



Université de Montréal

**Inhibition réversible et photomarquage de la  
transglutaminase tissulaire**

par

Isabelle Roy

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

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

septembre, 2014

© Isabelle Roy, 2014

## Résumé

La transglutaminase tissulaire est une enzyme dépendante du calcium qui catalyse la formation de liens iso-peptidiques, entre les chaînes latérales de résidus glutamine et lysine, permettant, par le fait même, la réticulation des protéines dans les systèmes biologiques. Elle joue un rôle, entre autres, dans l'endocytose, la régulation du développement des cellules, et même dans l'apoptose.

Néanmoins, une dérégulation de l'activité biologique de cette enzyme peut entraîner différentes pathologies, comme la formation de cataractes, de plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer, ou encore peut mener au développement de la maladie céliaque.

C'est pourquoi une meilleure connaissance du mécanisme d'action de cette enzyme et la possibilité de réguler son action à l'aide de substrats ou d'inhibiteurs sont nécessaires.

Dans cette optique, une méthode d'expression et de purification de la transglutaminase humaine a été développée, permettant de travailler directement avec la cible pharmacologique désirée.

De plus, une étude du mode d'inhibition et de liaison d'une classe d'inhibiteurs réversibles précédemment découverte dans le groupe, soit la famille des trans-cinnamoyles, a permis d'identifier que la puissance de ces molécules est influencée par la présence du calcium et qu'une inhibition dépendante du temps est observée, en lien avec un potentiel d'équilibre conformationnel lent de la transglutaminase.

D'un autre côté, la susceptibilité à une attaque nucléophile par des thiols de cette classe de molécule rend leur potentiel pharmacologique grandement diminué, et c'est pourquoi une nouvelle famille de molécules a été identifiée, basée sur un squelette ynone, avec une valeur d'IC<sub>50</sub> très prometteuse de 2,6 µM, en faisant un des meilleurs inhibiteurs réversibles de la transglutaminase développés à ce jour.

Finalement, une stratégie de photomarquage jumelée à une analyse de spectrométrie de masse en tandem a été développée pour la découverte du site de liaison du substrat dérivé de la lysine, dans le but de mieux comprendre le mécanisme complexe de cette enzyme.

**Mots-clés** : enzyme, transglutaminase, cinétique enzymatique, inhibition, marquage.

## Abstract

Tissue transglutaminase is a calcium-dependent enzyme that catalyzes the formation of isopeptide bonds between the side chains of glutamine and lysine residues, thereby resulting in the crosslinking of proteins in biological systems. It plays a role, among others, in endocytosis, the regulation of cell growth, and even in apoptosis.

However, a deregulation of the biological activity of this enzyme can result in various pathologies, such as cataract formation, amyloid plaque formation in Alzheimer's disease, or the development of celiac disease.

Therefore, a better understanding of the mechanism of action of this enzyme and the ability to regulate its action using inhibitors or substrates is necessary.

In this context, a method of expression and purification of human transglutaminase has been developed, allowing one to work directly with the desired pharmacological target.

In addition, a study of the mode of inhibition and binding mode of a reversible inhibitor class previously discovered in the group, the family of trans-cinnamoyl derivatives, revealed that the potency of these molecules is influenced by the presence of calcium and a time-dependent inhibition is observed, related to a putative slow conformational equilibrium of transglutaminase.

On the other hand, the susceptibility of this class of molecules to nucleophilic attack by thiols greatly diminishes their pharmacological potential, and that is why a new family of molecules has been identified, based on a ynone skeleton, with a very promising  $IC_{50}$  value of 2.6  $\mu$ M, making this molecule one of the best transglutaminase reversible inhibitors developed to date.

Finally, a photolabelling strategy combined with a tandem mass spectrometry analysis has been developed for the discovery of the binding site of the lysine derivative substrate, in order to better understand the complex mechanism of this enzyme.

**Keywords** : enzyme, transglutaminase, enzyme kinetic, inhibition, labelling.

# Table des matières

Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. Les débuts de la chimie bio-organique.....	1
1.2. Les transglutaminases .....	3
1.2.1. TGase kératinocyte (TG1).....	3
1.2.2. TGase épidermale (TG3).....	4
1.2.3. TGase prostatique (TG4).....	5
1.2.4. TGase X (TG5). .....	5
1.2.5. TGase neuronale (TG6).....	5
1.2.6. TGase Z (TG7).....	6
1.2.7. TGase plasmatique (FXIII): .....	6
1.2.8. Pallidine (EP 4.2 ou bande 4.2). .....	6
1.3. La transglutaminase tissulaire (TG2) .....	6
1.3.1. Les différents rôles physiologiques. ....	8
1.3.2. Le mécanisme de la réaction enzymatique. ....	8
1.3.3. Les différents substrats reconnus.....	9
1.3.4. Les désordres physiologiques.....	10
1.3.4.1. Les maladies inflammatoires .....	11
1.3.4.2. Les maladies neurodégénératives .....	11
1.3.4.3. Les maladies auto-immunes .....	11
1.3.4.4. Les maladies néoplasiques .....	12
1.3.4.5. Autres maladies .....	12
1.3.5. Les inhibiteurs connus.....	12
1.3.5.1. Les inhibiteurs irréversibles .....	12
1.3.5.2. Les inhibiteurs réversibles .....	16
1.3.6. Aperçu du projet de recherche.....	19
1.3.6.1. Identification et schématisation du mode de liaison des inhibiteurs trans-cinnamoyle.....	19
1.3.6.2. Expression et purification de la TG2 humaine.....	20
1.3.6.3. La synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs réversibles.....	20

1.3.6.4. Études cinétiques approfondies du mode d'inhibition des inhibiteurs réversibles avec la TG2 .....	21
1.3.6.5. Identification du site de liaison du substrat accepteur .....	22
Chapitre 2 : La transglutaminase tissulaire : modèles, expression, purification et données cinétiques.....	24
2.1. L'importance des modèles .....	24
2.2. L'élaboration de modèles d'homologie pour la gpITG2.....	25
2.2.1. La TG2, une enzyme aux multiples personnalités .....	25
2.2.2. Construction et validation du modèle d'homologie de la forme fermée de la gpITG2 .....	31
2.2.3. Construction et validation du modèle d'homologie de la forme ouverte de la gpITG2.....	33
2.3. Expression recombinante et purification de la hTG2 .....	35
2.3.1. Mutagenèse dirigée du plasmide pG-TG pour modifier la nature du site de clivage .....	38
2.3.2. Optimisation des conditions d'expression à partir du plasmide pG-TG.....	41
2.3.3. Optimisation du clivage de la partie GST par la PSP .....	43
2.3.4. Évaluation de l'efficacité des conditions d'expression et de purification de la hTG2 à partir du plasmide pGST-PSP-hTG .....	44
2.3.5. Évaluation de la stabilité de la hTG2.....	47
2.3.6. Comparaison cinétique entre la hTG2 et la gpITG2 .....	48
2.4. Conclusion.....	50
Chapitre 3 : Synthèse d'inhibiteurs compétitifs réversibles de la TG2 .....	52
3.1. La genèse de la chimie médicinale : la découverte de la synthèse organique.....	52
3.2. La découverte d'inhibiteurs réversibles de la TG2.....	54
3.3. Développement de nouveaux inhibiteurs réversibles compétitifs de la TG2 .....	55
3.3.1. Vérification de l'importance de groupements nitro sur le pouvoir inhibitoire de la classe des triazoles .....	55
3.3.1.1. Synthèse de nouvelles molécules basées sur le squelette triazole .....	56
3.3.1.1.1. Diversification fonctionnelle de la partie trans-cinnamique.....	56

3.3.1.1.2. Analyse du pouvoir inhibitoire des molécules sans groupement nitro sur le fragment trans-cinnamique .....	58
3.3.1.1.3. Diversification fonctionnelle de la partie benzylique.....	59
3.3.1.1.4. Analyse du pouvoir inhibitoire des molécules sans groupement nitro sur le fragment benzyle .....	63
3.3.2. Susceptibilité du squelette trans-cinnamoyle à l'attaque des thiols .....	65
3.3.2.1. Vérification de la susceptibilité à l'attaque des thiols.....	65
3.3.2.2. Synthèse de nouvelles classes d'inhibiteurs permettant de diminuer la susceptibilité à l'attaque des thiols .....	68
3.3.2.2.1. Fonctionnalisation du carbone $\beta$ de la fonction trans-cinnamoyle .....	68
3.3.2.2.2. Utilisation de cycles afin de remplacer la liaison double du squelette trans-cinnamoyle .....	72
3.3.2.2.3. Utilisation d'un gabarit ynone en substitution à la fonction trans-cinnamoyle .....	75
3.3.2.3. Analyse du pouvoir inhibitoire des molécules visant à diminuer la susceptibilité à l'attaque par un thiol.....	77
3.3.2.3.1. Molécules de types benzotriazoles.....	77
3.3.2.3.2. Molécules dérivées d'une azachalcone .....	80
3.4. Conclusion .....	82
Chapitre 4 : Études cinétiques des inhibiteurs réversibles .....	84
4.1. Les fondements de la cinétique enzymatique .....	84
4.2. Approfondissement des connaissances cinétiques sur les inhibiteurs réversibles.....	86
4.2.1. Influence des inhibiteurs réversibles sur la liaison du calcium à l'enzyme .....	87
4.2.2. Dépendance en temps de l'inhibition .....	93
4.2.2.1. Vérification d'inhibition à liaison lente .....	94
4.3. Conclusion .....	100
Chapitre 5 : Identification de modes de liaison.....	102
5.1. Méthodes d'obtention de données structurales associées au mode de liaison de différents ligands .....	102
5.1.1. Choix du groupement photoactivable .....	104
5.2. Identification structurale du mode de liaison des inhibiteurs réversibles .....	105

5.2.1. Synthèse et utilisation d'un inhibiteur photoactivable .....	106
5.2.2. Identification des résidus marqués et modélisation moléculaire .....	108
5.2.3. Étude de la migration sur gel natif.....	112
5.2.4. Résultats préliminaires obtenus par électrophorèse capillaire .....	114
5.3. Identification structurale du mode de liaison du substrat accepteur .....	115
5.3.1. Développement d'un photomarqueur biotinylé .....	116
5.3.2. Optimisation des conditions d'irradiation.....	121
5.3.3. Validation de la stratégie de photomarquage.....	123
5.3.4. Tâches restant à accomplir .....	127
5.4. Conclusion .....	128
Chapitre 6 : Conclusion .....	131
Chapitre 7 : Partie expérimentale.....	136
7.1. Partie expérimentale du Chapitre 2 .....	136
7.1.1. Construction du modèle d'homologie de la forme ouverte de la gpITG2 .....	136
7.1.2. Construction du plasmide GST-PSP-hTG .....	137
7.1.2.1. Construction d'un insert de 2000 pb incluant le gène codant pour le site de reconnaissance nécessaire pour un clivage à la PSP.....	137
7.1.2.2. Assemblage du plasmide pGST-PSP-hTG .....	138
7.1.3. Protocole optimisé d'expression recombinante de la protéine fusion GST-hTG2 .....	140
7.1.4. Protocole optimisé pour la purification de la hTG2.....	140
7.1.5. Test de concentration de la hTG2 .....	141
7.1.6. Test d'activité pour la hTG2, basé sur la méthode AL5 .....	142
7.1.7. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la hTG2 .....	142
7.1.8. Caractérisation cinétique de la hTG2 .....	143
7.2. Partie expérimentale du Chapitre 3 .....	144
7.2.1. Synthèse .....	145
( <i>E</i> )-3-(4-aminophényl)-1-(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)prop-2-én-1-one ( <b>3.5</b> )...	145
<i>N</i> -(4-(( <i>E</i> )-3-(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)-3-oxoprop-1-ényl)phényl)acétamide ( <b>3.6</b> ) .....	146
4-(azidométhyl)benzoate de méthyle ( <b>3.7a</b> ) .....	147

Acide 4-(azidométhyl)benzoïque (3.8a) .....	148
4-(azidométhyl)benzènesulfonamide (3.9a) .....	149
4-((4-((E)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)méthyl)benzoate de méthyle (3.10) .....	150
Acide 4-((4-((E)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)méthyl) benzoïque (3.11).....	151
4-((4-((E)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)méthyl)benzène sulfonamide (3.12) .....	152
<i>N</i> -(4-((4-((E)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)méthyl)benzoyl)- <i>L</i> -leucinyll- <i>L</i> -prolinyl- <i>L</i> -phénylalanine (3.13) .....	153
Acide β-méthyl- <i>p</i> -nitrocinnamique (3.14).....	155
( <i>E/Z</i> )-β-méthyl- <i>p</i> -nitrocinnamoylbenzotriazolylamide (3.15) .....	156
( <i>E/Z</i> )-β-isopropyl- <i>p</i> -nitrocinnamoate d'éthyle (3.16 et 3.17) .....	157
Acide ( <i>E</i> )-β-isopropyl- <i>p</i> -nitrocinnamique (3.18) .....	159
Acide ( <i>Z</i> )-β-isopropyl- <i>p</i> -nitrocinnamique (3.19).....	160
( <i>E</i> )-β-isopropyl- <i>p</i> -nitrocinnamoylbenzotriazolylamide (3.20) .....	161
( <i>Z</i> )-β-isopropyl- <i>p</i> -nitrocinnamoylbenzotriazolylamide (3.21).....	162
Chlorure de 6-nitro-2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyle (3.23).....	163
6-nitro-2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-benzotriazolylamide (3.24) .....	164
trans-2-(3-nitrophényl)cyclopropyl(pyridin-3-yl)méthanone (3.25).....	165
3-(2-(3-nitrostyryl)oxiran-2-yl)pyridine (3.26) .....	166
3-(3-(3-nitrophényl)isoxazol-5-yl)pyridine (3.27).....	167
3-(4-nitrophényl)propylolate d'éthyle (3.29).....	168
Acide 3-(4-nitrophényl)propynoïque (3.28) .....	169
1-(1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,2,3]triazol-1-yl)-3-(4-nitrophényl)prop-2-yn-1-one (3.30) .....	170
<i>Z-p</i> -nitrocinnamoate d'éthyle (3.32) .....	171
Acide <i>Z-p</i> -nitrocinnamique (3.33).....	172
<i>Z-p</i> -nitrocinnamoylbenzotriazolylamide (3.34).....	173
7.2.2. Détermination des valeurs d'IC <sub>50</sub> pour les inhibiteurs compétitifs réversibles ..	174
7.2.3. Suivi cinétique de la réaction d'addition du GSH aux inhibiteur réversibles.....	174

