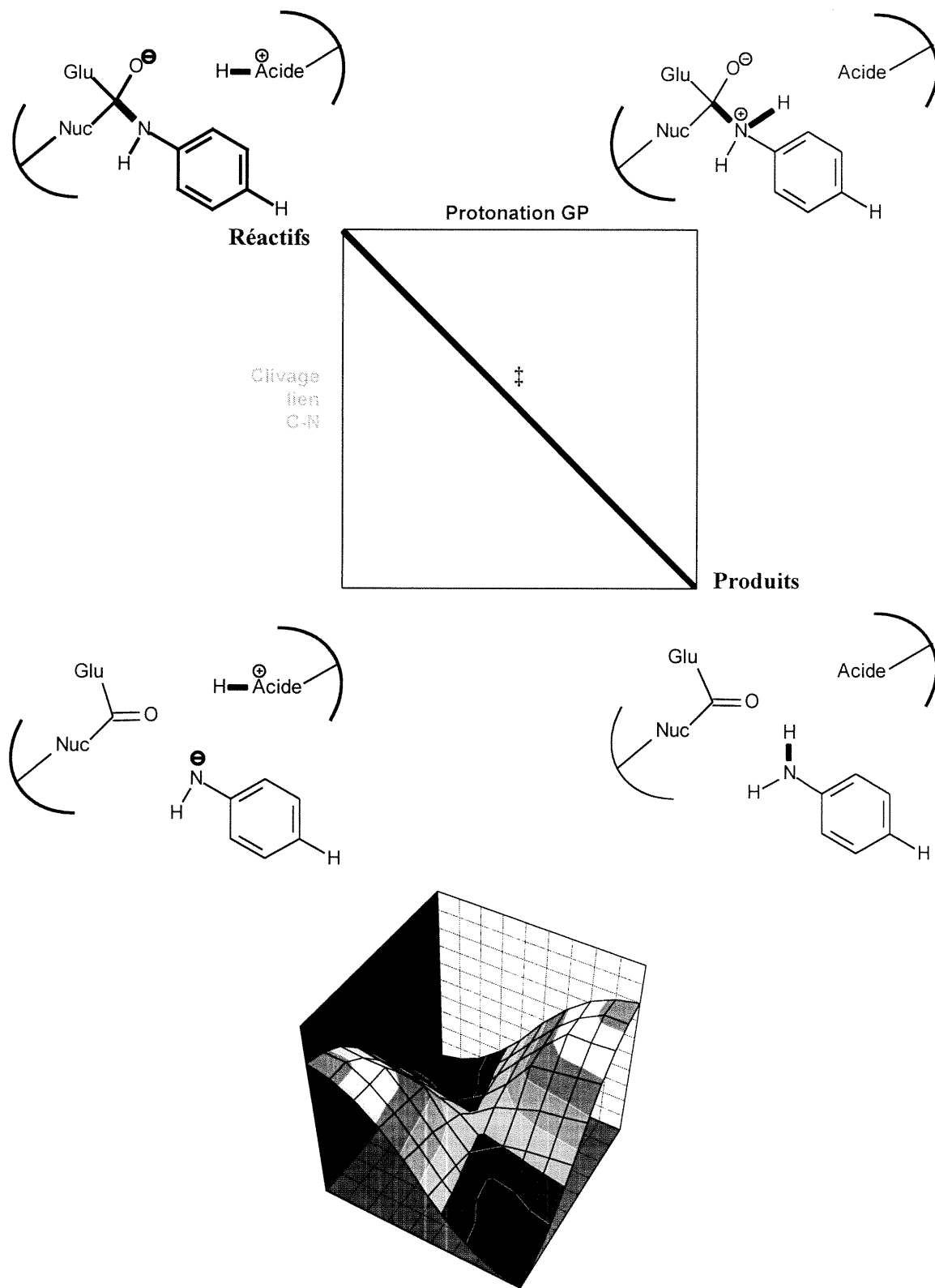


Figure 26 : Graphique de More-O'Ferrall/Jencks pour le substituant hydrogène.

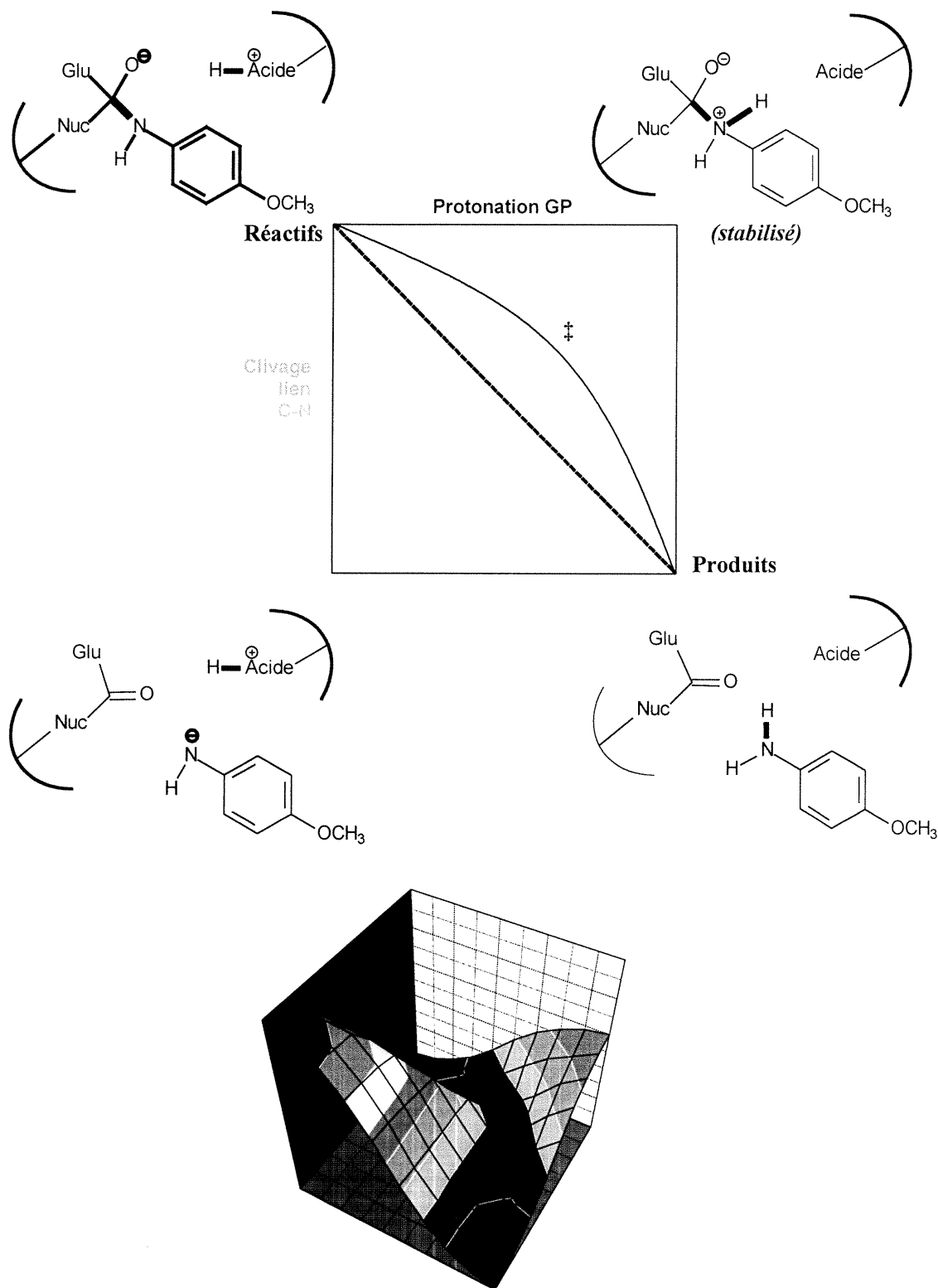


Figure 27 : Graphique de More-O'Ferrall/Jencks pour le substituant méthoxy.

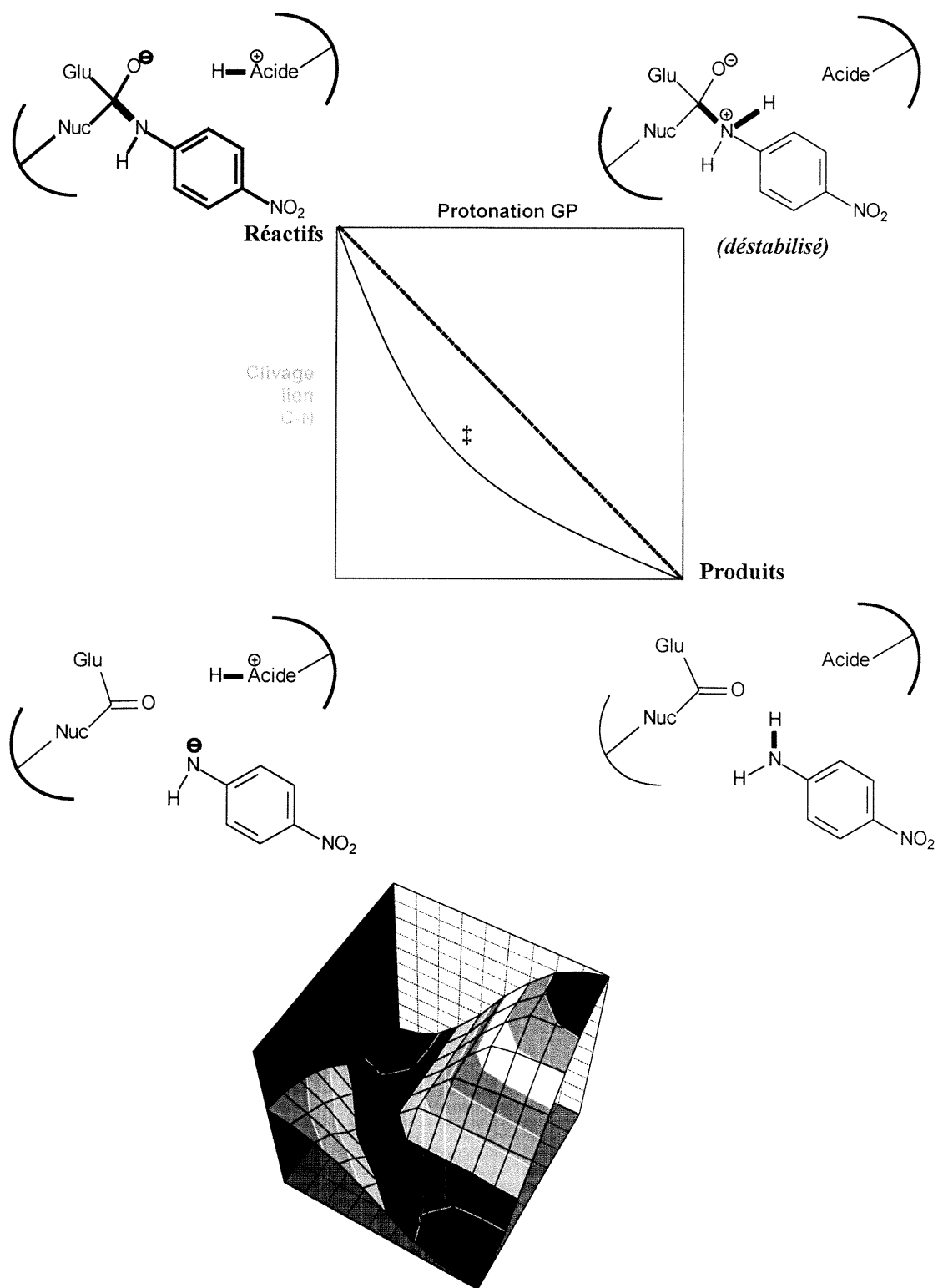


Figure 28 : Graphique de More-O'Ferrall/Jencks pour le substituant nitro.

Le graphique de More-O'Ferrall/Jencks permet de voir simultanément l'énergie associée à la formation et au bris de deux liaisons. À l'horizontale, il y a la coordonnée de la réaction pour la formation du lien N-H. À la verticale se retrouve les informations pour le bris du lien C-N. Le troisième axe, venant vers le lecteur, représente l'énergie associée à un état des réactifs. Ainsi, l'intermédiaire tétraédrique se retrouve dans le coin supérieur gauche. Dans le coin supérieur droit, il y a la même structure, mais après la formation complète du lien N-H. Dans le coin inférieur gauche se retrouvent les réactifs après le bris complet du lien C-N. Dans le coin inférieur droit, le premier produit et l'intermédiaire acyl-enzyme sont formés. Il faut préciser que, dans le cas présent, ces graphiques ont été générés de manière qualitative, avec des valeurs arbitraires d'énergie. Ils n'ont pas été faits en se basant sur des calculs. Leur seul but est d'éclaircir des notions assez complexes au niveau du positionnement d'un état de transition dans une réaction limitante par rapport au bris ou à la formation d'un lien.

Dans le diagramme en deux dimensions de la figure 26, il y a une droite qui se rend du coin supérieur gauche au coin inférieur droit. Cette droite représente la coordonnée de la réaction et l'endroit où se retrouve l'état de transition. Ainsi, dans la figure 26, la protonation complète de l'azote et le bris complet du lien C-N ne sont jamais vus, car la droite ne passe pas par ces extrémités du graphique, mais plutôt par le centre. Le graphique en trois dimensions représente le graphique de More-O'Ferrall/Jencks, mais avec l'énergie associée aux différents états des réactifs. Ainsi, les deux extrémités précédemment discutées sont très élevées en énergie, donc très peu favorables. Le chemin réactionnel emprunté par le substrat donneur substitué avec un atome d'hydrogène ne favorise ni la protonation, ni le bris du lien C-N.

Dans le cas de la figure 27, il y a une courbe dirigée vers le coin supérieur droit. En effet, la protonation de l'azote est favorisée grâce à la présence d'un groupement électrodonneur. Ainsi, au niveau énergétique, la libération du produit va probablement passer par un état de transition où la protonation de l'azote est très

avancée et le bris du lien C-N est très peu favorisé. Ceci est indiqué par les niveaux d'énergie des réactifs dans les coins supérieur droit et inférieur gauche.

La figure 28 montre une courbe similaire à celle de la figure 27, mais favorisant plutôt le coin inférieur gauche. En effet, la présence d'un groupement électroattracteur va favoriser le bris du lien C-N et défavoriser la formation du lien N-H. Ainsi, à l'état de transition, le lien C-N sera presque totalement brisé et le lien N-H, très peu formé. La discussion concernant la longueur des liens est bien représentée à la figure 25.

Le mécanisme proposé à la figure 25 permet d'expliquer la courbure de la courbe de Hammett. En effet, il est possible d'expliquer l'accélération de la catalyse vue en présence de substituants électroattracteurs et électrodonneurs. De plus, il y a un véritable changement de géométrie de l'état de transition en fonction du substituant. Les liens ne sont pas tous de la même longueur. Ceci est démontré par les valeurs de l'entropie d'activation. Toutes les valeurs du ΔS^\ddagger sont très négatives, ce qui nécessite un grand niveau d'ordre. Dans la figure 25, il est clair que le bris et la formation simultanés de liens nécessite un degré d'ordre très élevé. Il est cependant impossible de distinguer le niveau d'ordre présent selon le type de substituant, car les erreurs expérimentales sont trop importantes.

Les fortes valeurs négatives de l'entropie d'activation peuvent également être expliquées par un changement de conformation de la GGT au cours de l'acylation. En effet, pour bien lier le substrat donneur, la GGT est possiblement dans l'obligation d'adopter une conformation plus "flexible", de sorte que le désordre augmente. Les molécules d'eau entourant l'enzyme doivent se replacer un peu, mais leur réseau de ponts hydrogènes ne doit pas être trop perturbé, car les principales modifications dans la structure de l'enzyme concernent surtout son site actif, et non pas les résidus ionisables de sa surface. Ainsi, le désordre est probablement plutôt dû aux mouvements de l'enzyme. Au cours de la libération d'un premier produit (l'aniline), la conformation de l'enzyme va probablement être plus "repliée", ce qui va causer une

perte de désordre, dû à l'obligation de refaire tous les liens électrostatiques et les ponts hydrogènes précédemment brisés dans la structure de l'enzyme.

La courbe de van't Hoff a permis d'identifier un acide aminé agissant comme acide général au site actif de l'enzyme. Celui-ci peut être une histidine, souvent présente dans les protéases à cystéine et à sérine pour agir comme acide ou base général. De plus, une histidine peut servir à déprotoner un nucléophile (une sérine, par exemple) avant l'attaque du substrat. Il est possible de dire qu'une histidine, identifiée avec la courbe de van't Hoff, est impliquée dans la catalyse de la GGT, comme acide général. Cependant, cet acide aminé peut également agir pour protoner un autre acide aminé impliqué dans le site actif qui, lui, va interagir directement avec le substrat donneur. Comme il a déjà été démontré par des études de mutagenèse dirigée, des histidines sont très importantes pour la catalyse de la GGT (36). La proposition de mécanisme se retrouvant à la figure 25 permettrait d'expliquer le rôle de l'une d'entre elles et tous les résultats obtenus au cours de l'étude de l'étape d'acylation de la GGT.

Chapitre 7

Partie expérimentale

7.1. Synthèse de substrats analogues

7.1.1 Matériel

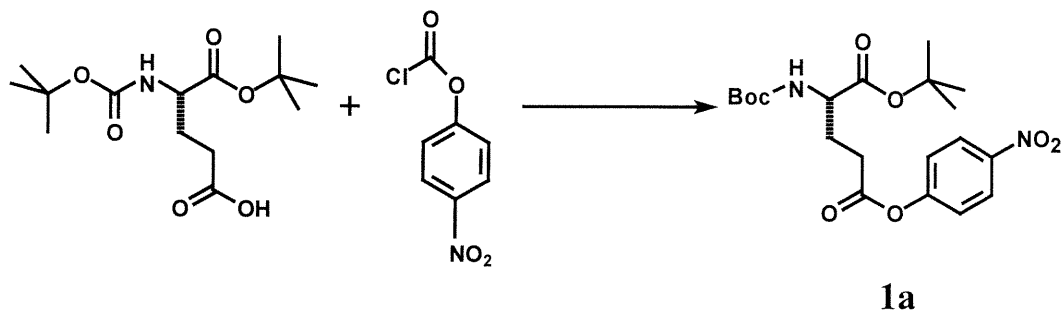
Tous les produits utilisés ont été achetés chez Aldrich. Les solvants ont été achetés chez différents distributeurs. Le méthanol et l'acétonitrile ont été achetés chez American Chemicals Ltd. L'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et le chloroforme proviennent de BDH. La triéthylamine et l'hexane ont été achetés chez Anachemia, tandis que le N,N-diméthylformamide provient de ACP.

Les spectres RMN ^1H ont été pris sur un Bruker AMX300 (300 MHz) et les spectres RMN ^{13}C , sur un Bruker AMX400 (100 MHz). Les points de fusion ont été obtenus sur un appareil de type Uni-melt Thomas-Hoover. Les spectres de masse ont été obtenus du Centre Régional de Spectrométrie de Masse de l'Université de Montréal.

7.1.2 Méthode expérimentale

Les couplages effectués entre des acides aminés protégés et le *p*-nitrophényl chloroformate ont été faits selon un protocole préalablement établi (43). Aucune comparaison n'a pu être faite avec les données de la littérature, car ces composés n'ont pas été synthétisés auparavant.

*Boc-L- γ -glutamate-O-*t*-Bu de *p*-nitrophényle (1a)*



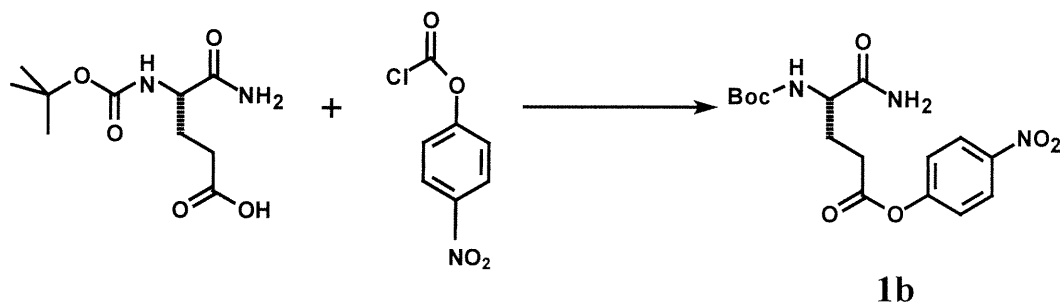
Le composé Boc-L-Glu-O-*t*-butyl (300 mg, 0,989 mmole) a été ajouté à 75 mL d'acétate d'éthyle. Après sa solubilisation complète, le *p*-nitrophényl chloroformate (219 mg, 1,09 mmole), la triéthylamine (152 μ L, 1,09 mmole) et le DMAP (12 mg, 0,10 mmole) ont été ajoutés dans cet ordre. Après 75 min, la réaction a été arrêtée et filtrée. Après l'évaporation du filtrat, le résidu solide a été resuspendu dans de l'acétate d'éthyle et extrait avec une solution à demi saturée de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) jusqu'à ce que la phase aqueuse soit complètement transparente (6 \times 25 mL). Les phases organiques ont été combinées et séchées sur du sulfate de magnésium (MgSO₄), puis filtrées. Après évaporation du solvant, une huile jaunâtre a été obtenue (419 mg, 99 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,41 (s, 9H), 1,45 (s, 9H), 1,99 (m, 1H), 2,28 (m, 1H), 2,67 (td, J = 7,5 Hz, J = 7,5 Hz, 2H), 4,28 (m, 1H), 5,22 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,28 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 8,22 (d, J = 9,1 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 27,86, 28,18, 30,25, 53,01, 79,94, 82,39, 122,41, 125,03, 145,20, 155,31, 155,46, 170,40, 171,00.

SM (M+K)⁺ calc. 463,14828, obtenu 463,14980.

Boc-L-γ-isoglutamate de p-nitrophényle (1b)



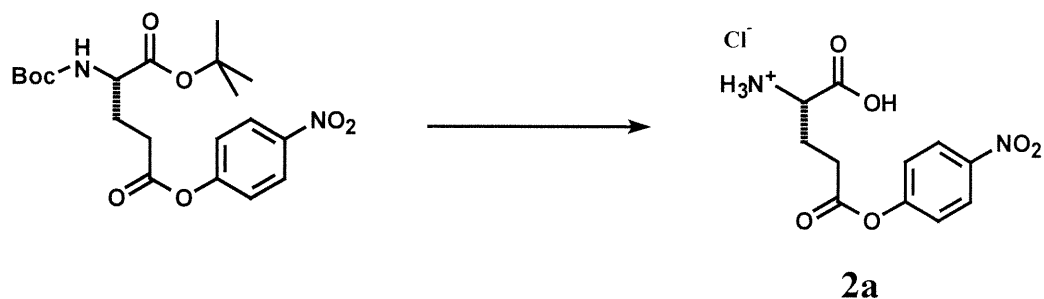
Le protocole expérimental suivi a été le même que pour le composé **1a**, mais le composé de départ était le Boc-L-isoglutamine (200mg, 0,812 mmole), le solvant a été l'acétonitrile et la réaction a duré 165 min. Un composé solide blanc a été obtenu (212 mg, 71 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,47 (s, 9H), 2,05 (m, 1H), 2,30 (m, 1H), 2,79 (m, 2H), 4,33 (m, 1H), 5,28 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 5,49 (br s, 1H), 6,15 (br s, 1H), 7,33 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 8,30 (d, J = 7,9 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ 28,38, 28,66, 31,37, 54,67, 80,78, 123,97, 126,04, 147,00, 157,00, 157,90, 171,50, 172,07.

p.f. (134-136) °C.

SM (M + H)⁺ calc. 368,14578, obtenu 368,14510.

L- γ -glutamate de *p*-nitrophényle (**2a**)

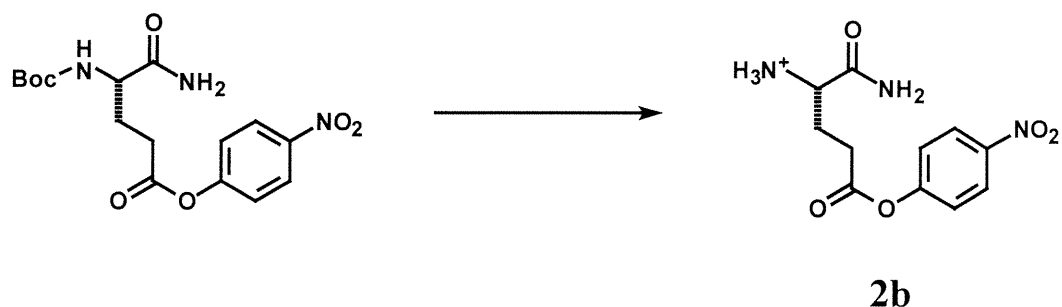
Le composé Boc-*L*- γ -glutamate-O-*t*-Bu de *p*-nitrophényle (**1a**) (381 mg, 0,90 mmole) a été dissout dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂) et le ballon réactionnel a été placé dans un bain de glace (0 °C). Du HCl généré à partir de l'acide sulfurique (H₂SO₄) et du chlorure d'ammonium (NH₄Cl) a été "barbotté" dans la solution pour 1 heure. Le ballon a été retiré du bain de glace et placé à la température de la pièce pour environ 5 heures durant lesquelles la réaction a été suivie par RMN ¹H. Un précipité blanc est apparu. La réaction a été arrêtée et le solvant a été évaporé. Un précipité blanc a été obtenu (223 mg, 82 %).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 2,33 (m, 2H), 2,94 (td, $J = 2,3$ Hz, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,12 (t, $J = 6,9$ Hz, 1H), 7,40 (d, $J = 9,3$ Hz, 2H), 8,31 (d, $J = 9,3$ Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 26,33, 30,68, 52,94, 123,93, 126,15, 147,00, 156,84, 171,29, 171,54.

p.f. (141,0-142,5)°C.

SM calc. 269,07736, obtenu 269,07820.

L- γ -isoglutamate de *p*-nitrophényle (**2b**)

Le composé Boc-*L*- γ -isoglutamate de *p*-nitrophényle (**1b**) (196 mg, 0,53 mmole) a été dissout dans du dichlorométhane et du HCl gazeux a été ajouté de la même manière que pour générer **2a**. Le ballon réactionnel a été refroidi dans un bain de glace (0 °C) pour 30 minutes et ensuite placé à la température de la pièce pour 2 heures. Le solvant a été évaporé et le résidu a été recristallisé dans un mélange méthanol/acétate d'éthyle. Un solide blanc a été obtenu (55 mg, 22 %).

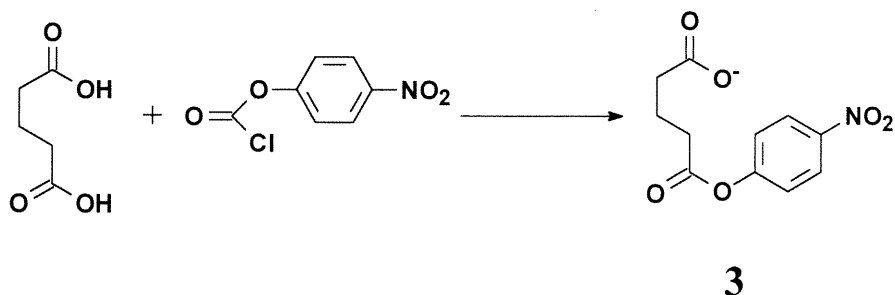
RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 2,19 (m, 2H), 2,75 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,91 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 7,31 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 8,20 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26,68, 30,31, 52,27, 124,28, 126,27, 146,08, 156,31, 170,87, 171,12.

p.f. 144 °C.

SM calc. 268,09335, obtenu 268,09460.

Glutarate de *p*-nitrophényle (3)



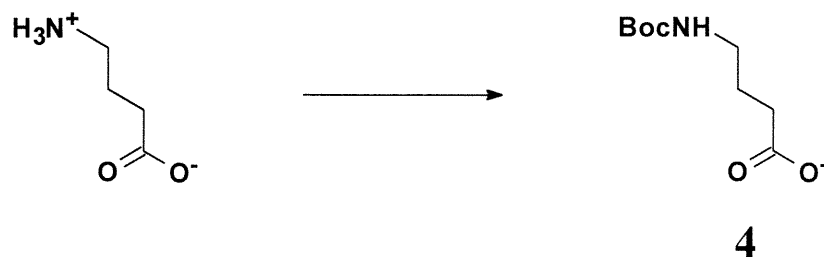
L'acide glutarique (300 mg, 2,27 mmoles) a été dissout dans 30 mL d'acétonitrile. La triéthylamine (0,23 g, 2,27 mmoles), le *p*-nitrophényl chloroformate (503 mg, 2,50 mmoles) et le 4,4-diméthylaminopyridine (28 mg, 0,23 mmole) sont ajoutés dans cet ordre. La réaction a été suivie par ccm (59:40:1 acétate d'éthyle:hexane:acide acétique). À la fin de la réaction, la solution a été évaporée et le résidu obtenu a été resolubilisé dans le chloroforme. La solution a été lavée avec de l'eau distillée et la phase organique a été en partie évaporée pour faire ensuite une chromatographie "flash" (59:40:1 acétate d'éthyle:hexane:acide acétique). Les fractions contenant le produit ont été regroupées et évaporées. Un solide jaune pâle a été obtenu (47 mg, 33 %).