7.2.4. Minimisation énergétique de l'adduit d'addition nucléophile.....	175
7.3. Partie expérimentale du Chapitre 4 .....	175
7.3.1. Détermination du profil cinétique entre l'inhibiteur et le calcium .....	176
7.3.2. Cinétiques d'inhibition à liaison lente .....	176
7.3.3. Cinétiques de retour à l'activité.....	177
7.4. Partie expérimentale du Chapitre 5 .....	177
7.4.1. Arrimage moléculaire en utilisant les modèles d'homologie de la gpITG2 ainsi que la molécule <b>1.19</b> .....	178
7.4.2. Électrophorèse sur gel en conditions non-dénaturantes .....	179
7.4.3. Synthèse .....	181
β- <i>tert</i> -butyl- <i>N</i> -fluorénylméthoxylocarbonyl- <i>N'</i> -(3-méthyl diazirin-3-ylméthyl)-L-aspartamide ( <b>5.9</b> ).....	181
<i>N</i> -α-fluorénylméthoxylocarbonyl- <i>N'</i> -(3-méthyl diazirin-3-ylméthyl)-L-aspartamide ( <b>5.10</b> ).....	182
Sel trifluoroacétate de <i>N</i> -( <i>S</i> -oxo-biotinyl)- <i>N'</i> -(3-méthyl diazirin-3-ylméthyl)-L-β-aspartamidyl-L-phénylalaninyl-L-lysinyglycinamide ( <b>5.11</b> ).....	183
7.4.4. Détermination du $K_M^{app}$ du substrat accepteur <b>5.11</b> .....	184
7.4.5. Suivi cinétique de la réaction d'irradiation de la fonction diazirine .....	184
7.4.6. Cinétique effet irradiation hTG2 .....	185
7.4.7. Photomarquage de la hTG2 utilisant la molécule <b>5.11</b> .....	185
Bibliographie .....	186

## Liste des tableaux

Tableau 1.1 Les différents types de transglutaminases de mammifères .....	4
Tableau 1.2 Différentes structures d'inhibiteurs irréversibles de la TG2 .....	14
Tableau 2.1 Analyse de la qualité des modèles d'homologie de la forme ouverte de la gpITG2 <sup>119</sup> .....	33
Tableau 2.2 Optimisation des conditions de clivage effectué sur colonne de la fusion GST-hTG2 par la PSP à 4 °C <sup>134</sup> .....	44
Tableau 2.3 Analyse de l'efficacité du protocole optimisé d'expression et de purification <sup>134</sup> .....	46
Tableau 2.4 Sommaire des méthodes d'expression et de purification de la hTG2 <sup>134</sup> .....	46
Tableau 2.5 Détermination des conditions optimales d'entreposage de la hTG2 .....	47
Tableau 2.6 Effet de la présence de co-solvant sur l'activité de la hTG2 <sup>134</sup> .....	47
Tableau 2.7 Comparaison cinétique entre la hTG2 et la gpITG2 <sup>134</sup> .....	49
Tableau 3.1 Comparaison, avec le dérivé nitré, d'IC <sub>50</sub> de molécules de la famille des triazoles sans groupement nitro sur la partie trans-cinnamique .....	59
Tableau 3.2 Comparaison, avec le dérivé nitré, d'IC <sub>50</sub> de molécules de la famille des triazoles sans groupement nitro sur la partie benzylique .....	64
Tableau 3.3 Comparaison des valeurs d'IC <sub>50</sub> des molécules liées au benzotriazole .....	78
Tableau 3.4 Comparaison du potentiel d'inhibition des diastéréoisomères <i>E</i> et <i>Z</i> du <i>p</i> -nitrocinnamoylbenzotriazolamide .....	80
Tableau 3.5 Comparaison des valeurs d'IC <sub>50</sub> des molécules dérivées d'une azachalcone.....	81
Tableau 4.1 Linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten .....	89
Tableau 4.2 Caractéristiques des différents profils d'inhibition.....	91
Tableau 5.1 Composition des échantillons préparés pour l'expérience de photomarquage utilisant un substrat accepteur photoactivable .....	123
Tableau 5.2 Analyse des résultats obtenus par spectrométrie de masse de la protéine entière .....	126

## Liste des figures

Figure 1.1 Structure tertiaire de la hTG2 <sup>37</sup> .....	7
Figure 1.2 Cycle catalytique de la TG2 de type « ping-pong modifié ».....	9
Figure 1.3 Structure cristalline de la hTG2 inhibée irréversiblement à l'aide d'une molécule de la classe des diazométhylcétones <sup>51</sup> .....	13
Figure 1.4 Inhibiteurs à liaison lente de la TG2 basés sur le squelette thiéno[2,3-d]pyrimidin-4-one acylhydrazyde.....	17
Figure 1.5 Structure de l'isatine.....	17
Figure 1.6 Inhibiteurs mixtes de la famille des 3-acylidène-2-oxoindoles.....	18
Figure 1.7 Inhibiteur compétitif obtenu par isolation d'un sous-produit de réaction.....	18
Figure 1.8 Conclusions tirées de l'étude structure-activité des dérivés trans-cinnamoyle <sup>116,117</sup> .....	19
Figure 1.9 Structure du photomarqueur développée sur la base du squelette trans-cinnamoyle.....	19
Figure 1.10 Mécanisme d'addition de thiol sur un dérivé trans-cinnamoyle.....	21
Figure 1.11 Inhibiteurs réversibles de la TG2 basés sur le squelette trans-cinnamoyle.....	22
Figure 2.1 Différentes structures cristallines de la TG2.....	26
Figure 2.2 Structure cristalline d'un mime de l'intermédiaire acyl-enzyme de la hTG2 <sup>51</sup> .....	28
Figure 2.3 Migration sur gel natif de différents conformères de la TG2 <sup>51,110</sup> .....	29
Figure 2.4 Inhibiteurs irréversibles de la hTG2 développés par la compagnie Zedira.....	30
Figure 2.5 Structure cristalline de différents inhibiteurs irréversibles liés à la hTG2.....	31
Figure 2.6 Comparaison du modèle d'homologie de la forme fermée de la gplTG2 avec la structure cristalline de la hTG2 (1KV3).....	32
Figure 2.7 Comparaison du modèle d'homologie de la forme ouverte de la gplTG2 retenu (#2) avec la structure cristalline de la hTG2 2Q3Z.....	34
Figure 2.8 Plasmide pG-TG présentant un site de clivage au FXa.....	37
Figure 2.9 Plasmide convoité suite à la mutagénèse dirigée du plasmide pG-TG.....	39
Figure 2.10 Identification des plasmides contenant la mutation désirée.....	40
Figure 2.11 Réaction liée au test d'activité AL5 impliquant la TG2.....	42

Figure 2.12 Optimisation des conditions d'expression de la fusion GST-hTG2 à l'aide du plasmide pG-TG <sup>134</sup> .....	43
Figure 2.13 Optimisation de la température d'induction pour l'expression, à l'aide du plasmide pGST-PSP-hTG, de la hTG2 obtenue après clivage complet de la GST <sup>134</sup> .....	45
Figure 2.14 Gel SDS-PAGE des différentes fractions recueillies lors la purification de la hTG2 dans les conditions optimales <sup>134</sup> .....	45
Figure 3.1 Mécanisme général de cycloaddition 1,3-dipolaire .....	55
Figure 3.2 Structure et données cinétiques (gpITG2) du meilleur inhibiteur de la classe des triazoles développé par le groupe <sup>117</sup> .....	55
Figure 3.3 Synthèse du fragment ynone servant à la cycloaddition 1,3-dipolaire .....	56
Figure 3.4 Structures de deux yrones permettant l'évaluation de l'importance du groupement nitro pour la liaison des inhibiteurs à l'enzyme .....	57
Figure 3.5 Réduction en amine et ajout d'un acétyle à un inhibiteur compétitif réversible connu de la TG2 .....	58
Figure 3.6 Estérification de l'acide <i>p</i> -(aminométhyl)benzoïque .....	60
Figure 3.7 Synthèse de différents azotures benzyliques à partir d'amines .....	60
Figure 3.8 Préparation de triazoles via une réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) .....	61
Figure 3.9 Synthèse sur support solide d'un dérivé triazole incorporé dans une séquence d'acides aminés .....	62
Figure 3.10 Structure du glutathion (GSH) .....	65
Figure 3.11 Analyse, via LC-MS, de la susceptibilité à l'attaque par le GSH des molécules <b>1.20</b> et <b>1.21</b> .....	66
Figure 3.12 Suggestion de mécanismes permettant d'expliquer les résultats obtenus face à la susceptibilité d'attaque par un thiol du squelette trans-cinnamoyle .....	67
Figure 3.13 Proximité d'un azote du cycle benzotriazole avec l'hydrogène de la fonction énol de l'adduit d'addition nucléophile .....	68
Figure 3.14. Synthèse du ( <i>E/Z</i> )- $\beta$ -méthyl- <i>p</i> -nitrocinnamoylbenzotriazolylamide .....	69
Figure 3.15 Préparation du ( <i>E/Z</i> )- $\beta$ -isopropyl- <i>p</i> -nitrocinnamoate d'éthyle .....	70

Figure 3.16 Interactions spatiales du proton vinylique permettant la distinction entre des alcènes <i>E</i> et <i>Z</i> par spectroscopie RMN de type NOESY .....	71
Figure 3.17 Synthèse en parallèle des molécules ( <i>E/Z</i> )- $\beta$ -isopropyl- <i>p</i> -nitrocinnamoyl benzotriazolylamide .....	71
Figure 3.18 Synthèse du 6-nitro-2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-benzotriazolylamide .....	72
Figure 3.19 Synthèse du ( <i>E</i> )-3-(3-nitrophényl)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-én-1-one .....	73
Figure 3.20 Synthèse du trans-2-(3-nitrophényl)cyclopropyl(pyridin-3-yl)méthanone à l'aide de la réaction de cyclopropanation de Corey-Chaykovsky .....	73
Figure 3.21 Préparation du 3-(2-(3-nitrostyryl)oxiran-2-yl)pyridine via une époxydation de Corey-Chaykovsky .....	74
Figure 3.22 Synthèse du 3-(3-(3-nitrophényl)isoxazol-5-yl)pyridine à partir d'une azachalcone .....	74
Figure 3.23 Voie de synthèse envisagée de l'acide 3-(4-nitrophényl)propynoïque à l'aide d'iodure d'(éthoxycarbonyliodométhyl)triphénylphosphonium en milieu basique .....	75
Figure 3.24 Réaction de Corey-Fuchs permettant la préparation du 3-(4-nitrophényl)propiolate d'éthyle .....	76
Figure 3.25 Préparation du 1-(1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,2,3]triazol-1-yl)-3-(4-nitrophényl)prop-2-yn-1-one via un couplage de Sonogashira .....	76
Figure 3.26 Structure de la molécule de référence <i>E-p</i> -nitrocinnamoylbenzotriazolylamide	77
Figure 3.27 Préparation du <i>Z-p</i> -nitrocinnamoylbenzotriazolylamide à partir du 3-(4-nitrophényl)propylate d'éthyle .....	80
Figure 3.28 Structure d'une ynone permettant l'évaluation potentielle, par LC-MS, de la susceptibilité à l'attaque des thiols de la nouvelle classe d'inhibiteurs réversibles identifiée .....	83
Figure 3.29 Proposition de structures de type naphtalène ou quinoline permettant de mimer le cinnamoyle <i>Z</i> .....	83
Figure 4.1 Schéma cinétique et équation de Michaelis-Menten .....	84
Figure 4.2 Relation hyperbolique de type Michaelis-Menten .....	85
Figure 4.3 Structures de deux inhibiteurs au profil cinétique préalablement obtenu ainsi que du substrat utilisé lors des essais cinétiques .....	86