RMN ¹H (300 MHz, CHCl₃) δ 2,11 (qu, J = 7,2 Hz, 2H), 2,56 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 2,79 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 7,30 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 8,29 (d, J = 9,3 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 19,68, 32,89, 33,34, 122,59, 125,44, 145,55, 155,45, 170,64, 178,96.

p.f. 92 °C.

SM (m/z) 254,1

Boc-acide 4-aminobutyrique (4)

L'acide γ -aminobutyrique (2 g, 19,4 mmoles) a été dissout dans 20 mL méthanol. La triéthylamine (11,8 g, 116,4 mmoles) et le di-*tert*-butyl dicarbonate (8,89 g, 40,7 mmoles) ont été ajoutés et le ballon réactionnel a été chauffé à 60 °C. La réaction a été suivie par ccm (99:1 acétate d'éthyle:acide acétique) et laissée pour la nuit. Le solvant a été évaporé et l'huile ainsi obtenue a été dissoute dans du bicarbonate de sodium (NaHCO₃) saturé. Des extractions avec l'hexane (3 X 40 mL) ont été effectuées et la phase aqueuse a été acidifiée avec du HCl 1N jusqu'à un pH 2-3. Des extractions de la phase aqueuse avec de l'acétate d'éthyle (3 X 30 mL) ont été faites et les phases organiques ont été regroupées et séchées sur du sulfate de magnésium (MgSO₄). Après filtration, le solvant a été évaporé et un solide blanc a été obtenu (3,81 g, 97 %).

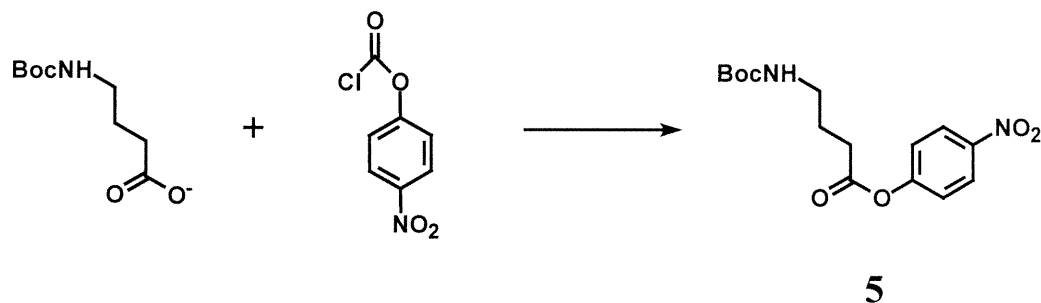
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,45 (s, 9H), 1,83 (qu, J = 7,0 Hz, 2H), 2,41 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 4,70 (br s, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25,03, 28,27, 31,20, 39,69, 79,39, 156,12, 178,32.

p.f. 58 °C.

SM (M + H)⁺ calc. 204,12358, obtenu 204,12300.

Boc-acide 4-aminobutyrate de p-nitrophényle (5)



Le composé Boc-acide 4-aminobutyrique (**4**) (3,8 g, 18,7 mmoles) a été dissout dans 75 mL d'acétonitrile. La triéthylamine (2,08 g, 20,6 mmoles), le *p*-nitrophényl chloroformate (4,15 g, 20,6 mmoles) et le 4,4-diméthylaminopyridine (0,23 g, 1,87 mmole) ont été ajoutés dans cet ordre. Le mélange réactionnel a été laissé à la température de la pièce toute la nuit. Le solide blanc formé (triéthylamine protonée) a été enlevé par filtration sous gravité. De l'eau a été ajoutée au filtrat et un solide jaune pâle, le composé désiré, est apparu (5,72 g, 95 %).

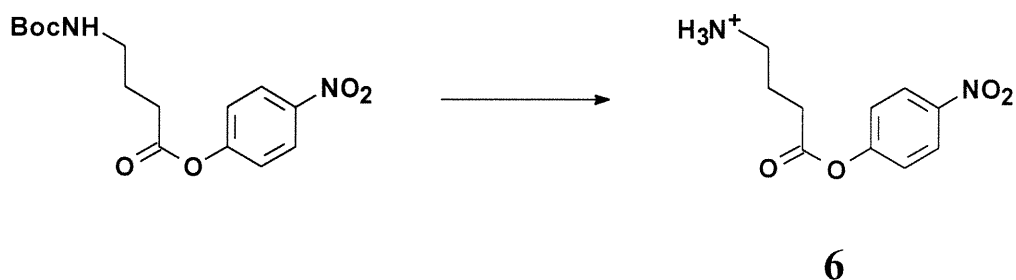
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,46 (s, 9H), 1,96 (qu, J = 6,8 Hz, 2H), 2,67 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 3,28 (m, 2H), 4,63 (br s, 1H), 7,31 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 8,29 (d, J = 9,3 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25,36, 28,54, 31,62, 39,74, 79,62, 122,62, 125,35, 145,47, 155,53, 156,31, 171,02.

p.f. 120 °C.

SM (M + H)⁺ calc. 325,13995, obtenu 325,13890.

4-aminobutyrate de p-nitrophényle (6)



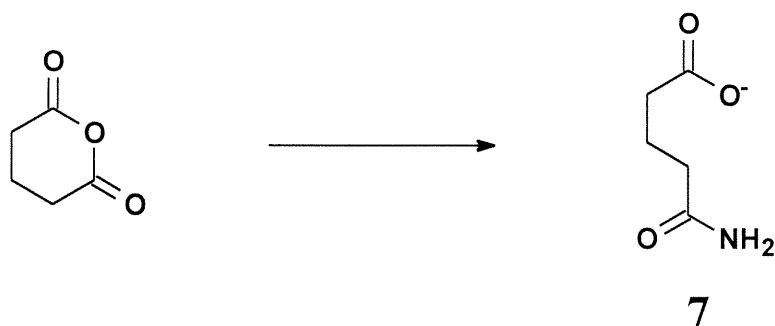
Le composé Boc-acide 4-aminobutyrate de p-nitrophényle (5) (300 mg, 0,93 mmole) a été dissout dans du dichlorométhane. Du HCl gazeux généré par de l'acide sulfurique (H₂SO₄) et du chlorure d'ammonium (NH₄Cl) a été "barbotté" dans le milieu réactionnel durant 1 heure. La solution est filtrée pour obtenir un solide jaune pâle pur (208 mg, 86 %).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 2,05 (qu, J = 7,1 Hz, 2H), 2,82 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 3,06 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 8,31 (d, J = 9,2 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ 23,50, 31,55, 39,88, 123,89, 126,16, 146,90, 156,86, 171,82.

p.f. 149-151 °C.

SM (m/z) 225,2

4-carboxybutyramide (7)

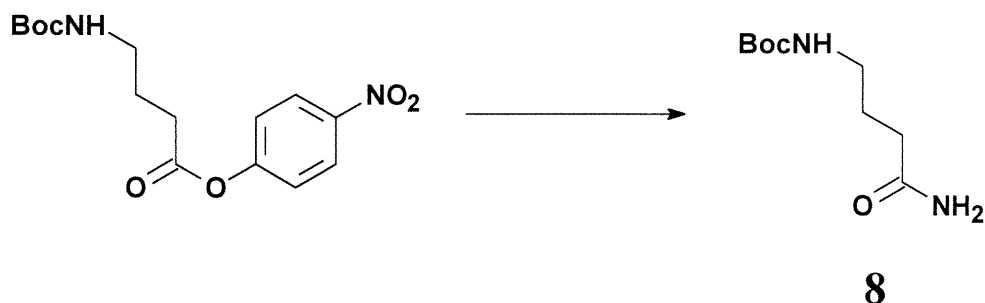
L'anhydride glutarique (500 mg, 4,38 mmoles) a été dissout dans 10 mL de dichlorométhane. De l'ammoniac (NH₃) gazeux généré à partir de l'hydroxyde de sodium (NH₄OH) et du chlorure d'ammonium (NH₄Cl) a été "barbotté" dans le milieu réactionnel jusqu'à ce que la réaction soit complète (environ 4 jours). Une filtration sous gravité a été faite pour récupérer le précipité. Celui-ci a été lavé avec du dichlorométhane. Un solide blanc a été obtenu (190 mg, 34 %).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1,88 (qu, J = 7,3 Hz, 2 H), 2,25 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 2,33 (t, J = 7,4 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 22,12, 34,09, 35,47, 176,86, 178,34.

p.f. 89-90 °C.

SM (m/z) 132,1

Boc-4-aminobutyramide (8)

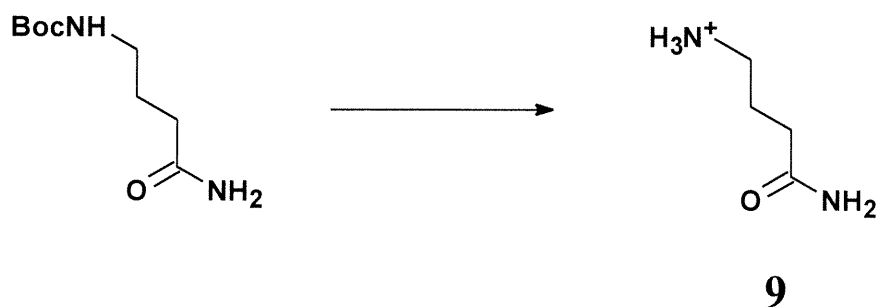
Le composé Boc-acide 4-aminobutyrate de p-nitrophényle (**5**) (350 mg, 1,08 mmole) a été dissout dans du dichlorométhane. De l'ammoniac (NH₃) gazeux, généré à partir de l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) et du chlorure d'ammonium (NH₄Cl), a été "barbotté" dans le milieu réactionnel jusqu'à ce que la réaction soit complète (environ 24 heures). La réaction a été suivie par ccm (99:1 acétate d'éthyle:acide acétique). Le solvant a été évaporé et le résidu a été dissout dans un minimum de chloroforme. Une chromatographie "flash" avec un éluant 99:1 acétate d'éthyle:acide acétique a été réalisée. Les fractions contenant le produit désiré ont été regroupées et le solvant, évaporé. Le résidu ainsi obtenu a été lavé avec du n-propanol et laissé sur la pompe à vide pour une nuit. Un solide jaune pâle a été obtenu (198 mg, 91 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,44 (s, 9H), 1,81 (qu, J = 6,5 Hz, 2H), 2,28 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 3,19 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 4,88 (br s, 1H), 5,84 (br s, 1H), 6,41 (br s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 26,22, 28,31, 32,71, 39,60, 79,43, 156,54, 175,41.

p.f. 125 °C.

SM (M + H)⁺ calc. 203,13957, obtenu 203,13870.

4-aminobutyramide (**9**)

Le composé Boc-4-aminobutyramide (**8**) (130 mg, 0,64 mmole) a été dissout dans le chloroforme. De l'acide chlorhydrique (HCl), généré à partir de l'acide sulfurique (H₂SO₄) et du chlorure d'ammonium (NH₄Cl), a été "barbotté" dans le milieu réactionnel pour 1 heure. La solution est laissée sous agitation pour la nuit. Une filtration sous vide a permis d'obtenir un solide jaune pâle (89 mg, 100 %).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1,90 (qu, J = 7,2 Hz, 2H), 2,37 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 2,96 (t, J = 7,3 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ 24,29, 32,87, 40,29, 178,02.

p.f. 98-100 °C.

SM (M + H)⁺ calc. 103,08714, obtenu 103,08680.

7.2. Études cinétiques impliquant les composés synthétisés

7.2.1 Matériel

Les composés contenant un lien ester activé ont été dissouts dans des solvants organiques achetés aux endroits indiqués à la section 2.4. Le tampon MOPS et la glycyglycine ont été achetés chez Sigma. Le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide a été synthétisé selon un protocole déjà établi (59). Des cuvettes de 1,5 mL jetables achetées chez Bio-Rad ont été utilisées pour les tests cinétiques. L'enzyme a été purifiée selon un protocole établi impliquant une digestion à la papaine (achetée chez Sigma) (3) à une activité spécifique de 837 U/mg avec une concentration de 0,026 mg/mL.

Les mesures d'absorbance ont été prises, pour les tests d'activité enzymatiques, sur un spectrophotomètre Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 et pour les tests cinétiques, sur un Cary 100 Bio. Le pH a été ajusté avec un pH-mètre Accumet modèle 15 et une électrode "microprobe extralong calomel". Les données cinétiques ont été obtenues par analyse de régression non-linéaire avec le logiciel Axum 4.0 en utilisant la formule $v = (V_{max} * Sub)/(K + Sub)$ pour les courbes de type Michaelis-Menten, où v est la vitesse initiale obtenue, V_{max} , la vitesse maximale, Sub , la concentration de substrat et K , la constante de Michaelis. Les paramètres du modèle sont $V_{max} = 10$, $K = 1$.

7.2.2 Méthode

7.2.2.1 Composés contenant un lien ester activé

Les composés contenant un lien ester activé ont été fraîchement dissouts dans un solvant organique. L'acétate de *p*-nitrophényle a été dissoute dans de l'acétonitrile, le butyrate de *p*-nitrophényle, dans 95 % d'éthanol, le glutarate de *p*-

nitrophényle, le 4-aminobutyrate de *p*-nitrophényle et le L- γ -isoglutamate de *p*-nitrophényle, dans le méthanol et le L- γ -glutamate de *p*-nitrophényle, dans le DMF pour faire des solutions-mères de 0,05 M. Le tampon utilisé est du 0,1 M MOPS pH 7,0. Les cinétiques ont été réalisées en présence de 20 mM glycylglycine comme substrat accepteur, de différentes concentrations d'un substrat donneur nommé plus haut (généralement entre 500 μ M et 1500 μ M) et de tampon pour un volume final de 1 mL dans une cuvette jetable. La réaction a été débutée par l'ajout de 0,051 U de GGT. L'activité spécifique de l'enzyme a été déterminée selon un protocole déjà établi (3), mais à pH 7,0. La libération du *p*-nitrophénolate a été suivie par spectrophotométrie visible à 402 nm. Après 10 minutes, la réaction a été arrêtée et la droite de l'absorbance en fonction du temps a été convertie en vitesse en utilisant le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 8470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à pH 7,0 à 402 nm. Des corrections ont été faites quant à l'effet du solvant sur la stabilité de l'enzyme en calculant la quantité de solvant organique présente dans les tests cinétiques et en faisant le test d'activité enzymatique avec la même quantité de ce solvant. L'activité enzymatique était généralement plus basse, mais le nombre d'unités durant chaque test était toujours le même.