Figure 4.4 Schéma des équilibres hypothétiques possibles entre l'enzyme, le calcium et l'inhibiteur .....	87
Figure 4.5 Courbes de type Michaelis-Menten obtenues en variant la concentration de calcium et d'inhibiteur ( $[AL5] = 54 \mu\text{M}$ ) .....	88
Figure 4.6 Variation du $K_d^{\text{app}}$ du calcium et du $V_{\text{max}}$ de l'enzyme en présence de l'inhibiteur réversible <b>1.20</b> .....	88
Figure 4.7 Courbes de Dixon permettant d'identifier le profil cinétique entre le calcium et la molécule <b>1.20</b> ainsi que l'obtention des constantes d'inhibition .....	90
Figure 4.8 Courbes de Cornish-Bowden permettant la détermination de la valeur de $K_i'$ ainsi que la confirmation du profil cinétique entre le calcium et la molécule <b>1.20</b> .....	92
Figure 4.9 Résumé du profil cinétique obtenu entre l'enzyme, le calcium et la molécule 1.20 .....	93
Figure 4.10 Courbe typique d'une cinétique impliquant AL5 et la molécule <b>1.20</b> .....	94
Figure 4.11 Équilibres réactionnels d'une inhibition à liaison lente .....	94
Figure 4.12 Analyse d'une cinétique type d'inhibition à liaison lente .....	95
Figure 4.13 Courbes de Michaelis-Menten utilisant la vitesse initiale (gauche) et la vitesse stationnaire (droite).....	96
Figure 4.14 Détermination graphique des valeurs de $K_i$ et $K_i^*$ pour la molécule <b>1.20</b> .....	97
Figure 4.15 Détermination des constantes de vitesse $k_5$ et $k_6$ pour la molécule <b>1.20</b> à l'aide de l'équation <b>4.8</b> .....	98
Figure 4.16 Analyse d'une cinétique de type retour à l'activité.....	99
Figure 5.1 Structures de différents groupements photoactivables .....	104
Figure 5.2 Préparation d'un inhibiteur réversible pour la conversion en molécule photoactivable.....	106
Figure 5.3 Synthèse d'une diazirine aliphatique .....	107
Figure 5.4 Réaction de couplage permettant l'obtention d'un inhibiteur photoactivable ....	107
Figure 5.5 Analyse LC-MS/MS permettant l'identification du site de marquage par l'inhibiteur photoactivable <sup>119</sup> .....	108
Figure 5.6 Accessibilité au solvant de la cystéine 230 (rose) pour les deux conformères de la gpITG2.....	109

Figure 5.7 Localisation du site actif et du résidu marqué au sein des deux conformères de la gpITG2 <sup>119</sup> .....	110
Figure 5.8 Représentation des deux modes de liaison principaux identifiés par arrimage moléculaire sur le modèle d'homologie de la forme fermée de la gpITG2 <sup>119</sup> .....	111
Figure 5.9 Étude conformationnelle par gel natif de la gpITG2 <sup>119</sup> .....	113
Figure 5.10 Séparation par électrophorèse capillaire des conformères de la hTG2 .....	114
Figure 5.11 Structure de la biotine .....	117
Figure 5.12 Préparation d'un fragment photoactivable à partir du 1-amino-propan-2-ol <sup>132</sup> .....	118
Figure 5.13 Couplage d'un groupement photoactivable à un dérivé d'acide aspartique utilisable en synthèse sur phase solide .....	118
Figure 5.14 Synthèse d'un substrat accepteur photoactivable .....	119
Figure 5.15 Courbe de Michaelis-Menten obtenue pour le substrat accepteur photoactivable ([AL5] = 435 $\mu$ M) .....	120
Figure 5.16 Structure du composé test utilisé pour l'étude cinétique de la réaction de disparition de la fonction diazirine sous l'effet des rayons UV .....	121
Figure 5.17 Cinétique de disparition de la fonction diazirine du composé <b>5.12</b> .....	122
Figure 5.18 Activité enzymatique de la hTG2 après différents temps d'exposition aux rayons UV .....	123
Figure 5.19 Stratégie envisagée pour l'identification du site de liaison du substrat accepteur par photomarquage .....	125
Figure 5.20 Identification des résidus modifiés et fréquence de marquage observée via spectrométrie de masse en tandem suite au marquage de la hTG2 à l'aide d'un substrat accepteur photoactivable .....	130
Figure 6.1 Structure de l'inhibiteur réversible <b>1.20</b> .....	131
Figure 6.2 Structure de la molécule <b>3.30</b> .....	133
Figure 6.3 Structure du substrat accepteur photoactivable <b>5.11</b> .....	134

## Liste des sigles et abréviations

Å	Angström
AA	acide aminé
Ac	groupement acétyle
Ac <sub>2</sub> O	anhydride acétique
ACN	acétonitrile
Acryl	groupement acryloyle
ADN	acide désoxyribonucléique
AL5	<i>N</i> -Cbz-L-Glutamyl( $\gamma$ - <i>p</i> -nitrophényl ester)glycine
AMBER	<i>assisted model building with energy refinement</i>
atm	atmosphère
ATP	adénosine triphosphate
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
BSA	albumine de sérum bovin
cal	calorie
cat.	catalytique
Cbz	benzyloxycarbonyl
CVFF	<i>constant valence force field</i>
$\Delta$	reflux
d	doublet
Da	dalton
DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
dd	doublet de doublet
déc.	décomposition
DIC	1,3-diisopropylcarbodiimide

DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMPA	<i>N,N</i> -4-diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucine
dt	doublet de triplet
DTT	dithiothréitol
E	enzyme
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i> (numéro de classification des enzymes)
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ESI	ionisation par électronébuliseur
Et	groupement éthyle
Et <sub>3</sub> N	triéthylamine
EtOH	éthanol
Fmoc	9-fluorénylméthoxycarbonyl
FXa	facteur X activé
FXIII	facteur XIII
FXIIIa	facteur XIII activé
δ	déplacement chimique
GDH	glutamate déshydrogénase
GDP	guanidine triphosphate
gpITG2	transglutaminase tissulaire de foie de cobaye
GSH	glutathion
GST	glutathion S-transférase
GTP	guanidine triphosphate

HEPES	acide <i>N</i> -2-hydroxyéthylpipérazine- <i>N'</i> -2-éthanesulfonique
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
hTG2	transglutaminase tissulaire humaine
I	inhibiteur
IC <sub>50</sub>	concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer de moitié la vitesse réactionnelle par rapport à sa valeur initiale, non-inhibée
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
<i>J</i>	constante de couplage
k <sub>cat</sub>	constante catalytique
K <sub>d</sub>	constante de dissociation
K <sub>d</sub> <sup>app</sup>	constante de dissociation apparente
K <sub>i</sub>	constante d'inhibition d'un inhibiteur réversible
K <sub>I</sub>	constante d'inhibition d'un inhibiteur irréversible
k <sub>inact</sub>	constante de vitesse d'inactivation
K <sub>M</sub>	constante de Michaelis
K <sub>M</sub> <sup>app</sup>	constante de Michaelis apparente
k <sub>obs</sub>	constante de vitesse observée
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	chromatographie en phase liquide
LP(a)	lipoprotéine a
m	multiplet
MeOH	méthanol
MOPS	acide 3-( <i>N</i> -morpholino)propanesulfonique
MS	spectrométrie de masse
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide

n-Bu	groupement butyle
NOESY	<i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
npts	nombre de points
NTA	acide nitriloacétique
P	produit
p.f.	point de fusion
pb	paire de base
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
PDB	<i>Protein data bank</i>
Ph	groupement phényle
PM	poids moléculaire
ppm	partie par million
psi	livre par pouce carré
PSP	protéase <i>PreScission</i> <sup>MC</sup>
q	quadruplet
quant.	quantitatif
RMN	résonance magnétique nucléaire
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
rpm	tours par minute
s	singulet
S	substrat
Sar	sarcosine
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse sur gels de polyacrylamide avec dodécylsulfate de sodium
sept	septuplet
sl	singulet large

SMHR	spectre de masse haute résolution
t.a.	température ambiante
TB	<i>terrific broth</i>
<i>t</i> -Bu	groupement <i>tert</i> -butyle
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol
TCEP	tris(2-carboxyéthyl)phosphine
Tf	groupement trifluorométhylsulfonique
TFA	acide trifluoroacétique
TGase ou TG	transglutaminase
THF	tétrahydrofurane
TMS	groupement triméthylsilyle
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Ts	groupement <i>p</i> -tosylsulfonique
U	unité d'activité enzymatique
UV	ultraviolet
v	vitesse
v <sub>i</sub>	vitesse initiale
VIH	virus d'immunodéficience humaine
vis	visible
V <sub>max</sub>	vitesse maximale
v <sub>s</sub>	vitesse stationnaire

*À ma bonne étoile, qui a filé beaucoup trop vite dans  
ma vie et qui veille maintenant sur moi de haut*

## Remerciements

Après plus de 7 ans passés à travailler sur le plus beau sujet du monde, c'est difficile de savoir par où commencer mes remerciements.

Bien évidemment, je ne peux pas passer à côté de mon fabuleux directeur de recherche, qui a cru en moi pendant toutes ces années, parfois même plus que moi, qui n'a jamais hésité à me demander de faire des choses en dehors de ma « zone de confort » parce que « j'en étais capable ». Et oui Jeff, tu avais raison sur toute la ligne et, maintenant que je vois le fruit de ce que j'ai accompli, je te remercie de m'avoir proposé et laissé accomplir tous ces projets sur cette enzyme qui nous réserve des surprises à tout moment!

Je dois aussi un gros merci à mon prédécesseur dans ce projet, Christophe, qui a toujours été un fabuleux modèle pour moi, et qui avait la gentillesse, même à partir de la France, de répondre à mes nombreuses questions.

À tous les membres du groupe Keillor que j'ai eu la chance de côtoyer à travers les années, vous faites la force de ce groupe. Par l'esprit d'équipe et l'entraide constante que vous démontrez, vous êtes le reflet de ce qui est pour moi « l'esprit scientifique », où, tous ensemble, nous tentons de faire avancer, peu à peu, la Connaissance.

Je dois aussi une fière chandelle aux groupes des Pr. Pelletier et Pr. Schmitzer qui m'ont démontré leur support pendant toute mon aventure, et, particulièrement, au moment où le reste du groupe m'a quittée. Vous ne le savez peut-être pas, mais c'est beaucoup grâce à vous si je n'ai pas trop sombré vers le côté noir de la force à cette étape difficile de mon cheminement académique.

Évidemment, je n'y serais pas arrivée sans le support de ma famille et de mes amis. Eh oui, j'ai douté de moi à de nombreux moments tout au long de ce processus et vous m'avez toujours remis sur le droit chemin pour que j'atteigne enfin mon but, un gros merci.

Finalement, le dernier et non le moindre, à celui qui partage ma vie depuis plus de 3 ans maintenant, Alex, je tourne enfin la page sur un pan de ma vie et espère en ouvrir plusieurs autres avec toi dans le futur. Tu as été d'une compréhension inégalée, d'un support incroyable pendant ces dures années de rédaction, mais voilà, c'est enfin terminé.

# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1. Les débuts de la chimie bio-organique

La chimie est une science à la fois théorique et expérimentale qui a pris racine pendant la préhistoire. En effet, les premiers contacts de l'humain avec la chimie remontent aussi loin qu'à la découverte du feu, qui a permis à l'Homme d'effectuer ses premières expérimentations chimiques par, entre autre, la cuisson des aliments. Par la suite, cette maîtrise du feu lui a permis d'effectuer ses premières transformations contrôlées de la matière, via la fabrication de verre et d'alliages pour ne citer que ceux-là.

Au fil des siècles, cette science a fait des pas de géant en permettant, par exemple, d'élaborer des théories, comme la théorie orbitale, à la base du modèle atomique actuel, corrélant des données expérimentales, comme l'émission de lumière discontinue par les éléments avec, entre autre, le principe d'incertitude de Heisenberg.

Au cours des années, la chimie s'est subdivisée en plusieurs branches. Par exemple, la chimie inorganique est la branche qui étudie, notamment, les sels, les complexes métalliques et les composés moléculaires à base d'éléments non-métalliques autre que le carbone. De son côté, la chimie analytique s'intéresse surtout à la séparation, la purification et à l'analyse des constituants de mélanges complexes, tandis que la chimie physique s'intéresse essentiellement à l'étude des propriétés physiques de systèmes ou de procédés chimiques.

Quant à elle, la chimie organique, dénommée ainsi par Nicolas Lémery en 1690, est la branche de la chimie qui étudie les molécules constituées principalement d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote. Cette dénomination provient d'une conception, à la base erronée, selon laquelle les composés organiques seraient les seuls entrant en jeu dans les processus du vivant. Par contre, il fut prouvé, par la suite, que les composés organiques peuvent être produits sans l'utilisation des êtres vivants et que les composés inorganiques entrent aussi en jeu dans les processus biologiques. Par contre, le terme, lui, est resté dans le langage courant des chimistes. Cette branche s'intéresse principalement aux réactions et à la préparation de ces composés, mais aussi en étudie leurs structures, propriétés et compositions.

De par sa nature, la chimie organique se retrouve donc à l'interface d'une autre science, soit la biologie, qui, elle, s'intéresse à l'étude du vivant. Par contre, au cours de son histoire, les deux domaines ont évolués côte-à-côte pendant plusieurs années, puisque les techniques de l'époque n'étaient pas suffisamment avancées afin de permettre une réelle interdisciplinarité.

Il aura fallu attendre Émil Fischer, un chimiste ayant marqué son époque notamment pour ses études sur les sucres et les purines pour lesquelles il a reçu le prix Nobel en 1902<sup>1,2</sup>, afin de joindre ces deux sciences. Par exemple, Fischer utilisa la réactivité chimique de composés isolés d'organismes vivants, comme l'adénine, la xanthine ou la caféine, ainsi que la synthèse organique, afin de démontrer que ces molécules étaient toutes de la même famille. En effet, au sein des organismes vivants, elles mènent toutes, ultimement, à la formation de l'acide urique, permettant ainsi leur élimination<sup>1</sup>.

De plus, Fischer a découvert la nature de la liaison peptidique à la base de la structure primaire des protéines, soit un lien amide entre la partie amine d'un acide aminé et la partie acide carboxylique d'un second acide aminé<sup>2</sup>. Il fut le premier à réaliser la synthèse de peptides en laboratoire, allant de simples dipeptides, comme le glycyl-glycine, jusqu'à un octodécapeptide, possédant des caractéristiques proches des protéines naturelles<sup>2</sup>.