7.2.2.2 Composés contenant un lien amide primaire

Les composés contenant un lien amide primaire ont été dissouts dans différents solvants. L'acétamide, le butyramide, la glutamine et la glutamine amide ont été solubilisés dans le tampon 0,1 M MOPS pH 7,0 afin de donner des solutions-mères de 0,1, 0,2, 0,025 et 0,1 M respectivement. Le 4-carboxybutyramide et le 4-aminobutyramide ont été solubilisés dans du méthanol pour donner une solution-mère de 0,255 et 0,4 M respectivement. La N-acétyl-glutamine a été dissoute dans un mélange de 19 % acétonitrile-tampon MOPS pour donner une solution-mère de 0,156 M. La présence de solvant organique ne doit pas dépasser 10 % du volume réactionnel, donc les trois derniers composés n'ont pas pu être testés à des concentrations aussi élevées que les premiers.

Les tests cinétiques ont été faits en présence de différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide (généralement entre 50 μ M et 1680 μ M), de 20 mM du substrat accepteur glycylglycine et d'une concentration fixe du composé contenant un lien amide primaire (inhibiteur) (généralement entre 0 et 100 mM) pour être complétés à 1 mL dans des cuvettes jetables avec du tampon 0,1 M MOPS pH 7,0. La réaction est débutée par l'ajout de 3,38 mU de GGT. Le suivi de la libération de la *p*-nitroaniline a été effectué à 410 nm avec un spectrophotomètre. Les mêmes tests ont été effectués en utilisant d'autres concentrations fixes d'inhibiteurs. Une valeur de 9200 M⁻¹cm⁻¹ pour le coefficient d'extinction molaire à pH 7,0 a été utilisée. Les valeurs des K_i ont été déterminées par des courbes de Lineweaver-Burk et/ou des courbes de Dixon tracées grâce au logiciel Axum 4.0. Les valeurs de K_M et V_{max} ont été déterminées comme indiqué à l'annexe 1. Les valeurs des coefficients d'extinction molaire ont été déterminées de la même manière que celle indiquée à la section 7.3.2.1, mais en présence de *p*-nitrophénol.

7.2.2.3 Études cinétiques à l'aide de la spectroscopie RMN

Des spectres RMN ¹H ont été pris à différents temps pour suivre la dégradation d'un composé dans un milieu aqueux. Ils ont permis de constater le bris du lien ester activé sans l'aide de l'enzyme. Les données spectrales qui suivent correspondent au produit final obtenu dans les cinétiques pour chacune des molécules testées après un certain temps. Plusieurs spectres RMN ¹H ont été pris dans cet intervalle de temps, mais aucun n'a permis de voir la formation d'un intermédiaire cinétique se dégradant pour donner le produit thermodynamique. Les spectres des composés de départ au temps zéro ont déjà été décrits dans la section 7.1.

Cinétique du composé 4-aminobutyrate de p-nitrophényle

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 2,09 (qu, J = 7,7 Hz, 2H), 2,32 (t, J = 8,1 Hz, 2H), 3,40 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 8,16 (d, J = 9,2 Hz, 2H) (**correspond aux spectres superposés du *p*-nitrophénol et du 2-pyrrolidinone**).

Cinétique du composé glutarate de p-nitrophényle

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 1,84 (qu, J = 7,0 Hz, 2H), 2,37 (t, J = 7,0 Hz, 4H), 6,97 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 8,19 (d, J = 9,2 Hz, 2H) (**correspond aux spectres superposés du p-nitrophénol et du glutarate**).

Cinétique du composé L-γ-glutamate de p-nitrophényle

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 2,16 (m, 1H), 2,38 (m, 2H), 2,51 (m, 1H), 4,37 (m, 1H), 6,92 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 8,12 (d, J = 9,1 Hz, 2H) (**correspond aux spectres superposés du p-nitrophénol et du pyroglutamate**).

Cinétique du composé L-γ-isoglutamate de p-nitrophényle

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 2,20 (m, 1H), 2,42 (m, 2H), 2,57 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 6,94 (d, J = 9,4 Hz, 2H), 8,14 (d, J = 9,4 Hz, 2H) (**correspond aux spectres superposés du p-nitrophénol et du pyroglutamide**).

7.3 Tests cinétiques pour les courbes de Eyring

7.3.1 Matériel

Tout le matériel utilisé a été acheté aux endroits indiqués dans les sections précédentes. Le tampon Tris a été acheté chez Bio-Rad. L'acide trichloroacétique provient de Anachemia, le sulfamate d'ammonium et le N-(1-naphtyl)éthylènediamine•2HCl ont été achetés chez Sigma et le nitrite de sodium provient de BDH.

7.3.2 Méthode

7.3.2.1 Courbes étalons pour la *p*-nitroaniline à pH 8,0

Le coefficient d'extinction molaire ϵ varie à chaque pH. Une solution-mère de 2,5 mM de *p*-nitroaniline dans le tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 est effectuée. La dissolution est aidée en chauffant sous l'eau chaude et en agitant très fréquemment avec le "vortex". Dans une cuvette jetable de 1,5 mL, différentes quantités de la solution-mère sont placées pour donner des concentrations de *p*-nitroaniline allant de 0 à 100 μ M. Le volume est complété à 1 mL avec du tampon. L'absorbance est prise à 25 °C à 410 nm sur le spectrophotomètre Cary. La partie linéaire de la courbe est utilisée et la pente donne la valeur du coefficient d'extinction molaire ϵ . Cette expérience a été effectuée en duplicata. La valeur obtenue à pH 8,0 est de 8580 M⁻¹ cm⁻¹ unité d'absorbance⁻¹.

7.3.2.2 Cinétiques avec le substrat donneur L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide

Une solution-mère 5 mM du substrat donneur L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide a été effectuée dans le tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. Différentes concentrations du substrat donneur (entre 67,2 μ M et 1680 μ M) ont été placées dans une cuvette jetable en plastique de 1,5 mL en présence de 20 mM du substrat accepteur glycyglycine et complétées à un volume final de 1 mL avec du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. Les cuvettes sont placées dans un spectrophotomètre Cary à la température indiquée durant au moins 10 minutes avant de débiter le test. Des ajustements de pH sont également nécessaires, car celui-ci varie en fonction de la température. Environ 4,1 mU de GGT (environ 4 μ L d'une dilution 10 X de la GGT purifiée) sont placées dans les cuvettes pour débiter les réactions. Une cuvette témoin ne contenant pas d'enzyme est présente pour chacune des concentrations du substrat donneur testé pour faire une correction pour l'hydrolyse chimique possible. La réaction est suivie pendant 15 minutes à 410 nm grâce à la libération de la *p*-nitroaniline. Des graphiques d'absorbance due à ce groupement en fonction du temps sont obtenus.

Les pentes (en unité d'absorbance par minute) sont corrigées en leur soustrayant les pentes des tests témoins (sans enzyme). Les pentes corrigées sont divisées par le coefficient d'extinction molaire ϵ et par la longueur de la cuvette (1 cm). Le résultat ainsi obtenu (en $M \text{ min}^{-1}$) représente une vitesse à une concentration précise du substrat donneur. Un graphique de type Michaelis-Menten est tracé avec toutes les valeurs obtenues à différentes concentrations du substrat donneur et les K_M et V_{\max} sont déterminés. Selon l'équation (10) de l'annexe 1, le k_{cat} est déterminé. Pour y arriver, la masse de l'enzyme présente dans la cuvette a été transformée en nombre de moles en utilisant une masse molaire de 68 000 Da pour la GGT (3). Les tests ont été effectués en utilisant le même nombre d'unités de GGT, mais celle-ci ne possédait pas la même activité spécifique, donc il est possible qu'une certaine partie de la masse d'enzyme présente dans une cuvette ne soit pas uniquement de l'enzyme active. Les résultats de k_{cat} ont donc été normalisés en les multipliant par une activité spécifique choisie pour la normalisation (ici, 837 U/mg) et en divisant le tout par l'activité spécifique de l'enzyme utilisée pour faire les tests cinétiques (varie d'une journée à l'autre). Ces valeurs normalisées ont été utilisées pour faire les courbes de Eyring selon l'équation (43) indiquée à l'annexe 1. Toutes les courbes ont été effectuées avec le logiciel Axum 4.0. La stabilité de l'enzyme à différentes températures a été vérifiée sur une période de 30 minutes en laissant incuber l'enzyme à une température précise et en effectuant des tests d'activité à un intervalle de 5-10 minutes.

7.3.2.3 Cinétiques avec les substrats donneurs L- γ -glutamyl-*p*-méthoxyanilide et L- γ -glutamylanilide

Une solution-mère 5 mM du substrat donneur testé dans du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 est effectuée. Pour chaque concentration de substrat donneur étudiée, un tube réactionnel est réalisé de la manière suivante : une quantité provenant de la solution-mère du substrat donneur est placée dans un tube à essai et du tampon 0,1 M Tris-HCl est ajouté pour compléter le volume à 1 mL. Ensuite, un mL d'une solution-mère 0,1 M glycylglycine est ajouté. Un volume de (3 mL - quantité

d'enzyme) de tampon est ajouté. Ce tube réactionnel est placé à la température désirée pendant 10 minutes avant de commencer la réaction. Celle-ci est débutée par l'ajout d'environ 5 mU de GGT (correspond à environ 4 μL d'une dilution 10 X de GGT purifiée). Pour les tubes dont la concentration de substrat donneur est de 2 ou 3 mM, celui-ci est ajouté à l'état solide, et non pas à partir de la solution-mère. Il y a habituellement 6 concentrations différentes de substrat donneur testées en même temps.

À différents temps (0, 5, 10, 15, 25, 35, 45 et 60 minutes), un aliquot de 375 μL est prélevé du tube réactionnel et placé dans un autre tube contenant 125 μL de l'acide trichloroacétique 40 % (solution dans l'eau) pour arrêter la réaction. Il y a donc, pour chaque concentration de substrat donneur, 8 aliquots prélevés. La diazotation peut alors être effectuée. Un volume de 125 μL de nitrite de sodium (solution de 4 mg/mL dans l'eau, fraîche du jour) est ajouté et il faut attendre 3 minutes. Ensuite, un volume de 125 μL de sulfamate d'ammonium (20 mg/mL dans l'eau) est ajouté et il faut attendre 2 minutes. Enfin, un volume de 250 μL de N-(1-naphtyl)éthylènediamine \cdot 2HCl (1,5 mg/mL dans l'éthanol, à garder à 4 °C dans une bouteille opaque) est ajouté et il faut attendre un certain temps. Celui-ci est 15 minutes à la température de la pièce pour le substrat donneur L- γ -glutamylanilide et 30 minutes à 37 °C pour le substrat donneur L- γ -glutamyl-*p*-méthoxyanilide. Les mesures d'absorbance sont prises à 560 nm pour le premier, et à 583 nm pour le second.

Avec les aliquots ainsi prélevés à différents temps, il est possible d'obtenir des graphiques d'absorbance en fonction du temps. Les pentes (en unités d'absorbance min^{-1}) sont divisées par la valeur du coefficient d'extinction molaire ϵ (45 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ unité d'absorbance $^{-1}$ pour le L- γ -glutamylanilide et 15 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ unité d'absorbance $^{-1}$ pour le L- γ -glutamyl-*p*-méthoxyanilide) pour donner une vitesse en M min^{-1} . Puisque l'absorbance est due à un aliquot de 375 μL dilué dans un volume final de 1 mL au cours de la coloration, la vitesse est divisée par 0,375 mL pour ramener à la vitesse réelle due à l'aliquot (représentatif du tube réactionnel). Par la

suite, ces vitesses sont utilisées pour faire des courbes de type Michaelis-Menten. Le traitement cinétique des données est le même que celui pour le substrat donneur L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide indiqué à la section 7.3.2.2.

7.4 Études cinétiques pour la courbe de van't Hoff

7.4.1 Matériel

En plus du matériel déjà énuméré plus tôt, différents tampons ont été utilisés pour faire l'étude du pH. Le tampon MOPS ($pK = 7,2$) a été utilisé pour les pH 7,0 et 7,5, le tampon Tris ($pK = 8,1$) a été utilisé pour les pH 8,0, 8,5, 8,75 et 9,0 et le tampon CHES ($pK = 9,3$), achetés chez Sigma, a été utilisé pour les pH 9,25 et 9,5. Tous les tampons ont été utilisés à une concentration de 0,1 M.

7.4.2 Méthode

7.4.2.1 Courbes étalons pour la *p*-nitroaniline à différents pH

La méthode donnée à la section 7.3.2.1 est celle utilisée pour déterminer les valeurs des coefficients d'extinction molaire ϵ . Cependant, les solutions-mères et les cuvettes ont été complétées avec le tampon donné à la section 7.4.1 pour avoir le bon pH final. Les valeurs obtenues sont résumées au tableau V.

Tableau V Valeurs des coefficients d'extinction molaire déterminés à différents pH dans différents tampons

pH de la solution réactionnelle	Valeur du coefficient d'extinction molaire ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$ unité d'absorbance $^{-1}$)
7,00	8110
7,50	8310
8,00	8580
8,50	8570
8,75	8390
9,00	8120
9,25	8790
9,50	8640

7.4.2.2 Études cinétiques à différents pH et températures

Les études cinétiques effectuées dans le cadre de la courbe d'Eyring à la section 7.3.2.2 sont les mêmes que celles effectuées pour la courbe de van't Hoff. Cependant, le pH des solutions-mères effectuées varie selon le pH à étudier. Les concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide testées étaient entre 200 et 3980 μM . Encore une fois, il faut préincuber les milieux réactionnels à la température désirée pendant au moins 10 minutes. Les calculs à réaliser sont les mêmes, mais il faut utiliser le coefficient d'extinction molaire ϵ correspondant au pH étudié. Avec les valeurs de vitesses initiales obtenues, des courbes Lineweaver-Burk, expliquées à l'annexe 1, sont effectuées. Sur un même graphique, les expériences faites à une même température, mais à différents pH, sont indiquées. L'axe des Y est l'inverse des vitesses initiales, en $\min \mu M^{-1}$, et l'axe des X est l'inverse de la concentration du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en μM^{-1} . Les pentes du graphique Lineweaver-Burk, en \min , sont placées en fonction de l'inverse de la concentration de protons, en M^{-1} . L'abscisse à l'origine correspond au pK_a recherché. La courbe de van't Hoff est tracée en plaçant le $\log K_a$ en fonction de l'inverse de la température, en K^{-1} . La pente correspond à $\Delta H R^{-1}$. Un exemple des types de graphiques obtenus se retrouve à l'annexe 1 et dans la section 5.2.

Références

1. Voet, D. et Voet, J. G. (1995) *Biochemistry*, John Wiley and Sons Inc, New York.
2. Pelmont, J. (1993) *Enzymes*, Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble.
3. Tate, S. S. et Meister, A. (1985) *Methods Enzymol.* 113, 400-419.
4. Marathe, G. V., Nash, B., Haschemeyer, R. H. et Tate, S. S. (1979) *FEBS Lett.* 107, 436-440.
5. Tate, S. S., Ross, L. L. et Meister, A. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1447-1449.
6. Jankásková, B., Lisy, V. et Stastny, F. (1992) *Int. J. Devl. Neuroscience* 10, 225-230.
7. Tate, S. S. et Meister, A. (1981) *Mol. Cell. Biochem.* 39, 357-368.
8. Novogrodsky, A., Tate, S. S. et Meister, A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2414-2418.
9. Marathe, G. V., Damle, N. S., Haschemeyer, R. H. et Tate, S. S. (1980) *FEBS Lett.* 115, 273-277.
10. DeLap, L. W., Tate, S. S. et Meister, A. (1977) *Life Sciences* 20, 673-680.
11. Meister, A. (1973) *Science* 180, 33-39.
12. Taniguchi, N. et Ikeda, Y. (1998) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 239-278.
13. Paolicchi, A., Tongiani, R., Tonarelli, P., Comporti, M. et Pompella, A. (1997) *Free Radical Biology & Medicine* 22, 853-860.
14. Del Bello, B., Paolicchi, A., Comporti, M., Pompella, A. et Maellaro, E. (1999) *FASEB J.* 13, 69-79.
15. Sian, J., Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Jenner, P. et Marsden, C. D. (1994) *Annals of Neurology* 36, 356-361.
16. Anderson, M. E., Allison, R. D. et Meister, A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1088-1091.
17. Matsuda, Y., Tsuji, A. et Katunuma, N. (1983) *J. Biochem.* 93, 1427-1433.
18. Ikeda, Y., Funjii, J., Taniguchi, N. et Meister, A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 126-130.

19. Kuno, T., Matsuda, Y. et Katunuma, N. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 114, 889-895.
20. Kuno, T., Matsuda, Y. et Katunuma, N. (1984) *Biochemistry International* 8, 581-588.
21. Ikeda, Y., Funjii, J. et Taniguchi, N. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 3980-3985.
22. Elce, J. S. (1980) *Biochem. J.* 185, 473-481.
23. Smith, T. K. et Meister, A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 12476-12480.
24. Allison, R. D. et Meister, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 256, 2988-2992.
25. McIntyre, T. M. et Curthoys, N. P. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6499-6504.
26. Orłowski, M. et Meister, A. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 73, 679-681.
27. Laursen, T. et Jacyszyn, K. (1968) *Clinica Chimica Acta* 21, 497-499.
28. Thompson, G. A. et Meister, A. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6792-6798.
29. Ikeda, Y., Funjii, J., Taniguchi, N. et Meister, A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 12471-12475.
30. Inoue, M., Horiuchi, S. et Morino, Y. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 82, 1183-1188.
31. Kozac, E. M. et Tate, S. S. (1980) *FEBS Lett.* 122, 175-178.
32. Schasteen, C. S., Curthoys, N. P. et Reed, D. J. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 112, 564-570.
33. Stole, E., Smith, T. K., Manning, J. M. et Meister, A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 21435-21439.
34. Ikeda, Y., Funjii, J., Anderson, M. E., Taniguchi, N. et Meister, A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 22223-22228.
35. Tate, S. S. et Meister, A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4806-4809.
36. Ikeda, Y., Funjii, J. et Taniguchi, N. (1996) *J. Biochem.* 119, 1166-1170.
37. Tate, S. S. et Meister, A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 931-935.
38. Meister, A., Tate, S. S. et Griffith, O. W. (1981) *Methods Enzymol.* 77, 237-253.
39. Allison, R. D. (1985) *Methods Enzymol.* 113, 419-437.
40. Gololobov, M. Y. et Bateman, R. C. Jr. (1994) *Biochem. J.* 304, 869-876.
41. Cook, N. D., Upperton, K. P., Challis, B. C. et Peters, T. J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 914, 240-245.

42. Griffith, O. W. et Meister, A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3330-3334.
43. Gagnon, P. Développement d'une nouvelle méthode de synthèse peptidique et études d'affinité d'une transglutaminase avec de nouveaux substrats fabriqués à l'aide de cette méthode. *Mémoire de maîtrise, Université de Montréal 2000*
44. Tate, S. S. et Meister, A. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 3329-3333.
45. Thompson, G. A. et Meister, A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2956-2960.
46. Gardell, S. J. et Tate, S. S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4942-4945.
47. Ménard, A., Rivard, C. et Keillor, J.W. (2000) *Étude de l'étape d'acylation des dérivés γ -glutamylanilides-p-substitués catalysée par la GGT* (Observations non-publiées)
48. Roupioz, Y. et Keillor, J.W. (1997) *Méthode de dosage discontinue des anilines par diazotation* (Observations non-publiées)
49. Lowry, T. H. et Richardson, K. S. (1987) *Mechanism and Theory in Organic Chemistry* (Berger, L. S. et MacElree, Eds.)) pp 143-159, Harper and Row, New York, NY.
50. Laidler, K. J. et Peterman, B. F. (1979) *Methods Enzymol.* 63, 234-257.
51. Jencks, W. P. (1969) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, U.S.A.
52. Snoke, J. E. et Neurath, H. (1950) *J. Biol. Chem.* 182, 577-584.
53. Ménard, A., Caporicci, N. et Keillor, J.W. (1999) *Étude de l'effet du pH sur la transpeptidation par la GGT de dérivés L- γ -glutamylanilides p-substitués* (Observations non-publiées)
54. Cook, N. D. et Peters, T. J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 832, 142-147.
55. Tipton, K. F. et Dixon, H. B. F. (1979) *Methods Enzymol.* 63, 183-234.
56. PetitClerc, C., Schiele, F., Bagrel, D., Mahassen, A. et Siest, G. (1980) *Clin. Chem.* 26, 1688-1693.
57. Karkowsky, A. M., Bergamini, M. V. W. et Orłowski, M. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4736-4743.
58. Kiuchi, K., Nagatsu, T., Togari, A. et Kumagai, H. (1986) *Journal of Chromatography* 357, 191-198.
59. Lindsay, H. et Whitaker, J. F. (1975) *Org. Proc. Prep. Int.* 89-91.

60. Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, W.H.Freemann and Company, U.S.A.
61. Piskiewicz, D. (1977) *Kinetics of Chemical and Enzyme-Catalyzed Reaction*, Oxford University Press Inc, USA.

Annexe 1

Concepts cinétiques

1. Équation de Michaelis-Menten (1)

Une réaction enzymatique typique est représentée par le modèle suivant :



où

E : enzyme libre

S : substrat

ES : complexe enzyme-substrat

P : produit libéré

k : constantes de vitesse

Le complexe enzyme-substrat se décompose pour former le produit et régénérer l'enzyme libre. La vitesse de formation v du produit P est donnée par l'équation (1) :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad (1)$$

La concentration du complexe enzyme-substrat est, quant à elle, définie par sa vitesse de formation et sa vitesse de dégradation indiquée à l'équation (2) :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] \quad (2)$$

Il est préférable de faire quelques approximations, car il est impossible de dériver cette équation.

1.1 Approximation de l'équilibre

Il est possible de supposer que la dissociation du substrat à l'enzyme se fait plus rapidement que la dégradation du complexe enzyme-substrat, c'est-à-dire que $k_{-1} \gg k_2$. Alors, la constante de dissociation K_S est représentée par l'équation (3) :

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (3)$$

1.2 Approximation de l'état stationnaire

Au début d'une réaction enzymatique, la concentration du complexe enzyme-substrat augmente jusqu'à atteindre un niveau où sa formation se fait à la même vitesse que sa dégradation. Ce niveau s'appelle état stationnaire. Les vitesses de réaction sont normalement mesurées durant cette période. Après cette période, le substrat s'épuise et n'est plus présent à des concentrations saturantes pour l'enzyme (l'enzyme ne fonctionne pas à sa vitesse maximale). De plus, il est possible que les vitesses de formation et de dégradation du complexe enzyme-substrat ne soient plus les mêmes. Il est donc préférable de prendre les données de vitesse initiale dans les premiers 10 % de la réaction. De plus, dans cette période, la quantité de substrat utilisé est négligeable par rapport à la quantité initiale de substrat, donc la concentration de substrat est considérée comme constante. Il est donc possible, avec cette approximation, de poser les équations (4) et (5):

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1 [E][S] - k_2 [ES] - k_{-1} [ES] \quad (4)$$

$$\frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (5)$$

Selon l'équation (3), K_S est remplacé par $(k_2 + k_{-1})/k_1$, donc il y a la constante k_2 qui a été ajoutée. L'ensemble de constantes de vitesse peut être remplacé par la constante de Michaelis, K_M , dans l'équation (6):

$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (6)$$

Donc, si $k_{-1} \gg k_2$, l'expression de K_M va être ramenée à celle de l'équation (3) pour K_S .

Cependant, toutes ces équations ont le défaut d'utiliser les paramètres $[E]$ et $[ES]$. Il est préférable d'utiliser une quantité mesurable dans les études cinétiques. L'équation (7) doit donc être posée :

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (7)$$

En combinant les équations (5), (6) et (7) citées plus haut et en résolvant pour $[ES]$, l'équation (8) est obtenue :

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

L'équation (1) peut donc être réécrite, ce qui donne l'équation (9) :

$$v = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

La vitesse maximale d'une réaction, V_{\max} , est atteinte lorsque toute l'enzyme est saturée en substrat, donc lorsqu'elle est entièrement sous forme de complexe enzyme-substrat ES. L'équation (1) peut donc être réécrite, ce qui donne l'équation (10) :

$$V_{\max} = k_2 [E]_T \quad (10)$$

Les équations (9) et (10) peuvent être combinées et donner l'équation (11), appelée équation de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

L'équation (11) est représentée par une courbe hyperbolique. Pour trouver expérimentalement les valeurs K_M et V_{max} , cette courbe doit être tracée. Le K_M représente la concentration de substrat nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale. Il représente également l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Ainsi, plus sa valeur est faible, plus l'affinité est grande, plus la reconnaissance est efficace. Il faut dire cependant qu'il y a une différence entre le K_M , influencé par la vitesse de dégradation du complexe enzyme-substrat, et le K_S , véritable mesure de l'affinité. Puisque les approximations ont été faites, la majorité des études cinétiques utilise les valeurs de K_M . Le V_{max} , quant à lui, correspond à la valeur de l'asymptote d'une courbe hyperbolique. La figure 29 représente une courbe correspondant à l'équation Michaelis-Menten.

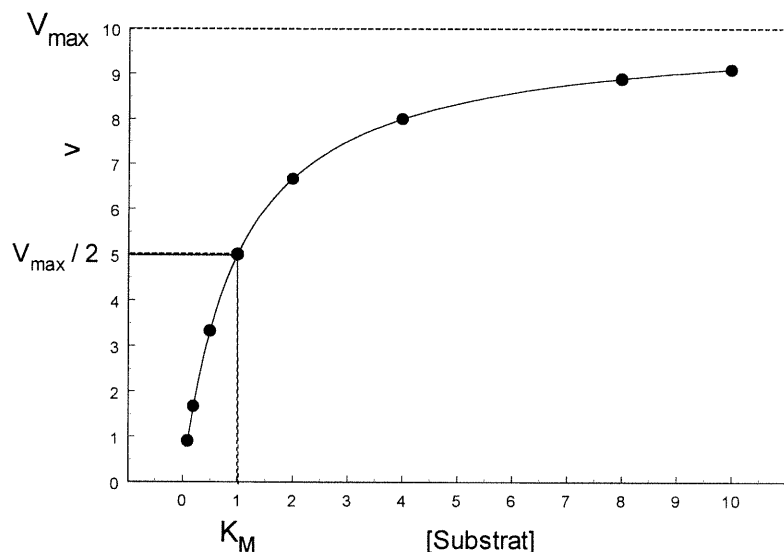


Figure 29 : Courbe de saturation correspondant à l'équation Michaelis-Menten. Les valeurs de K_M et V_{max} sont déterminées expérimentalement comme indiqué.

Une autre courbe permettant de déterminer les valeurs de K_M et V_{max} est celle de Lineweaver-Burk où l'inverse de la vitesse est placée en fonction de l'inverse de la concentration de substrat. Une courbe typique est indiquée à la figure 30.

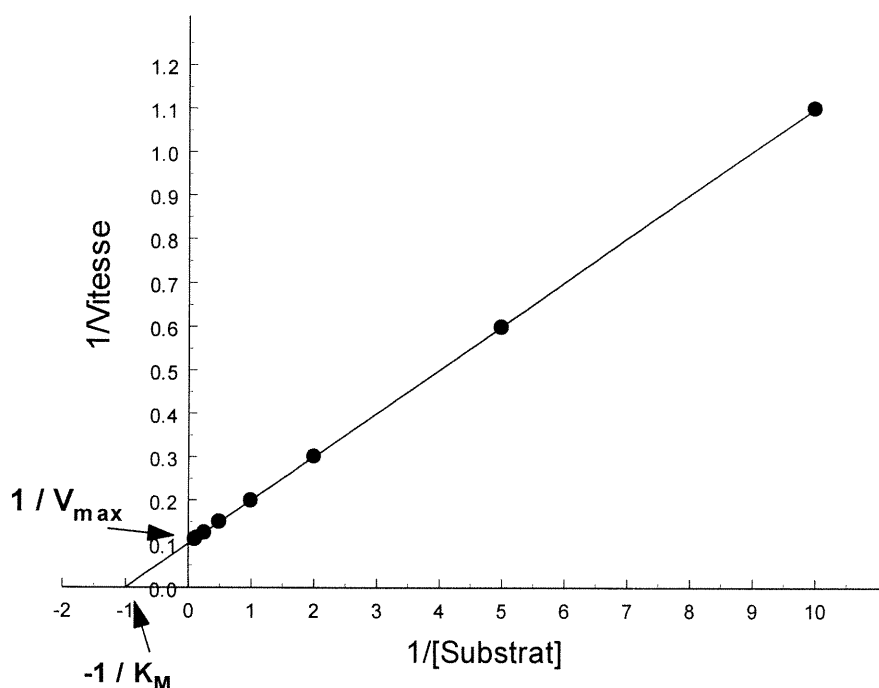


Figure 30 : Courbe de type Lineweaver-Burk. Les valeurs de K_M et V_{max} sont déterminées expérimentalement comme indiqué.

2. Mécanisme ping-pong modifié (1,39)

Les enzymes agissant comme des transférases n'impliquent habituellement pas seulement un substrat. Comme il a été vu pour la GGT, un substrat donneur fournit une portion γ -glutamyle qui sera transférée sur un substrat accepteur. Il existe des réactions où tous les substrats doivent se lier avant que les produits ne soient libérés : il s'agit alors de réactions séquentielles. La liaison des substrats peut alors se faire au hasard ou dans un ordre bien précis. Dans le cas de la GGT, un produit est libéré avant que tous les substrats ne soient liés à l'enzyme. Le mécanisme est alors de type ping-pong. La figure 31 représente les différentes réactions réalisées dans le mécanisme ping-pong modifié de la GGT.