Émil Fischer est aussi le père du renommé modèle « clé-serrure », développé en 1894, permettant encore aujourd'hui d'illustrer dans l'imaginaire collectif le fonctionnement des enzymes<sup>1,3,4</sup>. Ce modèle, qui repose sur la complémentarité moléculaire, reste un concept phare dans la chimie moderne<sup>3,4</sup>. En effet, il est possible de penser, par exemple, à la chimie supramoléculaire, où les différentes molécules doivent se juxtaposer d'une manière quasi-parfaite, à l'aide d'interactions intermoléculaires, afin de créer des « superstructures » possédant des caractéristiques physiques et chimiques indépendantes des molécules individuelles<sup>4</sup>. De plus, l'industrie du médicament est aussi basée sur ce précieux concept, où les molécules développées doivent entrer en symbiose avec leur récepteur afin de créer la réaction physiologique désirée chez le patient.

Il est donc possible de voir la fin du XIX<sup>e</sup> siècle comme étant l'époque qui a permis l'émergence d'une nouvelle branche de la chimie, la chimie bio-organique, qui s'intéresse, au

niveau moléculaire, à différents processus prenant naissance au sein du vivant, et/ou voulant l'imiter, à l'aide de molécules organiques.

## **1.2. Les transglutaminases**

Bien évidemment, la chimie bio-organique est un domaine extrêmement vaste et cette thèse se limitera à un champ très restreint, l'enzymologie, qui s'intéresse à l'étude de la structure, de la fonction et du mécanisme réactionnel des enzymes. Dans le cadre de cette thèse, la transglutaminase tissulaire (TG2) sera le principal sujet d'étude.

Les transglutaminases (TGases) sont des enzymes de la famille des aminoacyltransférases (EC 2.3.2.13)<sup>5</sup>. Elles catalysent la formation d'une liaison entre les chaînes latérales de résidus glutamine et lysine<sup>6-8</sup>, nommée lien isopeptidique. Elles permettent ainsi, dans les organismes, la modification post-traductionnelle des protéines<sup>9</sup>, modifications qui s'avèrent critiques dans plusieurs processus biologiques comme par exemple la coagulation sanguine<sup>10</sup>, l'induction de l'apoptose<sup>11</sup> ou encore l'adhésion cellulaire<sup>10,12</sup>.

Les TGases se retrouvent tout aussi bien chez les organismes unicellulaires, comme les bactéries, que chez les organismes complexes comme les mammifères. Dans ce dernier cas, neuf différentes TGases ont été identifiées avec les années, comme le montre le Tableau 1.1<sup>10,11,13</sup> présenté à la page suivante.

### **1.2.1. TGase kératinocyte (TG1).**

Les TGases de cette catégorie sont des protéines monomériques de type ancre lipidique liées à la membrane cellulaire en N-terminal du côté cytoplasmique<sup>14</sup>. La TG1 est exprimée sous forme de zymogène inactif de 109 kDa<sup>9</sup> qui est subséquentement transformé en une forme active ayant l'aspect d'un complexe 10/67/33 kDa<sup>15</sup>. La TG1 serait responsable de la formation de l'enveloppe cellulaire des tissus des cheveux et des ongles<sup>14,16</sup>. En plus de sa forme membranaire, elle existe aussi sous forme cytoplasmique<sup>15</sup>. Dans ce dernier cas, trois formes actives ont été répertoriées soit des enzymes de 106 kDa et de 67 kDa et un complexe 67/33 kDa<sup>15</sup>.

**Tableau 1.1 Les différents types de transglutaminases de mammifères**

Nom courant	Type	Code PDB de la souche humaine (RMSD, % identité)	Masse approximative (kDa)	Expression tissulaire
TGase kératinocyte	1		109 (zymogène)	Épithélium, cerveau <sup>10,14</sup>
TGase tissulaire	2	1KV3 (référence)	80	Ubiquitaire <sup>10,17</sup>
TGase épidermale	3	1L9M (1,623 Å, 38,1 %)	77 (zymogène)	Épithélium, cerveau <sup>10,12</sup>
TGase prostatique	4		77	Prostate <sup>10,18</sup>
TGase X	5		81 (zymogène)	Épithélium <sup>19,20</sup>
TGase neuronale (Y)	6		79	Système nerveux central <sup>13</sup>
TGase Z	7		80	Ubiquitaire <sup>10</sup>
TGase plasmatique	FXIII	1EVU (1,748 Å, 37,6 %)	320 (tétramère, zymogène)	Sang <sup>10,21</sup>
Pallidine	EP 4.2 ou bande 4.2		72	Sang <sup>9,22</sup>

### 1.2.2. TGase épidermale (TG3).

La TG3 est, tout comme la TG1, une protéine monomérique exprimée sous forme initialement inactive. L'activation nécessite un clivage protéolytique entre deux sérines, effectué par la cathépsine L<sup>9,13,23</sup>, générant ainsi un complexe 50/27 kDa<sup>24</sup> possédant une activité catalytique. La TG3 serait responsable de la formation de l'enveloppe cellulaire de l'épiderme et du follicule pileux<sup>12,25,26</sup>. L'activité de transamidation de la TG3 est inhibée en présence de GTP et l'enzyme peut même l'hydrolyser<sup>27-29</sup>.

### **1.2.3. TGase prostatique (TG4).**

La TG4 est une enzyme monomérique qui ne nécessite pas d'activation protéolytique. Elle serait impliquée dans la formation du caillot post-coïtal chez les rongeurs<sup>30</sup>. Elle est aussi sécrétée chez l'humain, mais son rôle physiologique reste à préciser<sup>31</sup>. Elle pourrait être impliquée dans le processus de maturation du sperme en en modifiant la surface, ce qui diminuerait la réponse immunitaire chez la femme<sup>31</sup>. Tout comme la TG3, l'activité de transamidation de la TG4 est inhibée en présence de GTP qui peut aussi être hydrolysé par celle-ci<sup>9,18</sup>.

### **1.2.4. TGase X (TG5).**

La TG5 est protéine monomérique exprimée principalement, comme la TG1 et la TG3, dans l'épithélium<sup>19,20</sup>. De plus, elle doit être activée par protéolyse libérant ainsi une enzyme de 53 kDa<sup>9,20</sup>. Elle est plutôt méconnue et sa fonction biologique n'est pas bien définie. Par contre, elle semble jouer un rôle similaire à la TG1 et à la TG3 via la cornification de l'enveloppe cellulaire dans l'épithélium et dans le follicule pileux<sup>9,20</sup>. De plus, elle pourrait jouer un rôle dans la différenciation de l'épiderme et pourrait être impliquée dans l'apoptose<sup>27,32</sup>. L'activité de transamidation de la TG5 est inhibée par les purines (GTP et ATP) et cette enzyme est en mesure d'hydrolyser le GTP<sup>9,27</sup>.

### **1.2.5. TGase neuronale (TG6).**

La TG6 est aussi une protéine monomérique, mais qui n'a pas besoin d'une activation par protéolyse<sup>13</sup>. Elle est exprimée de manière abondante dans le système nerveux central et est associée à la neurogénèse, à la différenciation neuronale et à l'apoptose tout en jouant un rôle important dans les neurones du contrôle moteur<sup>13</sup>. De plus, elle pourrait permettre l'activation de GTPases<sup>13</sup>. En plus de son activité de transamidation, la TG6 peut aussi permettre la désamidation<sup>33</sup>. Son activité de transamidation est inhibée par le GTP tout comme par le GDP<sup>13</sup>. De plus, ce type de TGase est sensible à l'inactivation oxydative<sup>13</sup>.

### **1.2.6. TGase Z (TG7).**

La TG7 est la moins connue de la famille. Il s'agit d'une enzyme monomérique<sup>34</sup>, mais son rôle physiologique reste à déterminer<sup>34</sup>. Une analyse de l'évolution des TGases montre par contre que plusieurs membres de la famille pourraient avoir des rôles très similaires<sup>34</sup>.

### **1.2.7. TGase plasmatique (FXIII):**

Le FXIII est certainement la mieux connue des TGases. Il est exprimé sous forme d'un hétérotétramère de type A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> possédant des fonctions à la fois intra et extracellulaire<sup>9</sup>. Le FXIII est impliqué dans la dernière étape de la cascade de coagulation sanguine. Une fois activé par la thrombine, permettant de générer un homodimère actif de type AB, mieux connu sous le nom de FXIIIa, il permet la réticulation de la fibrine via une réaction catalytique effectuée au sein de la chaîne A, possédant un poids moléculaire avoisinant les 83 kDa<sup>10,21</sup>.

### **1.2.8. Pallidine (EP 4.2 ou bande 4.2).**

Cette protéine ne possède pas d'activité catalytique, mais est très près, structurellement, des TGases<sup>9</sup>. Il s'agit en réalité d'une protéine structurale des globules rouges qui permet de fixer la membrane du globule au cytosquelette<sup>9</sup>. Cette protéine est capable de lier, sans l'hydrolyser, l'ATP, mais pas le GTP, contrairement aux autres membres de la famille<sup>22</sup>.

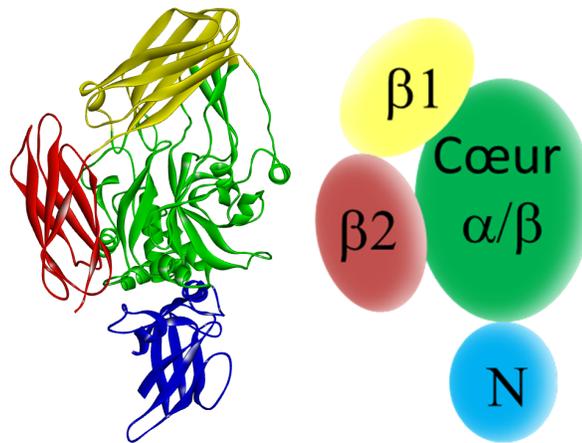
## **1.3. La transglutaminase tissulaire (TG2)**

La TG2 est, à ce jour, la TGase la plus étudiée de par le monde par les chercheurs<sup>35</sup>, dû à sa présence ubiquitaire dans les différents tissus des organismes, mais aussi pour son implication potentielle dans une multitude de pathologies.

Tout comme la TG4, la TG6 et la TG7, il s'agit d'une enzyme monomérique n'ayant point besoin d'une activation protéolytique. Cette enzyme est exprimée dans l'ensemble des tissus, principalement dans le cytosol des cellules<sup>10,36</sup>. Par contre, il est aussi possible de la retrouver dans le noyau et le milieu extracellulaire<sup>10,11,36</sup>. Le mécanisme de sécrétion de l'enzyme n'est pas bien connu, celle-ci ne présentant pas de peptide signal. Par contre, plusieurs évidences montrent que l'enzyme est bel et bien sécrétée<sup>9,35</sup>. D'un autre côté, la TG2

est connue pour interagir avec l'importine, menant au transport actif de l'enzyme vers le noyau<sup>36</sup>. Dans l'organisme, la TG2 possède un temps de demi-vie d'environ onze heures<sup>11</sup>.

La TG2 est une protéine de poids se situant entre 76 et 85 kDa selon les espèces<sup>21</sup>, ne présentant aucun site de glycosylation<sup>35</sup>, et composée d'un sandwich- $\beta$  en N-terminal, de deux barils- $\beta$  en C-terminal et d'un cœur  $\alpha/\beta$  où se situe l'activité catalytique<sup>37</sup>. La structure tertiaire de la souche humaine (code PDB 1KV3, février 2009, 2,80 Å) est présentée à la Figure 1.1.



**Figure 1.1 Structure tertiaire de la hTG2<sup>37</sup>**

Le site catalytique de la TG2 est constitué d'une cystéine, d'une histidine et d'un acide aspartique et il est hautement conservé chez les différentes espèces<sup>11</sup>. De plus, dans le cas de la TG2, l'activité enzymatique est dépendante de la présence de calcium à une concentration plus élevée que celle normalement retrouvée dans les cellules<sup>11</sup>. Donc, techniquement, la TG2 serait inactive dans des conditions physiologiques normales du cytosol et elle serait activée seulement lorsque l'homéostasie cellulaire est brisée<sup>10,11</sup>. Une fois activée, la TG2 serait amenée à jouer un rôle dans plusieurs réactions de modifications post-traductionnelles de protéines<sup>11</sup>.

En plus de son activité de transamidation, la TG2 est aussi impliquée dans des rôles de désamidase<sup>38</sup>, de GTPase<sup>11</sup>, d'ATPase<sup>11</sup>, de disulphide isomérase<sup>39</sup> et de kinase<sup>11</sup>. De plus, la liaison du GTP ou du GDP mène à une inhibition allostérique de l'activité transpeptidase, et ce, même en présence de calcium<sup>11,35</sup>.