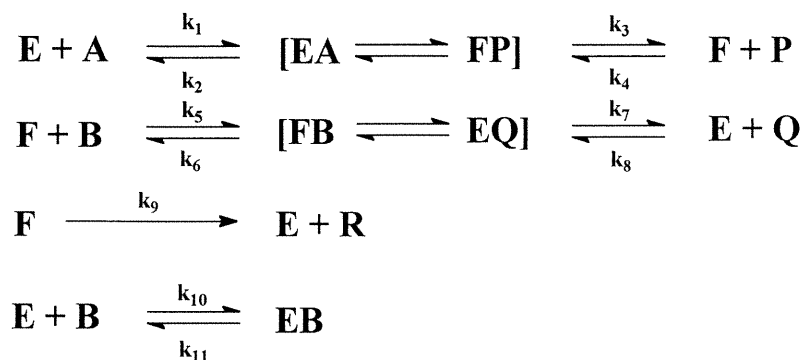


Figure 31 : Réactions catalysées par la GGT dans le cadre d'un mécanisme ping-pong modifié. A et B sont les substrats donneur et accepteur respectivement. P, Q et R sont les produits libérés au cours des réactions. E est la forme libre de l'enzyme, alors que F est la forme liée à la portion γ -glutamyle. k est la constante de vitesse d'une réaction.

Ainsi, selon la figure 31, les substrats A et B ne se retrouvent jamais ensemble sur la GGT. De plus, à la suite de la liaison d'un substrat à l'enzyme, il y a un changement de conformation indiqué entre crochets. Ce changement de conformation est habituellement très rapide et difficile à mesurer. Ainsi, aucune constante de vitesse n'est indiquée sur les flèches d'équilibre. De plus, il est assez rare qu'un changement de ce type influence la vitesse globale d'une réaction, malgré le fait que des phénomènes d'allostérie, dont l'hémoglobine est un excellent exemple, soient dus à des conformations précises d'une enzyme (1). Il faut également remarquer que la réaction irréversible représente l'hydrolyse de la forme intermédiaire de l'enzyme pour libérer, dans le cas de la GGT, le glutamate. L'enzyme peut également se lier au substrat accepteur, mais il y a alors inhibition de la liaison du substrat donneur.

Ce mécanisme est représenté par une équation de vitesse représentée ici :

$$v = \frac{V_h[A] (1 + [B]/K_{iab})}{K_h (1 + [B]/K_i) (1 + [B]/K_{iab}) + [A] (1 + [B]/K_b)} \quad (12)$$

dont les paramètres cinétiques sont définis comme suit :

$$\begin{aligned}
 V_h & : \text{Vitesse maximale pour l'hydrolyse} & = k_3 k_9 (E_{\text{tot}}) / (k_3 + k_9) \\
 V_b & : \text{Vitesse maximale pour le transfert} & = k_3 k_7 (E_{\text{tot}}) / (k_3 + k_7) \\
 K_h & : \text{Constante de Michaelis pour le donneur} & = k_9 (k_2 + k_3) / k_1 (k_3 + k_9) \\
 K_i & : \text{Constante d'inhibition de l'accepteur} & = k_{11} / k_{10} \\
 K_b & : \text{Constante de Michaelis pour l'accepteur} & = (k_6 + k_7) (k_3 + k_9) / k_5 (k_3 + k_7) \\
 K_{iab} & : \text{Constante de partition} & = K_b V_h / V_b = k_9 (k_6 + k_7) / k_5 k_7
 \end{aligned}$$

Pendant, il est possible de choisir les conditions réactionnelles pour que l'hydrolyse soit minimale. De plus, la concentration de l'accepteur est essentiellement constante, donc cela peut simplifier l'équation de la vitesse.

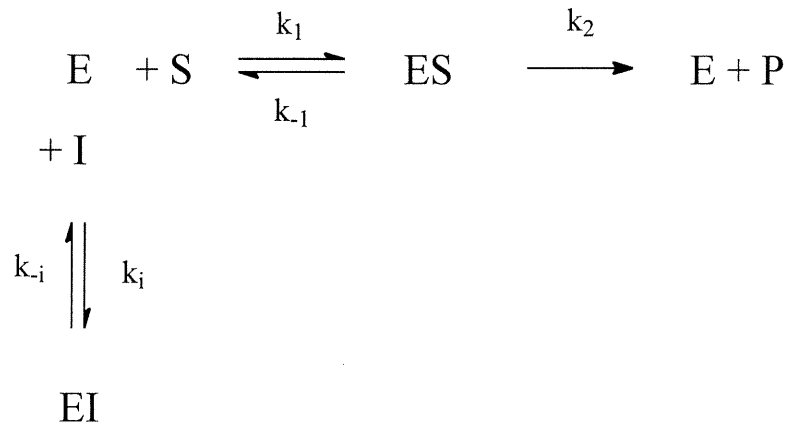
3. Inhibition réversible d'une enzyme (60)

Une enzyme peut réagir avec un composé chimique (inhibiteur) et s'y lier de manière irréversible ou réversible. Une liaison covalente peut se créer entre les deux entités, mais il peut également s'agir d'une reconnaissance par interactions électrostatiques.

Les inhibitions réversibles sont assez courantes chez les enzymes. Il en existe trois types : inhibitions compétitive, incompétitive et non-compétitive. Les équations qui suivent permettent de voir l'effet de l'inhibiteur sur la constante d'affinité K_M et la vitesse maximale V_{max} .

3.1 Inhibition compétitive

Une inhibition compétitive est vue lorsqu'une enzyme libre peut se lier à son substrat ou à un inhibiteur. Les deux molécules compétitionnent pour le même site actif de l'enzyme. Souvent, cette situation est vue lorsque l'inhibiteur possède une structure analogue à celle du substrat. Le modèle de Michaelis-Menten est donc le suivant :



Le complexe EI ne forme pas de produit. En utilisant encore l'approximation de l'état stationnaire (concentrations des complexes EI et ES constantes au cours de la réaction), il est possible d'écrire quelques équations :

$$K_i = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]} = \frac{k_{-i}}{k_i} \quad (13)$$

$$[\text{E}]_T = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}] \quad (14)$$

$$v = \frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2 [\text{ES}] \quad (15)$$

Il faut donc exprimer la vitesse en fonction de [ES]. Puisqu'il y a approximation de l'état stationnaire, il est possible d'écrire :

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = 0 = k_1 [\text{E}][\text{S}] - k_2 [\text{ES}] - k_{-1} [\text{ES}] \quad (16)$$

L'équation (5) réécrite pour [E] donne l'équation (17) :

$$[\text{E}] = \frac{(k_{-1} + k_2) [\text{ES}]}{k_1 [\text{S}]} \quad (17)$$

En utilisant les équations (13) et (17), l'équation (18) donne :

$$[EI] = \frac{[E][I]}{K_i} = \frac{(k_{-1} + k_2) [ES] [I]}{k_1 [S] K_i} \quad (18)$$

L'équation (14) est donc réécrite pour donner les équations (19) et (20):

$$[E]_T = [ES] + \frac{(k_{-1} + k_2) [ES]}{k_1 [S]} + \frac{(k_{-1} + k_2) [ES] [I]}{k_1 [S] K_i} \quad (19)$$

$$[ES] = \frac{[E]_T}{1 + \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1 [S]} + \frac{(k_{-1} + k_2) [I]}{k_1 [S] K_i}} \quad (20)$$

L'équation (20) substituée dans l'équation (15) donne :

$$v = \frac{k_2 [E]_T}{1 + \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1 [S]} (1 + [I]/K_i)} \quad (21)$$

ou

$$v = \frac{k_2 [E]_T [S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} (1 + [I]/K_i)} \quad (22)$$

Avec les équations (6) et (10), l'équation (23) est celle de Michaelis-Menten modifiée.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M (1 + [I]/K_i)} \quad (23)$$

Il est possible de tirer quelques conclusions de cette équation :

1. La présence de I n'affecte pas le V_{\max} .
2. De fortes concentrations de substrat peuvent rendre négligeable l'effet de l'inhibiteur.
3. Le K_M est plus grand en présence d'un inhibiteur, car il faut plus de substrat pour saturer l'enzyme. Il est appelé K_M apparent ou K_M^{app} .

La figure 32 représente une courbe Lineweaver-Burk avec une inhibition compétitive.

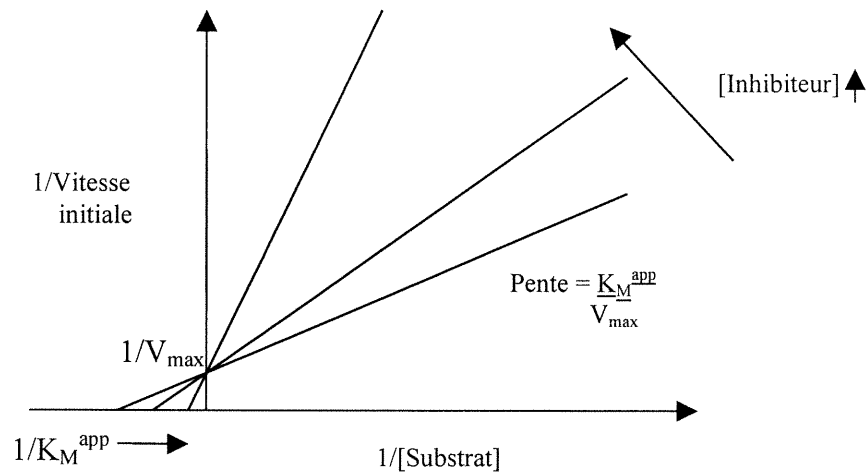


Figure 32 : Allure de la courbe Lineweaver-Burk pour une inhibition compétitive.

Pour déterminer la valeur de K_i , il faut utiliser les pentes des courbes de Lineweaver-Burk et placer les valeurs en fonction de la concentration d'inhibiteur selon les équations (24) et (25).

$$\text{Pente} = \frac{K_M^{\text{app}}}{V_{\text{max}}} = \frac{K_M}{V_{\text{max}}} (1 + [I]/K_i) \quad (24)$$

$$\text{Pente} = \frac{K_M}{V_{\text{max}}} + \frac{K_M [I]}{V_{\text{max}} K_i} \quad (25)$$

Le graphique obtenu, appelé courbe secondaire de la courbe Lineweaver-Burk, est indiqué à la figure 33.

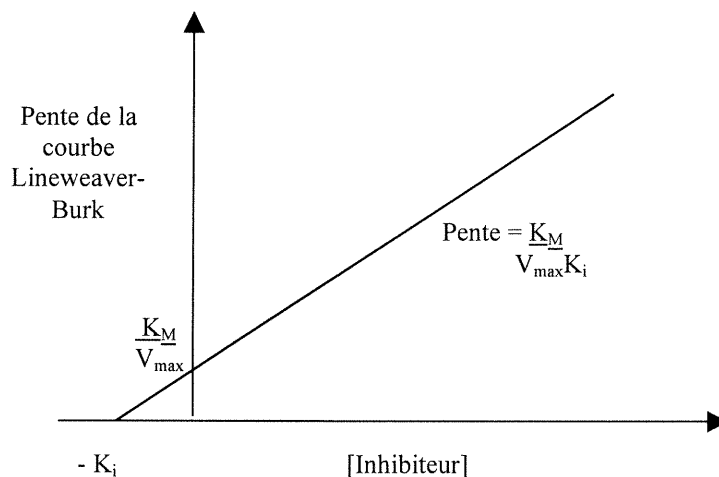


Figure 33 : Courbe secondaire de la courbe Lineweaver-Burk permettant de déterminer la valeur du K_i .

Une autre courbe, la courbe de Dixon, permet d'arriver au même résultat. Cette courbe ressemble beaucoup à la courbe de Lineweaver-Burk, mais elle est formée à partir d'un réarrangement de l'équation (23).

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{(1 + [I])}{K_i} \frac{K_M}{V_{\max} [S]} \quad (26)$$

Un exemple typique de la courbe de Dixon est indiqué à la figure 34.

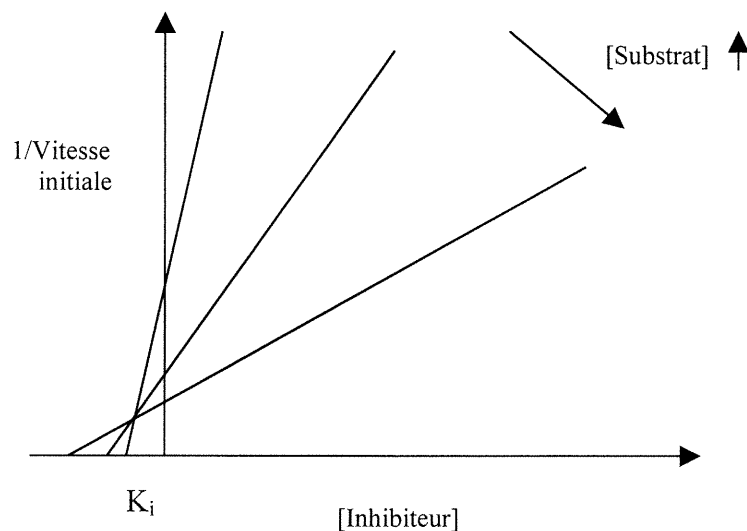
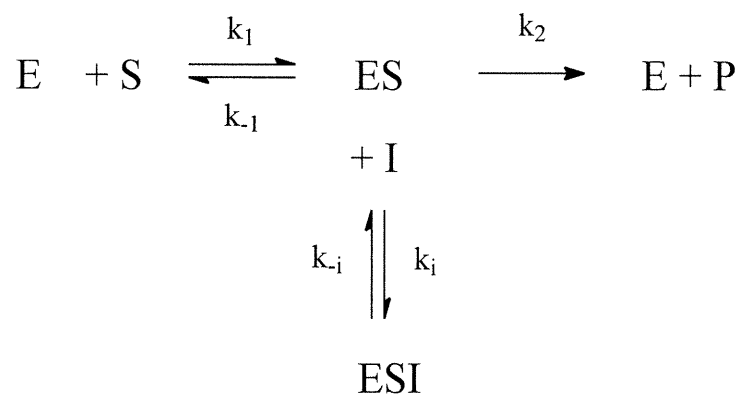


Figure 34 : Courbe typique de Dixon. L'intersection des droites donne la valeur du K_i .