### **1.3.1. Les différents rôles physiologiques.**

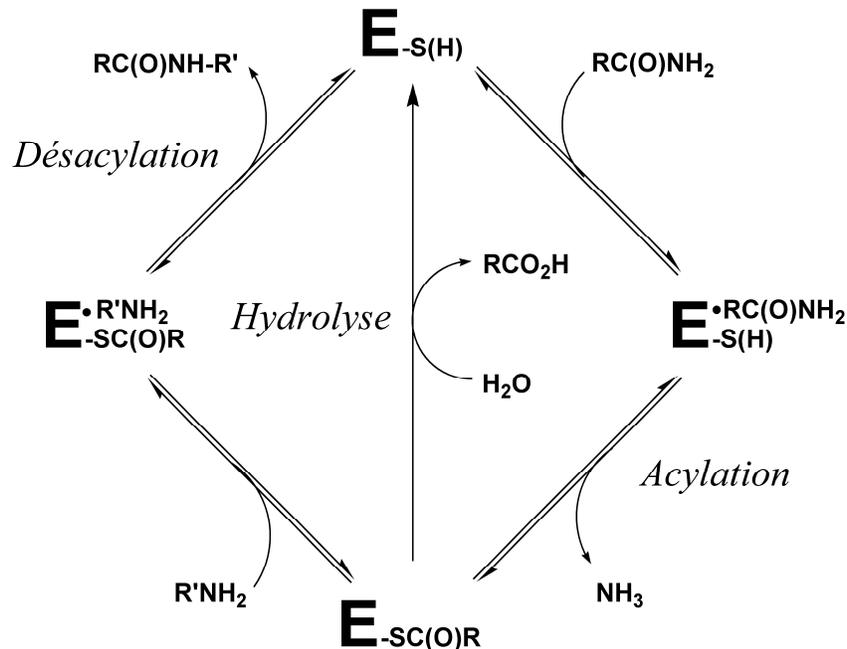
Le rôle biologique de la TG2, malgré le fait qu'elle soit la plus étudiée des TGases, n'est toujours pas bien compris. Elle semble impliquée dans différents processus comme l'endocytose<sup>40,41</sup>, l'adhésion<sup>42</sup>, la morphologie<sup>43</sup>, la différenciation<sup>36</sup> et la croissance cellulaire<sup>36</sup>, la réparation tissulaire<sup>44</sup>, le développement et la stabilisation de la matrice extracellulaire<sup>45</sup> et dans l'induction de l'apoptose<sup>46</sup>. Dans ce dernier cas, l'activité de la TG2 conduirait à une hyperréticulation permettant la formation d'une enveloppe apoptotique ce qui permettrait d'éviter au matériel intracellulaire de se retrouver dans le milieu extracellulaire et de déclencher une réponse inflammatoire indésirable avant que la cellule soit éliminée par phagocytose<sup>47,48</sup>.

Malgré tout, la TG2 ne semble pas essentielle à la survie. En effet, des souris déficientes en TG2 sont tout à fait viables, malgré l'apparition, chez certaines, de pathologies non létales comme le diabète ou encore un taux d'apoptose plus élevé que la normale<sup>10</sup>. D'autres individus ont présenté des problèmes de cicatrisation cutanée liés à un changement dans le cytosquelette et dans la motilité cellulaire. Par contre, comme mentionné plus haut, les différents types de TGases se ressemblent beaucoup et il est difficile d'affirmer hors de tout doute que la TG2 n'est pas fondamentale à la viabilité des individus puisque d'autres types de TGases pourraient prendre le relais en l'absence de celle-ci<sup>10</sup>.

### **1.3.2. Le mécanisme de la réaction enzymatique.**

La TG2 est une enzyme qui permet la réticulation des protéines en catalysant la formation d'un lien amide entre la chaîne latérale d'un résidu glutamine et celle d'un résidu lysine. Comme le montre la Figure 1.2, le cycle catalytique s'effectue en deux temps<sup>49</sup>.

Premièrement, dans l'étape d'acylation, le substrat donneur d'acyle, soit le dérivé de glutamine, se lie d'une manière non-covalente à l'enzyme, avant de subir l'attaque du thiol, situé dans le site actif, sur le carbonyle de la chaîne latérale. Cette réaction mène à la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme et génère la production d'un équivalent d'ammoniac.



**Figure 1.2 Cycle catalytique de la TG2 de type « ping-pong modifié »**

Dans un deuxième temps, en présence d'une amine primaire ou secondaire, généralement un résidu lysine, le substrat accepteur d'acyle va se lier d'une manière non-covalente à l'intermédiaire acyl-enzyme ( $E\text{-SC(O)R}$ ), permettant ainsi à l'amine d'attaquer le carbonyle de l'acyl-enzyme dans l'étape de désacylation. Ceci libère le produit de la réaction et régénère l'enzyme libre. L'étape de désacylation de l'enzyme se trouve être l'étape lente du mécanisme et est celle qui détermine la vitesse globale de la réaction enzymatique<sup>50</sup>.

L'appellation « modifié » du mécanisme vient du fait qu'en absence d'une amine dans l'environnement de l'intermédiaire acyl-enzyme, l'eau peut être utilisée comme substrat dans une étape d'hydrolyse, menant, dans ce cas, à la transformation du substrat donneur d'acyle en acide carboxylique plutôt qu'à la formation du lien isopeptidique<sup>49</sup>.

### 1.3.3. Les différents substrats reconnus.

Deux classes de substrats sont connues : les substrats donneurs et les substrats accepteurs. Les substrats donneurs interviennent dans l'étape d'acylation du mécanisme, tandis que les substrats accepteurs interviennent plutôt dans l'étape de désacylation.

La TG2 est très sélective envers le substrat donneur et son site de liaison est bien caractérisé<sup>51</sup>. La TG2 peut utiliser différentes protéines naturelles, dont les plus connues sont certainement les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  de la fibrine<sup>52</sup>, l'actine<sup>53</sup> et la caséine<sup>54</sup>, en guise de substrat donneur. De plus, de petites séquences synthétiques se trouvent aussi être de bons substrats donneurs pour la TG2 comme : Cbz-Gln-Gly<sup>55,56</sup>, EAQQIVM<sup>57</sup>, KVLGDGQDP<sup>58</sup>, PQQQLPY<sup>59</sup>, Boc-K-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-dansyl (KXD)<sup>60</sup> et Cbz-Glu( $\gamma$ -*p*-nitrophényl ester)Gly<sup>50</sup>.

L'étude de ces différents peptides a permis d'inspirer notre groupe pour la création de sa propre séquence de haute affinité, soit le PNPQLPF. Cette séquence s'inspire du peptide PQQQLPY<sup>59</sup>, mais le remplacement de la tyrosine par la phénylalanine permet de faciliter la synthèse tandis que l'utilisation d'une seule glutamine permet de rendre l'analyse plus simple. Celle-ci est utilisée, entre autre, en combinaison avec un fluorophore, afin d'étudier la TG2 directement dans les cellules<sup>61,62</sup>.

Pour ce qui est du substrat accepteur, la TG2 est beaucoup moins sélective et le site de liaison de ce substrat demeure nébuleux. La plupart des alkylamines primaires, dont le monodansyl-cadavérine<sup>63,64</sup>, sont reconnues par l'enzyme<sup>50</sup> tout comme plusieurs diamines telles que la putrescine<sup>65</sup> et la spermidine<sup>65</sup>, qui sont utilisées, notamment, dans des tests d'incorporation d'amines afin de jauger l'activité transglutaminase.

Récemment, notre groupe de recherche a découvert que la propargylamine représente un excellent substrat accepteur de la TG2 permettant l'utilisation de cette enzyme afin de faire du marquage protéique fluorescent, de manière spécifique<sup>66</sup>. En effet, en incorporant, à la surface de la protéine à marquer, une séquence reconnue par la TG2 comme substrat donneur, il est possible, par la suite, d'utiliser la propargylamine afin d'introduire, sur la surface de la protéine à marquer, une liaison triple. Subséquemment, en ajoutant au milieu un fluorophore contenant un groupement azoture, il est possible, via une réaction de cycloaddition, de greffer le fluorophore directement sur la protéine à marquer<sup>66</sup>.

#### **1.3.4. Les désordres physiologiques.**

La TG2 étant exprimée dans l'ensemble des tissus de l'organisme, différentes pathologies peuvent apparaître lorsque son fonctionnement dévie de la normale.

#### 1.3.4.1. Les maladies inflammatoires

La TG2 semble reliée à divers troubles de nature inflammatoire comme l'arthrite rhumatoïde<sup>10</sup>, l'ostéoarthrose<sup>67</sup>, la thrombose<sup>68</sup> ou encore l'artériosclérose<sup>68</sup>. Dans ce dernier cas, la TG2 serait responsable de la formation de plaques athérosclérotiques dans le milieu extracellulaire des vaisseaux sanguins via l'apposition de lipoprotéines (a) (LP(a)) à la surface des vaisseaux<sup>68</sup>. L'implication de la TG2 se fait via la création d'une liaison covalente entre la LP(a) et le fibrinogène.

#### 1.3.4.2. Les maladies neurodégénératives

Fléaux de notre siècle, la TG2 pourrait aussi avoir un impact dans le développement de certaines maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer<sup>69</sup> ou la maladie de Huntington<sup>70</sup>. Dans la maladie d'Alzheimer, la TG2 pourrait être liée à l'apparition des plaques amyloïdes<sup>69,71</sup> via la réticulation, entre autre, des protéines  $\beta$ -amyloïdes. De plus, le cortex du cerveau des patients atteints d'Alzheimer présente une plus grande quantité et une activité accrue de TG2 comparativement au cortex cérébral de sujets sains<sup>72</sup>. La maladie de Huntington, quant à elle, est caractérisée par l'apparition de répétitions de séquences polyGln exprimées en terminus de protéines engendrant ainsi une susceptibilité accrue à l'apoptose des cellules<sup>70,73</sup>. Cette susceptibilité à l'apoptose pourrait être due à la formation d'agrégats suite à une reconnaissance des séquences polyGln par la TG2. Dans ce cas-ci, l'utilisation d'amines agissant comme substrats accepteurs de l'enzyme, comme la cystéamine ou encore le monodansyl-cadavérine, a permis de démontrer la diminution de ces agrégats<sup>73,74</sup>.

#### 1.3.4.3. Les maladies auto-immunes

La TG2 est directement impliquée dans une maladie des plus médiatisées, la maladie céliaque, aussi connue sous le nom d'intolérance au gluten<sup>75,76</sup>. En fait, il s'agit d'une réaction immunitaire face à des protéines contenues dans certaines céréales dont notamment le blé, l'orge et le seigle provoquant une destruction de la paroi de l'intestin grêle<sup>77</sup>. En effet, pendant le processus de digestion, ces protéines sont dégradées en différents peptides. De ces peptides, certains, dont quelques-uns dérivés de la gliadine, sont de bons substrats donneurs de la TG2<sup>59</sup>. Ce faisant, quelques glutamines spécifiques contenues dans ces peptides seront hydrolysées

en acides glutamiques menant ainsi à la réponse immunitaire<sup>75</sup>. Fait intéressant, une des méthodes de diagnostic de cette maladie consiste à quantifier la TG2 par immunobuvardage<sup>78</sup>. La TG2 serait aussi impliquée dans d'autres maladies auto-immunes comme le diabète de type 1<sup>79</sup> ou encore diverses pathologies de la thyroïde<sup>11</sup>.

#### 1.3.4.4. Les maladies néoplasiques

De par le monde, le cancer représente la deuxième cause de mortalité et la TG2 serait amenée à jouer un rôle clé dans différents types de cellules malignes<sup>80,81</sup>. En effet, les tissus tumoraux de stade peu avancé présentent moins de TG2 que les cellules saines, ce qui favoriserait la croissance initiale de la tumeur<sup>82-84</sup>. Par contre, une fois arrivé au stade métastatique, les cellules cancéreuses présentent, règle générale, une expression de TG2 supérieure à la normale, ce qui entraînerait un taux de survie plus grand des cellules, tout en augmentant l'invasion et la mobilité tumorale<sup>81,85-87</sup>.

#### 1.3.4.5. Autres maladies

La TG2 serait aussi impliquée dans certaines maladies de la peau comme l'acné<sup>88</sup> ou encore le psoriasis<sup>89</sup>. De plus, elle joue un rôle important dans la formation des cataractes dans le cristallin humain via la réticulation, entre autre, des cristallines- $\beta$ <sup>90,91</sup>.

### **1.3.5. Les inhibiteurs connus.**

L'implication de la TG2 dans ces différentes pathologies a mené différents chercheurs à développer des molécules pouvant diminuer, voire enrayer, l'activité enzymatique de celle-ci. Ces molécules peuvent être regroupées dans deux grandes familles : les inhibiteurs irréversibles et les inhibiteurs réversibles.

#### 1.3.5.1. Les inhibiteurs irréversibles

La TG2, comme toutes les TGases, présente, au sein de son site catalytique, une cystéine hautement réactive<sup>49</sup>. À l'instar des protéases à cystéines<sup>92</sup>, différentes molécules possédant un site électrophile, permettant la création d'une liaison covalente, via une réaction chimique entre l'inhibiteur et l'enzyme, se révèlent être de bons inhibiteurs irréversibles de la TG2. Compte-tenu du fait qu'une liaison covalente lie l'inhibiteur à l'enzyme, ce type de

molécules est aussi nommé inhibiteur suicide, puisque l'enzyme se retrouve ainsi coincée dans une forme exempte de toute activité catalytique.