3.2 Inhibition incompétitive

Contrairement à l'inhibition compétitive, l'inhibiteur se fixe, au cours de l'inhibition incompétitive, à l'enzyme déjà liée au substrat (le complexe enzyme-substrat). Ainsi, le modèle représentant cette situation est le suivant :



Ici, le complexe ESI ne peut pas mener à la formation de produit. Les équations permettant de voir les effets sur le K_M et le V_{max} sont les suivantes :

$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (27)$$

$$[E]_T = [E] + [ES] + [ESI] \quad (28)$$

En utilisant le même type de démarche mathématique que pour l'inhibition compétitive, les équations (17), (24) et (25) sont réécrites pour donner :

$$[E]_T = \frac{(k_2 + k_{-1}) [ES]}{k_1 [S]} + [ES] + \frac{[ES][I]}{K_i} \quad (29)$$

$$[ES] = \frac{[E]_T}{1 + \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1 [S]} + \frac{[I]}{K_i}} \quad (30)$$

$$v = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_T}{1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1 [S]}} = \frac{k_2 [E]_T [S]}{(1 + [I]/K_i) [S] + \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1}} \quad (31)$$

$$v = \frac{[S]V_{max}/(1 + [I]/K_i)}{[S] + K_M/(1 + [I]/K_i)} \quad (32)$$

De cette équation, certaines conclusions peuvent être tirées :

1. Les paramètres K_M et V_{max} sont diminués par le même facteur, $(1 + [I]/K_i)$.
2. Le V_{max} diminue, car la concentration du complexe ES diminue à la suite de la liaison avec l'inhibiteur.
3. Le K_M diminue (l'affinité semble meilleure entre l'enzyme et le substrat).
Puisque le complexe ES disparaît rapidement, l'équilibre est poussé vers sa formation, ce qui favorise la liaison entre l'enzyme et le substrat.

La courbe typique de Lineweaver-Burk pour cette inhibition est indiquée à la figure 35.

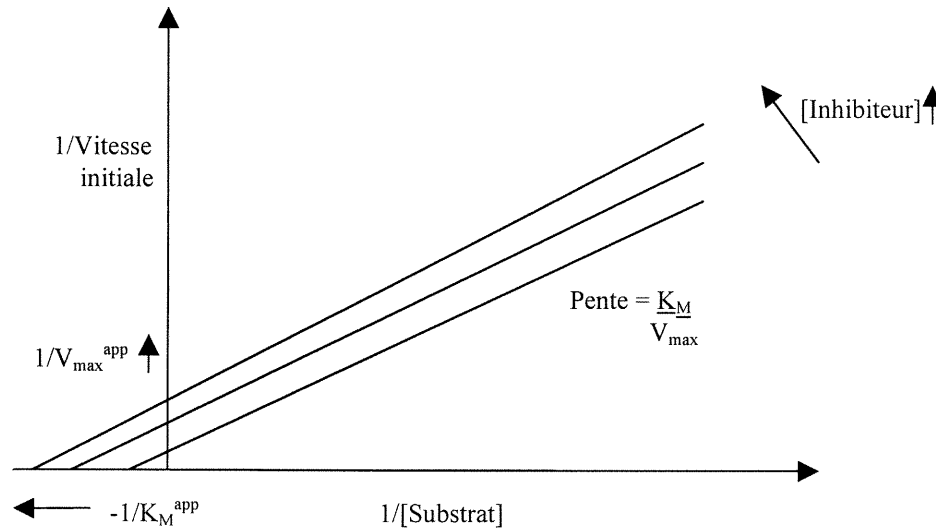
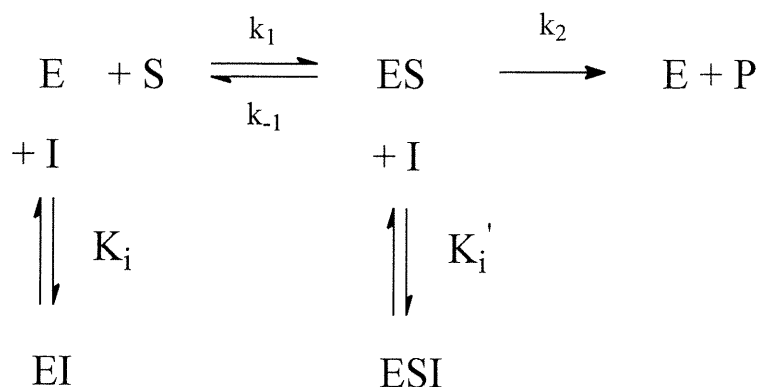


Figure 35 : Courbe typique de Lineweaver-Burk pour l'inhibition incompétitive.

Puisque les pentes ne varient pas (K_M et V_{max} sont divisées par le même facteur), il est impossible de déterminer la valeur de K_i par la courbe secondaire présentée pour l'inhibition compétitive. Il faut faire des calculs à partir de l'équation de Michaelis-Menten modifiée en sachant que les différentes valeurs de V_{max} obtenues à différentes concentrations d'inhibiteur varient toutes entre elles par le facteur $(1 + [I]/K_i)$. Le même calcul peut être fait à partir des valeurs de K_M .

3.3 Inhibition non-compétitive

Ce type d'inhibition regroupe les inhibitions compétitive et incompétitive selon le modèle suivant :



Ici, les constantes d'équilibre sont K_i pour la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme libre et K_i' pour sa liaison au complexe enzyme-substrat. Ainsi, si K_i est très grand comparé à K_i' , l'inhibition semblera incompétitive, alors que K_i' comparé à K_i donnera une inhibition qui semble compétitive.

Les mêmes calculs que pour les inhibitions précédentes peuvent être faits, mais l'équation de vitesse résultante contiendra les modifications vues précédemment pour les inhibitions compétitive et incompétitive.

$$v = \frac{V_{\max} [S] / (1 + [I]/K_i)}{[S] + K_M (1 + [I]/K_i) (1 + [I]/K_i)} \quad (33)$$

L'équation (33) peut se simplifier, selon la grandeur des constantes d'équilibre.

3.3.1 Inhibition non-compétitive simple

Lorsque les deux constantes d'équilibre K_i et K_i' sont identiques, des simplifications sont faites et donnent l'équation (34) :

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{([S] + K_M) (1 + [I]/K_i)} \quad (34)$$

Ainsi, le K_M n'est pas affecté par l'inhibiteur, mais le V_{\max} l'est. Un graphique typique de Lineweaver-Burk est indiqué à la figure 36.

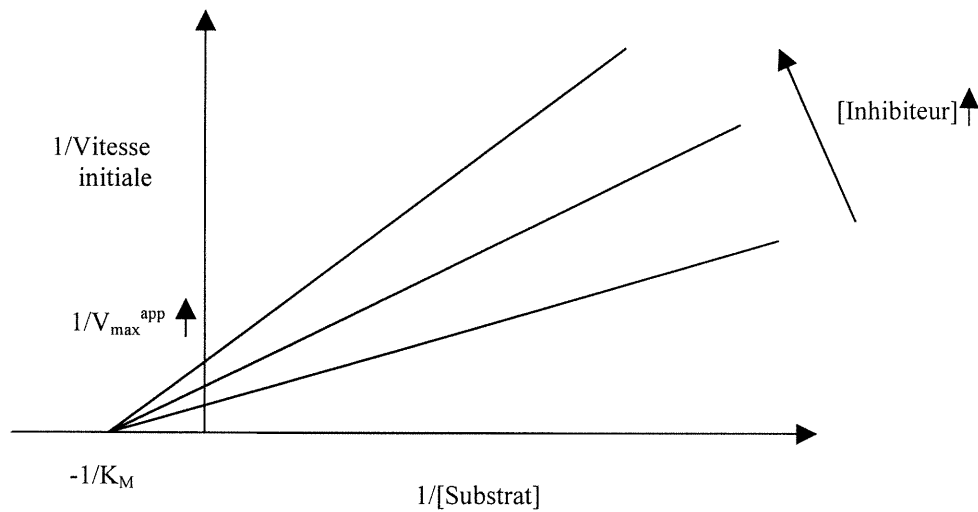


Figure 36 : Courbe typique de Lineweaver-Burk pour l'inhibition non-compétitive simple.

Pour déterminer le K_i , il faut faire une courbe de Dixon, comme il a été montré précédemment dans le cas de l'inhibition compétitive.

3.3.2 Inhibition non-compétitive mixte

Il est également possible que les deux constantes d'équilibre ne soient pas égales. Dans le cas où $K_i < K_i'$, il semble y avoir un peu plus d'inhibition compétitive. La courbe Lineweaver-Burk ressemble alors à la courbe typique indiquée à la figure 37.

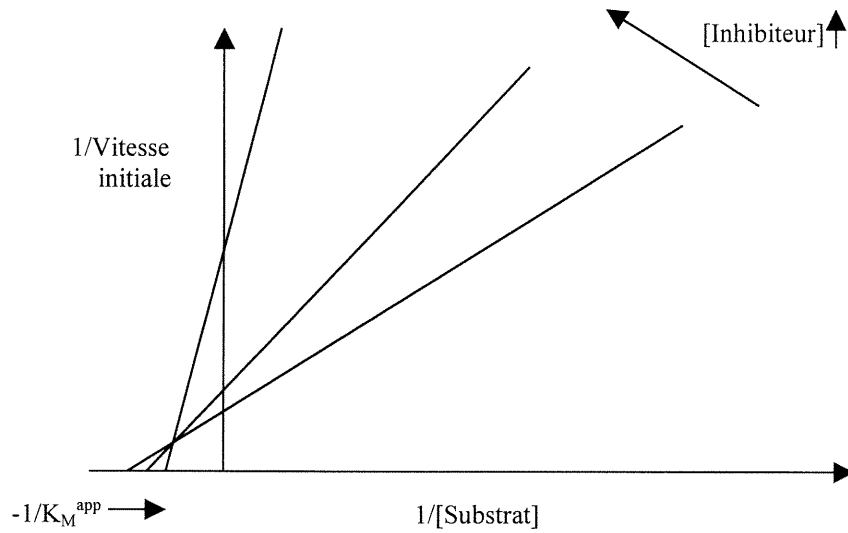


Figure 37 : Courbe typique Lineweaver-Burk pour l'inhibition non-compétitive mixte lorsque $K_i < K_i'$.

Dans le cas où $K_i' < K_i$, l'inhibition ressemble plutôt à l'inhibition incompétitive. Le graphique Lineweaver-Burk obtenu est celui représenté à la figure 38.

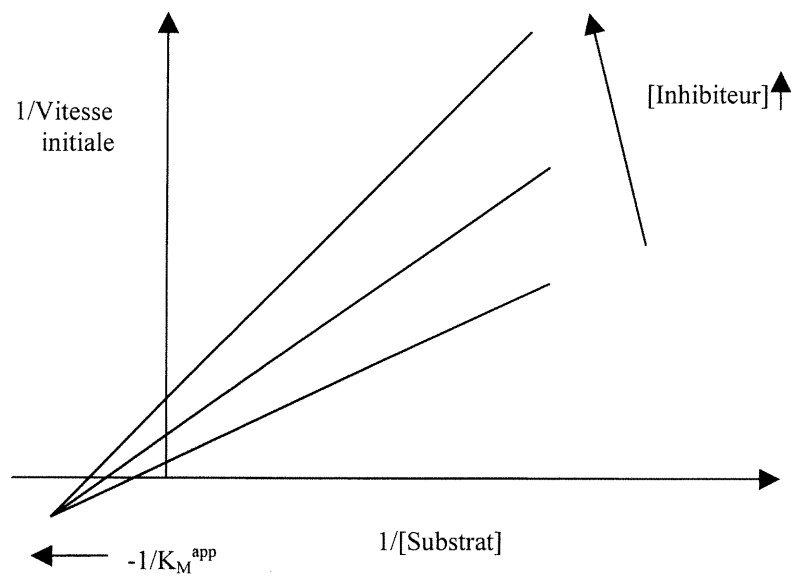


Figure 38 : Courbe Lineweaver-Burk pour l'inhibition non-compétitive mixte lorsque $K_i' < K_i$.

4. Théorie de l'état de transition (51, 49)

Selon Eyring, la vitesse d'une réaction est proportionnelle à la concentration du complexe activé présent à l'état de transition. Le modèle suivant peut être posé :



Il est possible d'écrire les équations suivantes :

$$K^\ddagger = \frac{[A \cdot B^\ddagger]}{[A][B]} \quad (35)$$

$$v = k^\ddagger [A \cdot B^\ddagger] = k^\ddagger K^\ddagger [A][B] \quad (36)$$

Donc, la constante de vitesse observée, k_{obs} , est

$$k_{\text{obs}} = k^\ddagger K^\ddagger \quad (37)$$

En supposant que le complexe activé se décompose à la vitesse d'une fréquence de vibration, l'équation (38) peut être écrite :

$$k^\ddagger = \frac{k_B T}{h} \quad (38)$$

où k_B est la constante de Boltzmann ($k_B = 3,298 \times 10^{-24}$ cal K^{-1}), T est la température en Kelvin et h est la constante de Planck ($h = 1,583 \times 10^{-34}$ cal s).

Les autres équations utiles sont les suivantes :

$$\Delta G = -RT \ln K_{\text{éq}} \quad (39)$$

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger \quad (40)$$

$$K^\ddagger = e^{(-\Delta G^\ddagger/RT)} \quad (41)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (42)$$

où R est la constante des gaz parfaits ($R = 1,987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

Donc, en utilisant les équations (37), (38) et (41), l'équation (43) est obtenue :

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_B T}{h} e^{(-\Delta G^\ddagger/RT)} \quad (43)$$

et peut être transformée, avec l'équation (42) pour donner

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_B T}{h} e^{[(-\Delta H^\ddagger/RT) + (\Delta S^\ddagger/R)]} \quad (44)$$

La forme linéaire de l'équation (44) est :

$$\boxed{\text{Ln}[(k_{\text{obs}}h)/(k_B T)] = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \quad (45)$$

L'équation (45) est l'équation d'Eyring, utilisée pour tracer le graphique de la figure 39.

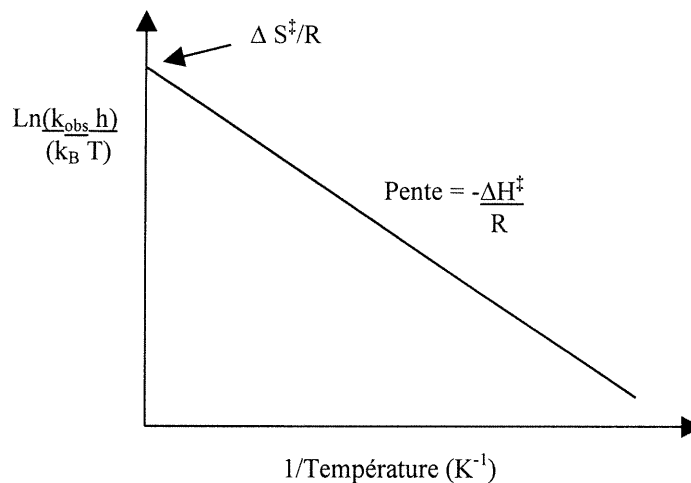
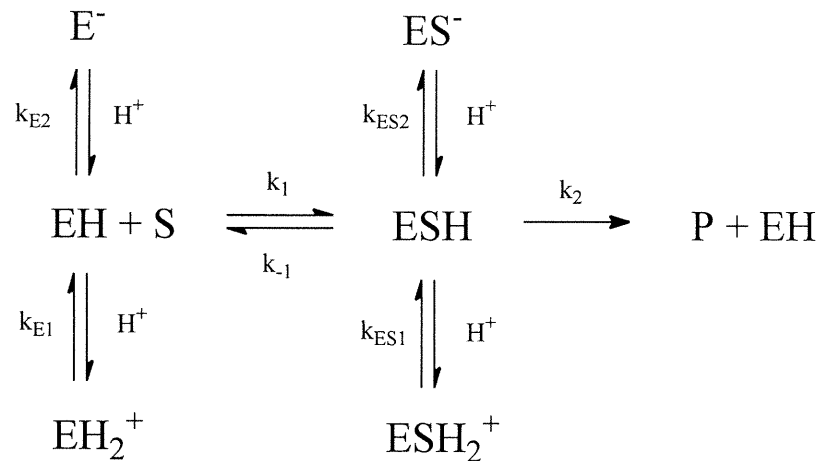


Figure 39 : Graphique de Eyring selon l'équation (45).

5. Le profil pH-vitesse d'une enzyme (1,61)

Le profil pH-vitesse en forme de cloche souvent observé avec les enzymes peut être expliqué avec le modèle suivant :



Si l'enzyme n'est pas dans le bon état de protonation, le produit ne pourra pas être formé. L'équation de vitesse correspondant à ce modèle est :

$$v = \frac{V_{\max}' [S]}{K_M' + [S]} \quad (46)$$

où

$$V_{\max}' = \frac{V_{\max}}{\frac{[H^+]}{k_{ES1}} + 1 + \frac{k_{ES2}}{[H^+]}} \quad (46a)$$

$$K_M' = K_M \left[\frac{\frac{[H^+]}{k_{E1}} + 1 + \frac{k_{E2}}{[H^+]}}{\frac{[H^+]}{k_{ES1}} + 1 + \frac{k_{ES2}}{[H^+]}} \right] \quad (46b)$$

6. Détermination du pK_a à partir des courbes Lineweaver-Burk

Selon le modèle proposé à la section précédente, les valeurs des pK_a peuvent être déterminées en plaçant la vitesse en fonction de la concentration de protons. Cependant, il existe d'autres méthodes pour arriver au même résultat. Celle à partir des courbes Lineweaver-Burk permet de voir l'effet du pH sur une forme précise de l'enzyme (libre ou complexée avec le substrat). Cette méthode considère le proton comme un activateur ou un inhibiteur de la réaction. Une courbe Lineweaver-Burk est tracée, mais à différents pH. Un graphique typique est indiqué à la figure 40.

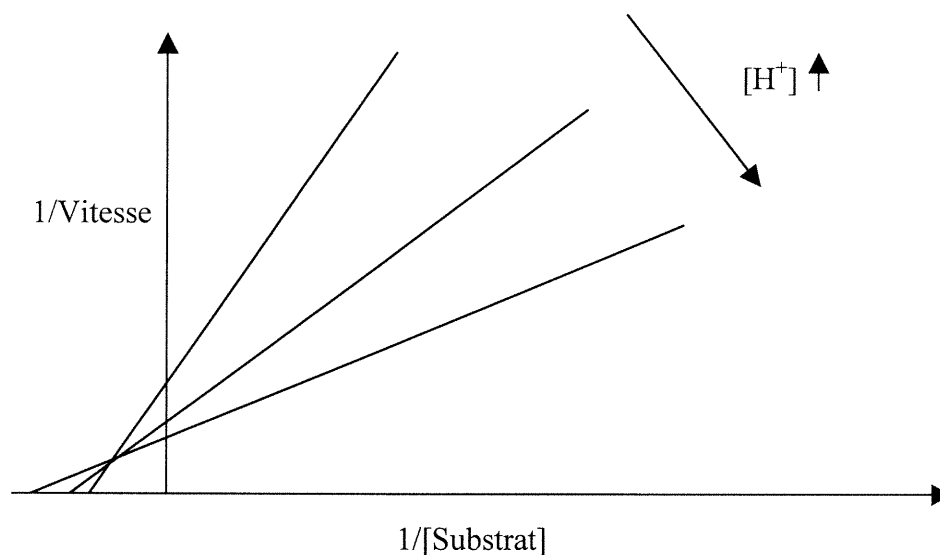


Figure 40 : Graphique de Lineweaver-Burk montrant l'effet inhibiteur des protons.

Cette courbe a été tracée pour des concentrations croissantes de protons menant à une diminution graduelle de la vitesse réactionnelle et correspond donc à des pH caractérisant le côté décroissant d'un profil pH en forme de cloche. Pour les pH formant le côté ascendant dans un profil en forme de cloche, le graphique Lineweaver-Burk est similaire, mais la concentration des protons doit diminuer, et non augmenter, comme il est indiqué à la figure 40. Le type de graphique obtenu permet de supposer l'effet du proton sur l'enzyme. En effet, la figure 40 montre, selon la section 3 de cette annexe, qu'il y a une inhibition non-compétitive mixte.

Cela indique donc que le proton impliqué dans la catalyse de l'enzyme se lie à l'enzyme libre et au complexe enzyme-substrat.

Les pentes de chacune des droites tracées sont utilisées pour obtenir un graphique secondaire. L'axe des X est l'inverse de la concentration de protons et l'axe des Y, la pente provenant du graphique Lineweaver-Burk. L'abscisse à l'origine donne l'inverse négatif du K_a , d'où il est facile d'obtenir la valeur désirée du pK_a par la relation $pK_a = -\log(K_a)$. Un graphique typique obtenu à partir de la figure 40 est indiqué à la figure 41.

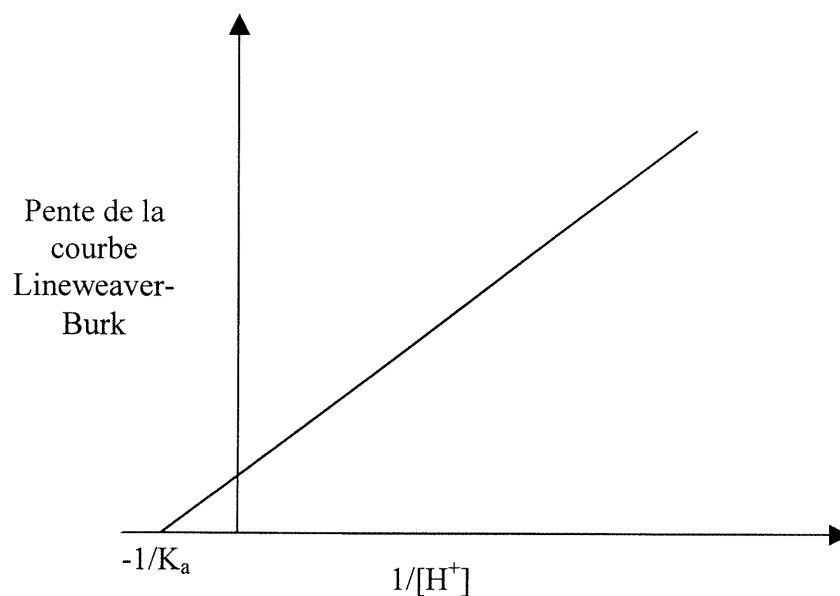


Figure 41 : Courbe secondaire du graphique Lineweaver-Burk menant à la détermination de la valeur du K_a .

L'utilisation des courbes Lineweaver-Burk et des courbes secondaires en découlant permet de voir l'effet du proton comme un activateur ou un inhibiteur. De plus, un phénomène de coopérativité complexe est facilement détecté, car des courbes seraient obtenues, et non pas des droites.

Annexe 2

Tableaux de constantes cinétiques

Tableau VI Constante de Michaelis (K_M) et vitesse maximale (V_{max}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine et de différentes concentrations de l'inhibiteur 4-carboxybutyramide sous certaines conditions réactionnelles

Concentration de l'inhibiteur (mM)	K_M (μ M)	V_{max} (μ M/min)
0	297 \pm 52	4,08 \pm 0,24
5	175 \pm 32	2,96 \pm 0,16
10	184 \pm 33	2,42 \pm 0,13
15	161 \pm 34	1,80 \pm 0,11

Tableau VII : Constante de Michaelis (K_M) et vitesse maximale (V_{max}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine et de différentes concentrations de l'inhibiteur 4-aminobutyramide sous certaines conditions réactionnelles

Concentration de l'inhibiteur (mM)	K_M (μ M)	V_{max} (μ M/min)
0	273 \pm 46	3,79 \pm 0,22
10	160 \pm 31	2,71 \pm 0,14
20	131 \pm 25	2,14 \pm 0,10
25	204 \pm 29	1,86 \pm 0,08
35	89 \pm 4	1,17 \pm 0,01

Tableau VIII Constante de Michaelis (K_M) et vitesse maximale (V_{max}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine et de différentes concentrations de l'inhibiteur glutamine sous certaines conditions réactionnelles

Concentration de l'inhibiteur (mM)	K_M (μ M)	V_{max} (μ M/min)
0	273 \pm 78	3,74 \pm 0,31
0,43	462 \pm 61	4,37 \pm 0,21
1	489 \pm 59	4,06 \pm 0,21
2	606 \pm 138	4,06 \pm 0,42
5	1073 \pm 214	4,68 \pm 0,52
7,5	882 \pm 195	3,85 \pm 0,31

Tableau IX Constante de Michaelis (K_M) et vitesse maximale (V_{max}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine et de différentes concentrations de l'inhibiteur glutamine amide sous certaines conditions réactionnelles

Concentration de l'inhibiteur (mM)	K_M (μ M)	V_{max} (μ M/min)
0	342 \pm 57	4,13 \pm 0,19
1	482 \pm 133	4,61 \pm 0,48
2,5	341 \pm 72	3,65 \pm 0,19
5	540 \pm 74	4,42 \pm 0,19
7,5	462 \pm 91	3,84 \pm 0,29
10	567 \pm 67	3,74 \pm 0,19

Tableau X Constante de Michaelis (K_M) et vitesse maximale (V_{max}) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de l'accepteur glycylglycine et de différentes concentrations de l'inhibiteur N-acétyl-glutamine sous certaines conditions réactionnelles

Concentration de l'inhibiteur (mM)	K_M (μ M)	V_{max} (μ M/min)
0	337 ± 67	$3,87 \pm 0,19$
50	450 ± 80	$3,87 \pm 0,19$
100	526 ± 75	$3,87 \pm 0,19$

Tableau XI Constante de vitesse normalisée ($k_{\text{cat}}^{\text{norm}}$) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-méthoxyanilide en présence de l'accepteur glycyglycine à différentes températures sous certaines conditions réactionnelles

Température (° C)	$k_{\text{cat}}^{\text{norm}}$ (s ⁻¹)
15	340,29
25	485,68
30	881,75
37	1231,99
40	1063,18

Tableau XII Constante de vitesse normalisée ($k_{\text{cat}}^{\text{norm}}$) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamylanilide en présence de l'accepteur glycyglycine à différentes températures sous certaines conditions réactionnelles

Température (° C)	$k_{\text{cat}}^{\text{norm}}$ (s ⁻¹)
15	189,50
25	362,95
30	439,90
37	571,14

Tableau XIII Constante de vitesse normalisée ($k_{\text{cat}}^{\text{norm}}$) pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence de l'accepteur glycyglycine à différentes températures sous certaines conditions réactionnelles

Température (° C)	$k_{\text{cat}}^{\text{norm}}$ (s ⁻¹)
15	408,41
25	687,07
30	829,28
37	1168,15
40	1205,31
50	1850,55

Tableau XIV Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 15 °C

Concentration en L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide (μ M)	Vitesse à pH 8,75 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,00 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,25 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,50 (μ M/min)
200	0,548	0,480	0,341	0,260
500	1,180	0,887	0,717	0,538
750	1,514	1,268	0,910	0,752
1500	1,943	1,564	1,217	0,932
2500	2,026	1,700	1,240	0,949
3980	2,086	1,687	1,274	0,868

Tableau XV Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 25 °C

Concentration en L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide (μ M)	Vitesse à pH 8,75 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,00 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,25 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,50 (μ M/min)
200	1,037	0,690	0,489	0,440
500	2,038	1,515	1,138	0,897
750	2,574	2,217	1,479	1,163
1500	3,337	2,660	2,059	1,522
2500	3,683	3,165	2,139	1,748
3980	3,480	3,190	2,150	1,591

Tableau XVI Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 30 °C

Concentration en L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide (μ M)	Vitesse à pH 8,75 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,00 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,25 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,50 (μ M/min)
200	1,299	0,924	0,683	0,486
500	2,610	2,007	1,456	0,972
750	3,325	2,512	1,945	1,395
1500	4,172	3,793	2,639	1,840
2500	4,338	4,126	2,776	1,968
3980	4,386	3,855	2,776	1,875

Tableau XVII Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 37 °C

Concentration en L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide (μ M)	Vitesse à pH 8,75 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,00 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,25 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,50 (μ M/min)
200	1,597	1,121	0,808	0,590
500	3,111	2,574	1,820	1,256
750	4,374	3,485	2,378	1,632
1500	5,650	4,951	3,231	2,245
2500	6,079	5,025	3,561	2,494
3980	5,912	5,542	3,572	2,338

Tableau XVIII Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 40 °C

Concentration en L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide (μ M)	Vitesse à pH 8,75 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,00 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,25 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,50 (μ M/min)
200	1,812	1,367	0,933	0,573
500	3,349	3,103	1,934	1,227
750	4,577	4,027	2,548	1,644
1500	6,198	5,357	3,572	2,274
2500	6,472	6,034	3,925	2,598
3980	6,424	5,739	4,448	2,390

Tableau XIX Valeurs des vitesses initiales déterminées à différentes concentrations de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, en présence de 20 mM glycylglycine, à différents pH à 50 °C

Concentration en L- γ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide (μ M)	Vitesse à pH 8,75 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,00 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,25 (μ M/min)	Vitesse à pH 9,50 (μ M/min)
200	1,788	1,367	0,853	0,451
500	4,029	3,128	1,411	0,874
750	4,768	4,298	2,150	1,100
1500	7,521	6,145	3,447	1,609
2500	8,236	7,167	3,743	1,962
3980	8,093	7,192	-	1,782