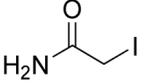
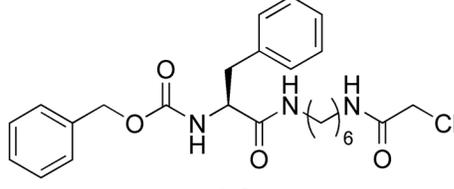
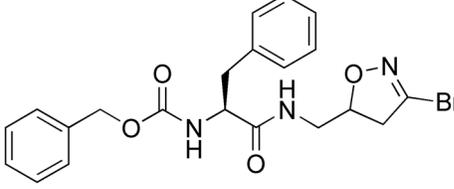
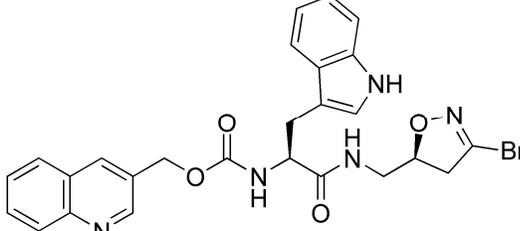
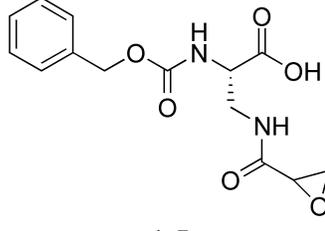
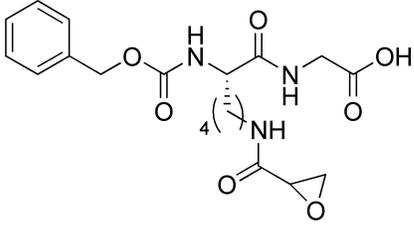
De plus, afin d'amener un élément de sélectivité face à d'autres enzymes, les différents groupes électrophiles comme les halogénométhylcétone<sup>93-96</sup>, les 3-halogéno-4,5-dihydroisoxazoles<sup>97-102</sup>, les époxydes<sup>92,103</sup>, les 1,2,4-thiadiazoles<sup>92,104</sup>, les accepteurs de Michael<sup>62,96,103,105,106</sup> ou encore les diazométhylcétone<sup>51,100</sup>, peuvent être insérés dans des squelettes peptidiques bien reconnus par la TG2, comme le squelette Cbz-Phe<sup>101</sup>, Cbz-Gln-Gly<sup>56,102,107</sup>, PQPQLPF<sup>100</sup> ou encore PNPQLPF<sup>62</sup>.

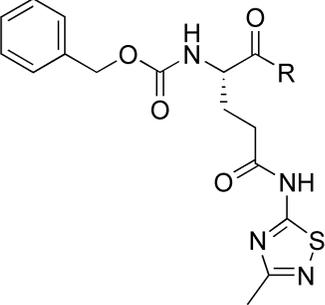
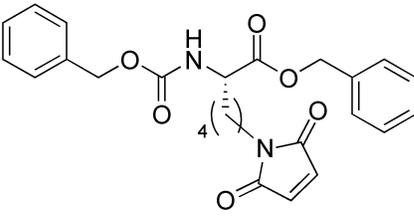
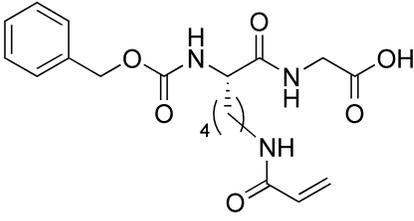
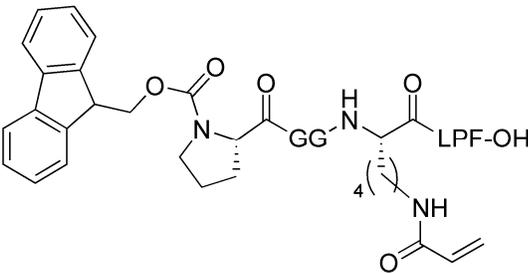
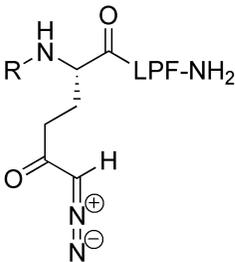
Bien que cette classe d'inhibiteurs mène, progressivement, à l'inactivation totale de l'enzyme, laissant présager une réaction covalente avec la cystéine catalytique du site actif, très peu d'informations structurales ont été obtenues sur le mode exact de liaison de ces molécules. En effet, mis à part pour la classe des diazométhylcétone, aucune structure cristalline de la TG2 inhibée irréversiblement n'est répertoriée dans la littérature à ce jour. La Figure 1.3, présentée ci-dessous, présente la structure cristalline de la hTG2<sup>51</sup> (code PDB 2Q3Z, juillet 2011, 2,00 Å) liée de manière covalente, via la cystéine du site actif, à la molécule **1.13** du Tableau 1.2.



**Figure 1.3 Structure cristalline de la hTG2 inhibée irréversiblement à l'aide d'une molécule de la classe des diazométhylcétone<sup>51</sup>**

**Tableau 1.2 Différentes structures d'inhibiteurs irréversibles de la TG2**

Classe	Molécule	$\frac{k_{inact}}{K_I}$ ( $\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
halogénométhylcétone	 <p><b>1.1</b></p>	12 <sup>95</sup>
	 <p><b>1.2</b></p>	0,53 <sup>96</sup>
3-halogéno-4,5-dihydroisoxazole	 <p><b>1.3</b></p>	0,0019 <sup>101</sup>
	 <p><b>1.4</b></p>	0,57 <sup>99</sup>
époxyde	 <p><b>1.5</b></p>	0,55 <sup>103</sup>
	 <p><b>1.6</b></p>	2,03 <sup>103</sup>

Classe	Molécule	$\frac{k_{inact}}{K_I}$ (x $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
1,2,4-thiadiazoles	<p>R = Gly-OH, OH</p>  <p><b>1.7 et 1.8</b></p>	<p><math>3,3^{104}</math> <math>8,9^{104}</math></p>
accepteurs de Michael	 <p><b>1.9</b></p>  <p><b>1.10</b></p>  <p><b>1.11</b></p>	<p><math>0,0171^{106}</math> <math>3,00^{103}</math> <math>0,011^{62}</math></p>
diazométhylcétone	<p>R = AcPQP, AcP</p>  <p><b>1.12 et 1.13</b></p>	<p><math>2,9^{100}</math> <math>8,3^{51}</math></p>

Le Tableau 1.2 montre quelques exemples d'inhibiteurs irréversibles de la TG2. En guise de comparaison, la valeur de  $k_{inact}/K_I$ , un paramètre cinétique démontrant l'efficacité d'un inhibiteur irréversible, est donnée pour chacune des molécules. À noter qu'une valeur de  $k_{inact}/K_I$  plus grande que  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  montre une très bonne efficacité de l'inhibiteur<sup>108</sup>.

Il est possible de remarquer que, selon ce tableau, la molécule la plus simple, l'iodoacétamide (**1.1**), présente la meilleure efficacité, tandis qu'une molécule beaucoup plus complexe, utilisant une séquence de reconnaissance de la TG2 basée sur la séquence PNPQLPF, soit la molécule **1.11**, possède une efficacité, étonnamment, bien moindre. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'iodoacétamide est une très petite molécule pouvant se faufiler facilement jusqu'au site actif de l'enzyme, possédant, de plus, un groupement électrophile très réactif. Ceci semble être un avantage du côté de l'efficacité, mais se révèle aussi être un grand désavantage pour l'utilisation intracellulaire de cette molécule comme inhibiteur irréversible de la TG2. En effet, l'iodoacétamide aura tendance à réagir avec tous les nucléophiles qu'elle croisera, rendant cette molécule dépourvue de toute sélectivité.

En revanche, la molécule **1.11** peut être utilisée en milieu intracellulaire sans problèmes et elle démontre une spécificité exceptionnelle, ne réagissant pas, pour une même concentration, avec une enzyme très similaire, le FXIIIa<sup>62</sup>

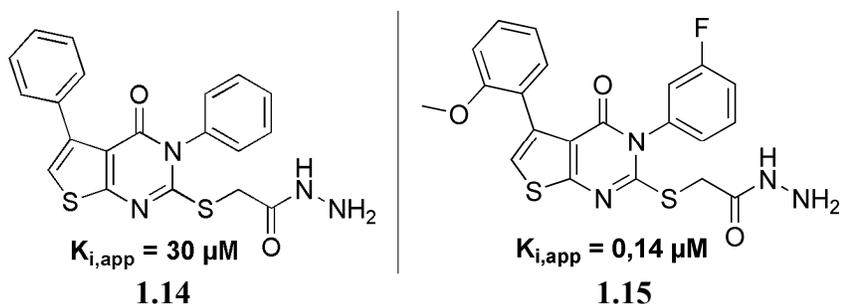
#### 1.3.5.2. Les inhibiteurs réversibles

La seconde classe d'inhibiteurs de la TG2 est celle des inhibiteurs réversibles. Ceux-ci ont pour caractéristique de diminuer l'activité enzymatique en se liant à l'enzyme d'une manière non-covalente. Le fait que la liaison de ces inhibiteurs avec la protéine repose essentiellement sur des interactions intermoléculaires fait en sorte qu'une perturbation des conditions du milieu dans lequel se retrouve le complexe enzyme-inhibiteur peut mener à la dissociation de ce complexe, et, donc, au retour de l'activité enzymatique.

Contrairement aux inhibiteurs irréversibles, très peu d'inhibiteurs réversibles de la TG2 sont connus à ce jour. Le plus connu reste certainement le GTP et son homologue le GDP, permettant l'inhibition allostérique de l'enzyme<sup>109</sup>. En effet, ces molécules vont se lier à l'enzyme dans un site différent du site actif entraînant un changement structural<sup>110,111</sup> chez

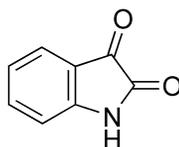
celle-ci faisant ainsi diminuer son affinité pour les substrats, réduisant, par le fait même, l'efficacité de la réaction catalytique.

La découverte de la première classe d'inhibiteurs réversibles synthétiques revient certainement au groupe de Stein, découverte réalisée grâce à un criblage à haut débit effectué à l'aide de 56 500 molécules<sup>60</sup>. Ce criblage a permis d'identifier le potentiel inhibitoire de la molécule **1.14** envers la TG2. Cette découverte a permis au groupe de Stein de s'intéresser au squelette thiéno[2,3-d]pyrimidin-4-one acylhydrazide<sup>112</sup> en réalisant une étude structure-activité menant, entre autre, à la synthèse de la molécule **1.15** possédant un pouvoir inhibitoire environ 200 fois supérieur à la molécule de départ<sup>112,113</sup>. De plus, une étude cinétique plus poussée de cette famille d'inhibiteurs a permis de définir ces molécules comme étant des inhibiteurs à liaison lente qui se lieraient au site de liaison du GTP ou dans un site le régulant<sup>112</sup>, menant à un changement de conformation chez l'enzyme l'entraînant dans une forme inactive. Ce mode d'action est peu surprenant vue la grande ressemblance des structures développées par le groupe de Stein avec les purines, constituées d'un cycle pyrimidine juxtaposé à un imidazole.



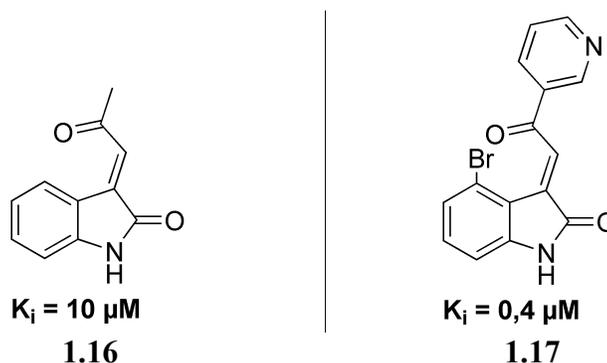
**Figure 1.4 Inhibiteurs à liaison lente de la TG2 basés sur le squelette thiéno[2,3-d]pyrimidin-4-one acylhydrazide**

Plus récemment, le groupe de Khosla a découvert la classe des 3-acylidène-2-oxoindoles<sup>114</sup>, basée sur la structure de l'isatine (Figure 1.5). L'hypothèse, dans ce cas, vient du fait que cette molécule possède un groupement  $\alpha$ -cétamide cyclique qui pourrait mimer la chaîne  $\gamma$ -carboxamide d'un substrat donneur de la TG2<sup>114</sup>.



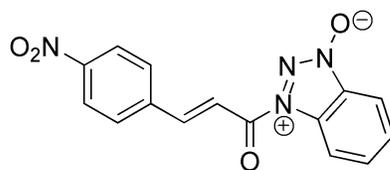
**Figure 1.5 Structure de l'isatine**

Le groupe de Khosla a mené une étude structure-activité en synthétisant différents analogues de l'isatine, comme les molécules **1.16** et **1.17**. Ce groupe s'est aussi intéressé au mode d'inhibition des membres de cette famille et une étude cinétique complète a permis d'identifier une inhibition de type mixte.



**Figure 1.6 Inhibiteurs mixtes de la famille des 3-acylidène-2-oxoindoles**

Finalement, notre groupe de recherche a aussi découvert une classe d'inhibiteurs basée cette fois sur le squelette trans-cinnamoyle. La découverte de cette nouvelle famille fut plutôt inattendue. En effet, notre groupe de recherche utilise depuis longtemps le groupement Cbz en N-terminal de différents peptides afin de conférer une affinité envers la TG2 accrue aux molécules<sup>115</sup>. En s'intéressant à l'importance de la rigidité du groupement Cbz afin de conférer cette affinité, un sous-produit réactionnel synthétique, la molécule **1.18**, a été isolé et testé biologiquement et il s'est révélé plus actif que les molécules initialement ciblées<sup>116</sup>.

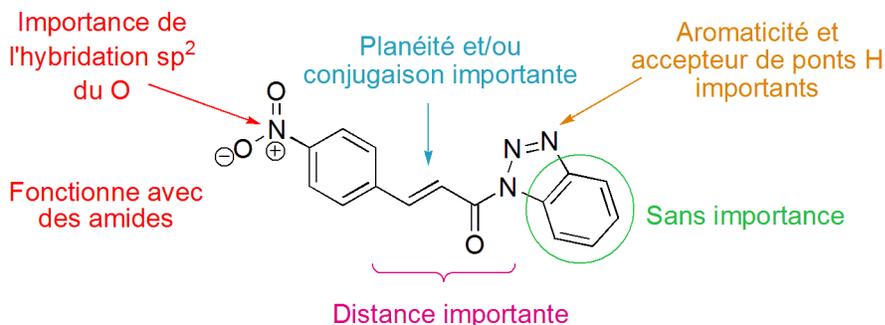


**1.18**

**Figure 1.7 Inhibiteur compétitif obtenu par isolation d'un sous-produit de réaction**

Une étude cinétique complète effectuée à l'aide de la molécule **1.18** a permis d'attribuer une inhibition de type compétitif par rapport au substrat donneur aux membres de cette famille<sup>116</sup>. Ceci signifie que l'enzyme ne peut lier au même moment l'inhibiteur et le substrat donneur et que la liaison de cet inhibiteur à l'enzyme ne nécessite pas une liaison préalable de ce substrat au site actif.

De plus, une étude structure-activité a permis de tirer plusieurs conclusions sur l'importance de différents éléments au sein des inhibiteurs afin de leur conférer un bon pouvoir inhibitoire<sup>116,117</sup>. Ces conclusions sont illustrées à la Figure 1.8<sup>118</sup>.

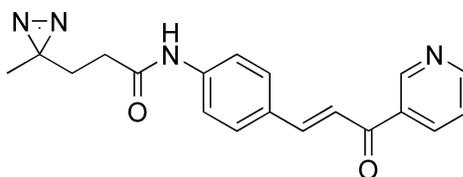


**Figure 1.8 Conclusions tirées de l'étude structure-activité des dérivés trans-cinnamoyle<sup>116,117</sup>**

### 1.3.6. Aperçu du projet de recherche

#### 1.3.6.1. Identification et schématisation du mode de liaison des inhibiteurs trans-cinnamoyle

Bien qu'ayant démontré un caractère d'inhibiteur compétitif pour les inhibiteurs de type trans-cinnamoyle, le mode de liaison au sein de l'enzyme était toujours inconnu. Il était donc très difficile d'effectuer la conception rationnelle de structure, ne connaissant pas les résidus importants pour la liaison des molécules dans la protéine. De plus, la TG2 étant très difficile à cristalliser, une identification du site de liaison des inhibiteurs par photomarquage a été envisagée. Pour ce faire, la molécule **1.19** a été synthétisée<sup>119</sup>.



**1.19**

**Figure 1.9 Structure du photomarqueur développée sur la base du squelette trans-cinnamoyle**

Le groupement diazirine contenu dans cette molécule est sensible aux rayons UV<sup>120</sup>. Sous l'action de ceux-ci, un carbène hautement réactif est généré permettant la formation quasi-instantanée d'une liaison covalente entre l'inhibiteur et le résidu à proximité du

carbène<sup>121-123</sup>. Par la suite, via une analyse par LC-MS/MS, il est possible d'identifier les résidus marqués par la molécule<sup>119</sup>.

Par contre, cette technique ne permet pas d'obtenir beaucoup plus d'informations sur le mode de liaison sans être couplée à de l'arrimage moléculaire, permettant de schématiser l'orientation, au sein de l'enzyme, de la molécule. Ce travail sera présenté aux Chapitres 2 et 5.

#### 1.3.6.2. Expression et purification de la TG2 humaine

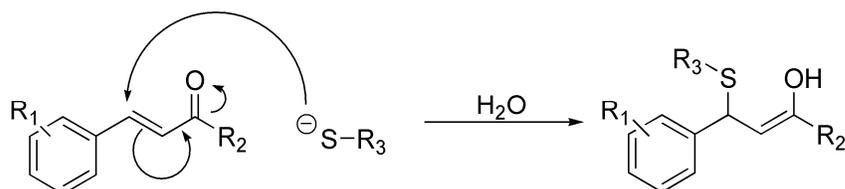
Depuis 1995, notre groupe de recherche travaille avec la TG2 issue des foies de cobaye (gplTG2). Cette enzyme a été choisie pour son excellente similitude et sa bonne identité avec l'enzyme humaine (hTG2)<sup>124,125</sup>. De plus, l'enzyme de foie de cobaye présente l'avantage, contrairement à son homologue humain, d'être une bonne candidate à l'expression recombinante dans les bactéries. Par contre, la gplTG2 reste moins bien caractérisée structurellement que la hTG2 et ne représente pas la cible pharmacologique réelle.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la création d'un nouveau plasmide ayant pour caractéristique d'ajouter, en N-terminal de la hTG2, une autre protéine, la glutathion S-transférase (GST). Cette protéine est reconnue pour faciliter le repliement et ainsi accroître la solubilité des protéines auxquelles elle est rattachée<sup>126</sup>. De plus, la GST possède une très bonne affinité pour le glutathion (GSH), un petit peptide, permettant d'utiliser la chromatographie par affinité comme méthode de purification, la rendant très spécifique. De plus, dans la conception de notre nouveau plasmide, une séquence contenant un site de clivage reconnu par la protéase PreScission<sup>MC</sup> (PSP) a été introduite entre la GST et la hTG2 apportant deux avantages : l'obtention de la hTG2 libre ainsi que l'ajout d'un second niveau de purification. En effet, le clivage pouvant se faire directement sur la colonne d'affinité au glutathion, ceci permettra de relâcher, de manière spécifique, les protéines contenant le site de reconnaissance de la PSP, soit exclusivement la hTG2 dans ce cas. Ce travail sera approfondi au Chapitre 2.

#### 1.3.6.3. La synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs réversibles

Jusqu'à présent, notre groupe de recherche s'est intéressé au squelette trans-cinnamoyle comme charpente de base pour la synthèse d'inhibiteurs réversibles<sup>116,117</sup>. Par

contre, la présence au sein de ce squelette d'une liaison double susceptible aux additions de Michael diminue grandement le potentiel d'utilisation en milieu cellulaire de ce type de molécules. En effet, les cellules contiennent un grand nombre de thiols, comme le glutathion<sup>127</sup>, susceptible de réagir avec nos molécules<sup>128,129</sup>, comme le montre la Figure 1.10.



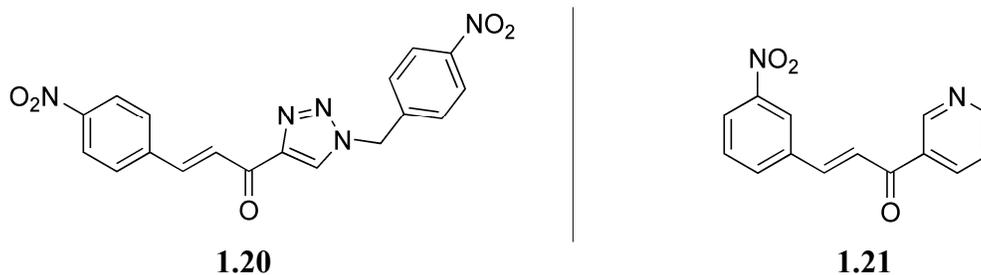
**Figure 1.10 Mécanisme d'addition de thiol sur un dérivé trans-cinnamoyle**

Afin de diminuer, et de préférence enrayer, cette susceptibilité à l'attaque des thiols de nos inhibiteurs, de nouvelles molécules seront synthétisées et testées à la fois pour déterminer leur pouvoir inhibitoire envers la TG2, mais aussi leur susceptibilité à l'attaque des thiols. Ces nouvelles molécules exploreront l'ajout de groupements sur la liaison double du cinnamoyle afin de diminuer son électrophilie ou encore en créant une gêne stérique, le remplacement de la liaison double par différents cycles et hétérocycles ou encore l'utilisation d'une liaison triple en remplacement de la liaison double. Tout ceci sera l'objet du Chapitre 3.

#### 1.3.6.4. Études cinétiques approfondies du mode d'inhibition des inhibiteurs réversibles avec la TG2

Bien que notre groupe ait déjà déterminé que les inhibiteurs basés sur le squelette trans-cinnamoyle soit de type compétitif, la firme Evotec, ayant testé en cellules quelques-uns de nos meilleurs composés, a cru percevoir une relation entre la concentration de calcium utilisée et le potentiel inhibitoire de nos molécules. De plus, bien que la vitesse initiale de la réaction enzymatique soit affectée à la base par la présence de nos inhibiteurs, une inhibition dépendante du temps, plus ou moins importante en fonction du composé testé, semble se produire.

Pour toutes ces raisons, plusieurs études cinétiques seront réalisées avec deux de nos molécules les plus prometteuses, présentées à la Figure 1.11, afin d'en connaître davantage sur leur mode d'action, ce qui fera l'objet des Chapitres 4 et 5.



**Figure 1.11 Inhibiteurs réversibles de la TG2 basés sur le squelette trans-cinnamoyle**

#### 1.3.6.5. Identification du site de liaison du substrat accepteur

Finalement, le dernier volet de ce projet de recherche consiste en l'utilisation de l'expertise développée dans la synthèse et l'utilisation de photomarqueurs<sup>119</sup> afin de caractériser le site de liaison du substrat accepteur de la TG2, soit le dérivé aminé.

La découverte du site de liaison du substrat accepteur mènera certainement à une meilleure compréhension du mécanisme emprunté par la TG2 et pourrait permettre le développement de substrats plus spécifiques afin d'effectuer du marquage fluorescent ou pour être en mesure de discriminer la TG2 du FXIII par exemple. Cette découverte pourrait aussi ouvrir la voie au développement de nouvelles classes d'inhibiteurs, basées sur la structure du substrat accepteur plutôt que sur celui du substrat donneur.

Pour ce faire, la conception d'un nouveau photomarqueur jouant le rôle d'un substrat accepteur de la TG2 se basera essentiellement sur l'inclusion, au sein de la structure, de trois éléments :

- 1) Une séquence peptidique de haute affinité envers la TG2 incluant un résidu lysine<sup>130</sup>
- 2) Un groupement diazirine<sup>131,132</sup>
- 3) Une biotine<sup>133</sup>.

L'ajout de la biotine au design de ce photomarqueur a été pensé suite aux résultats obtenus après avoir effectué le photomarquage de la TG2 à l'aide de l'inhibiteur réversible<sup>119</sup>. En effet, l'analyse LC-MS/MS fut complexe due au fait que la digestion enzymatique de la TG2 par la trypsine génère un nombre extrêmement grand de peptides parmi lesquels seulement quelques-uns ont subi l'addition du marqueur. En ajoutant une biotine à la structure de notre nouvelle molécule, une étape de purification par chromatographie d'affinité peut être ajoutée après la digestion enzymatique. En effet, la biotine est reconnue pour son affinité avec l'avidine, une

protéine qu'il est possible de se procurer greffée à un support solide<sup>133</sup>. Le Chapitre 5 donnera plus de détails quant à cette portion du projet de recherche.

## **Chapitre 2 : La transglutaminase tissulaire : modèles, expression, purification et données cinétiques**

### **2.1. L'importance des modèles**

Un des grands défis des chimistes d'aujourd'hui est d'être en mesure de corrélérer leurs résultats à l'aide d'un modèle. L'acquisition de données, quelle que soit leur nature, aura, dans la grande majorité des cas, pour but de valider une hypothèse basée sur un modèle tangible, une représentation schématique d'une problématique définie. Il est possible de penser, par exemple, à l'évolution extraordinaire du modèle atomique qui s'est effectuée au cours du XIX<sup>e</sup> et XX<sup>e</sup> siècle, où la découverte de la présence de particules chargées dans l'atome a permis la transformation du modèle « boule de billard » de Dalton au modèle « plum-pudding » de Thomson ou encore l'expérience de la feuille d'or de Rutherford qui a permis son évolution vers le modèle nucléaire.

Le domaine de la chimie bio-organique n'y échappe évidemment pas. En enzymologie plus particulièrement, la problématique étudiée se tournera vers des macromolécules, constituées d'acides aminés, les protéines. L'enzymologiste tentera, par conséquent, d'obtenir une image la plus fidèle possible de l'objet étudié. Pour ce faire, plusieurs méthodes de caractérisation sont à sa disposition comme, par exemple, le séquençage de l'ADN, pour déterminer la structure primaire, ou encore la cristallographie ou la RMN, permettant de dresser un portrait un peu plus juste de la forme tridimensionnelle de la protéine étudiée. Dans certains cas, par contre, il sera hautement difficile d'être en mesure d'obtenir une image tridimensionnelle de l'objet étudié. Dans ces cas, des techniques de modélisation moléculaire sont plutôt envisagées.

La TG2 fait partie de ces enzymes pour lesquelles obtenir des données structurales est un défi en soit. En effet, cette enzyme est reconnue pour être difficile à cristalliser dans des conditions natives et la taille du système, d'environ 80 kDa selon le type observé, représente un obstacle majeur, pratiquement infranchissable à ce jour, pour la RMN.

Parmi les travaux qui seront présentés au cours de ce chapitre, l'élaboration du modèle d'homologie de la forme ouverte de la gpITG2 a été publiée, en 2009, en complément d'un article portant sur l'identification du site de liaison d'un inhibiteur réversible<sup>119</sup>, dans « *Biochemistry* », tandis que ceux portant sur la construction du plasmide d'expression de la fusion GST-hTG2, ainsi que le processus d'optimisation des conditions d'expression et de purification de l'enzyme ont permis, en 2013, la parution d'un article complet<sup>134</sup> dans « *Protein Expression and Purification* ».

## **2.2. L'élaboration de modèles d'homologie pour la gpITG2**

Notre groupe de recherche travaille, depuis ses débuts, avec la TG2 de foie de cobaye. Le choix d'utilisation de cette TG2 repose sur le fait que sa structure primaire présente une excellente similitude (95 %) et une très bonne identité (82 %) avec la cible pharmacologique réelle, soit l'enzyme humaine<sup>124,125</sup>. De plus, celle-ci représente un meilleur candidat pour l'expression recombinante vue sa meilleure solubilité. En guise de comparaison, il est possible d'obtenir, à l'aide d'un litre de culture, autour de 25 mg de gpITG2<sup>135</sup>, comparativement à seulement entre 0,6 et 5 mg pour la hTG2<sup>59,136,137</sup>, faisant de la gpITG2 une enzyme avec laquelle il est plus facile de travailler à large échelle.

Par contre, d'un point de vue structurel, la gpITG2 est moins bien caractérisée dans la littérature. En effet, aucune structure cristalline de cette enzyme spécifique n'est encore publiée. C'est pourquoi notre groupe de recherche s'est intéressé à la confection de modèles d'homologie de la gpITG2, afin de pouvoir formuler et venir supporter, schématiquement, différentes hypothèses, tant au niveau mécanistique que sur le plan de la liaison des inhibiteurs développés par le groupe.

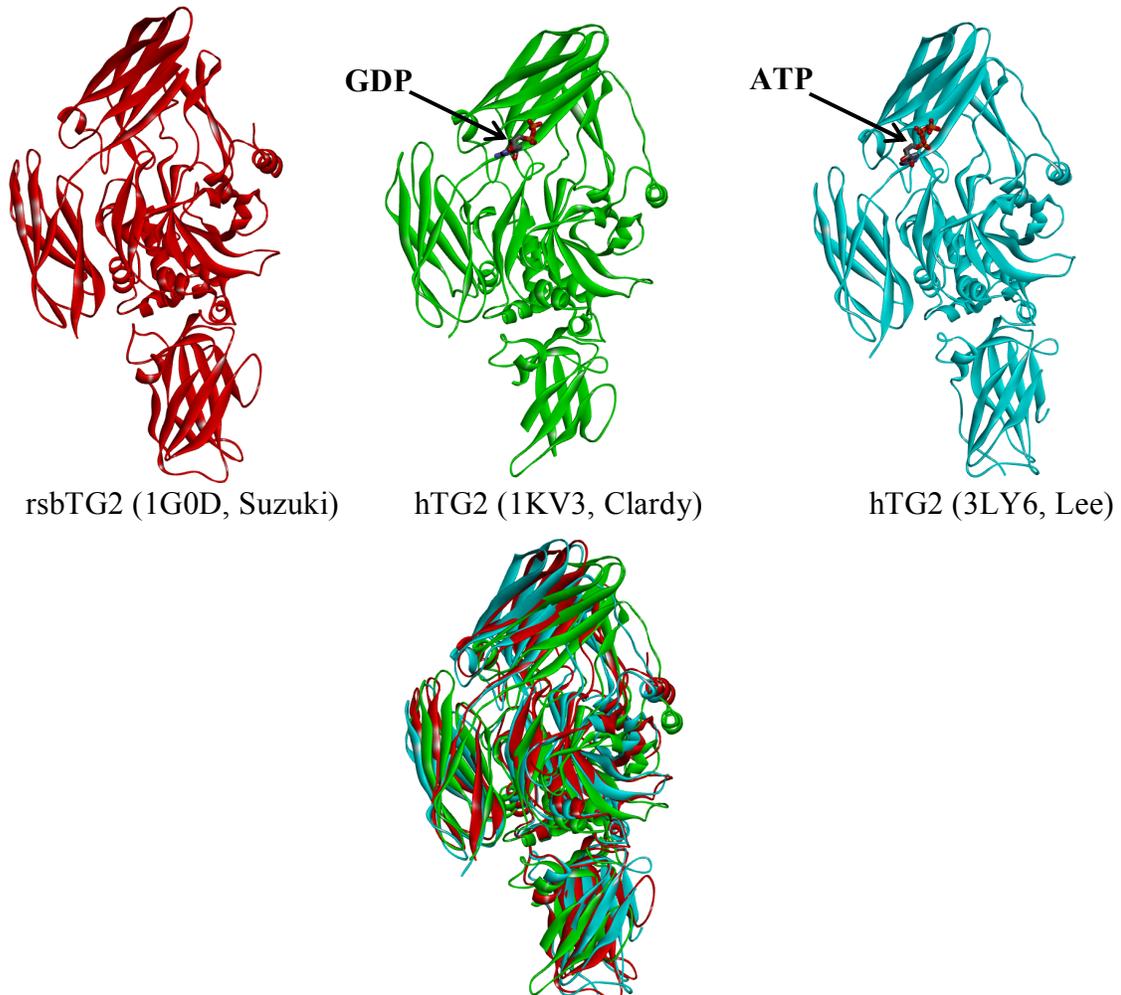
Néanmoins, avant de présenter plus en détails la conception et la validation des modèles développés, quelques précisions sur les différentes conformations que la TG2 peut adopter doivent être réalisées.

### **2.2.1. La TG2, une enzyme aux multiples personnalités**

Comme mentionné dans le chapitre précédent, la TG2 est constituée d'un sandwich- $\beta$  en N-terminal, de deux barils- $\beta$  en C-terminal et d'un cœur  $\alpha/\beta$  où se situe l'activité

catalytique<sup>37</sup>. Divers groupes ont menés des études structurales afin d'obtenir une représentation tridimensionnelle de cette enzyme. Par contre, à ce jour, la TG2 n'a toujours pas été cristallisée liée au calcium, ion essentiel à son activité enzymatique<sup>138</sup>.

La seule structure cristalline d'une TG2 non-humaine a été obtenue par le groupe de Suzuki, ceux-ci ayant résolue la structure de la rsbTG2, issue du foie de la dorade rose (code PDB 1G0D, février 2009, 2,50 Å)<sup>139</sup>, en se basant sur la structure de la sous-unité A du FXIIIa humain, préalablement obtenue par le groupe de Teller (code PDB 1GGU, février 2009, 2,10 Å)<sup>140</sup>. La structure de la TG2 découverte par le groupe de Suzuki est la seule obtenue à ce jour en absence complète de ligand.



Superposition des trois structures  
**Figure 2.1 Différentes structures cristallines de la TG2**

Les autres structures cristallines de TG2 répertoriées dans la littérature sont toutes de souche humaine. Deux ont été obtenues via co-cristallisation en présence d'un inhibiteur allostérique<sup>11,35</sup>. De son côté, le groupe de Clardy a réussi à cristalliser la hTG2 en interaction avec le GDP (code PDB 1KV3, février 2009, 2,80 Å)<sup>37</sup>, tandis que le groupe de Lee a obtenu la hTG2 liée à l'ATP (code PDB 3LY6, août 2010, 3,14 Å)<sup>141</sup>.

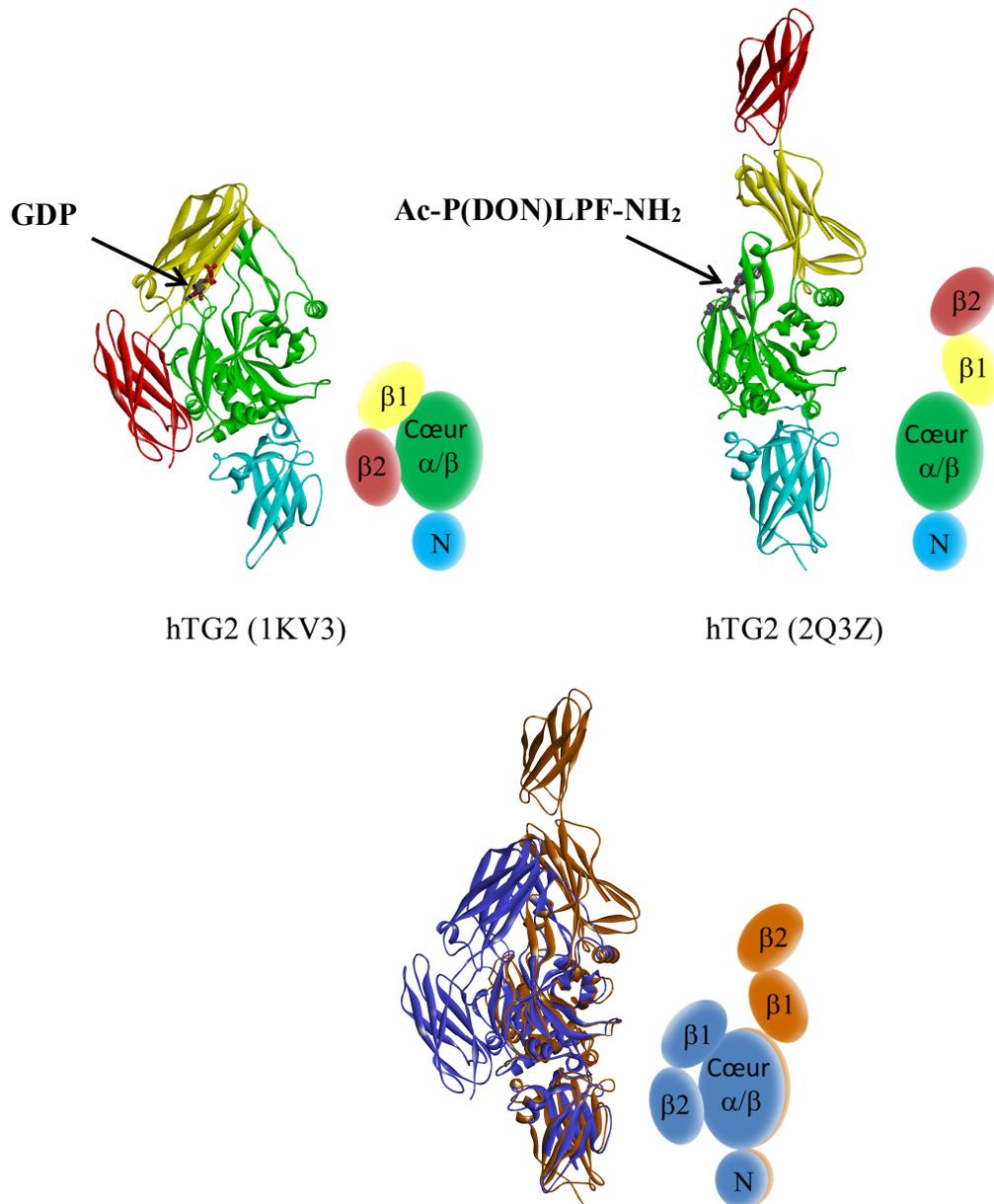
Comme le montre la Figure 2.1, les structures des trois enzymes obtenues par ces groupes sont très similaires, présentant toutes une conformation où l'enzyme est plutôt repliée sur elle-même.

Par contre, récemment, le groupe de Khosla a fait une découverte majeure quant à la conformation qu'adopterait la TG2 dans sa forme active. En effet, dans ce cas, la hTG2 a été cristallisée suite à l'inhibition irréversible de l'enzyme avec un inhibiteur développé par son groupe, l'Ac-P(DON)LPF-NH<sub>2</sub>, dont la structure a été présentée dans le chapitre précédent (molécule **1.12**). Ce complexe covalent enzyme-inhibiteur se trouve à être un bon mime de la forme acyl-enzyme de la protéine, et, par conséquent, est la forme cristallisée de l'enzyme qui serait la plus près de la forme active de celle-ci ayant été obtenue jusqu'à présent (code PDB 2Q3Z, juillet 2011, 2,00 Å)<sup>51</sup>.

Comme il peut être vu à la Figure 2.2, la structure cristalline du mime de l'acyl-enzyme montre une conformation de la protéine beaucoup plus allongée que celles précédemment publiées. En fait, lorsque les parties N-terminales de la forme fermée (1KV3)<sup>37</sup> et de la forme ouverte (2Q3Z)<sup>51</sup> sont superposées, plus de 120 Å séparent les parties C-terminales de ces deux conformations<sup>51</sup>. Ce changement de la structure tertiaire de l'enzyme, entre la forme fermée et la forme ouverte, est relié à une modification de la structure secondaire dans la partie charnière qui relie le cœur  $\alpha/\beta$  au baril- $\beta$ 1. En effet, dans la forme fermée, les résidus L312 à R317 forment un brin- $\beta$  tandis qu'ils sont plutôt agencés en hélice- $\alpha$  dans la forme ouverte, induisant un réarrangement du squelette carboné de l'enzyme jusqu'au site actif<sup>51</sup>.

De plus, étonnement, cette forme ouverte de l'enzyme présente un pont disulfure entre deux cystéines voisines, soit les résidus 370 et 371, ce qui force le lien peptidique entre ces deux acides aminés à adopter une configuration *cis*, entraînant une distorsion du squelette carboné de la protéine<sup>51</sup>. Aucun pont disulfure n'a été répertorié dans les structures de la forme

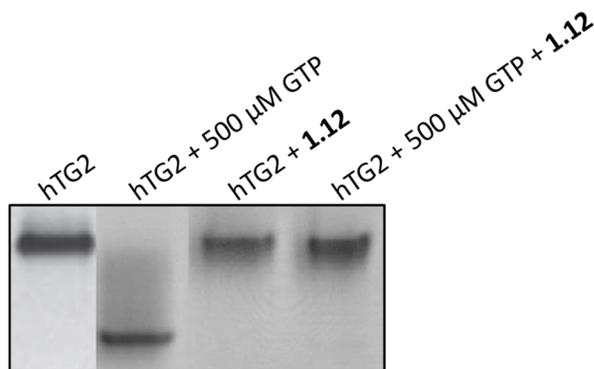
fermée de la TG2 et il est connu que la forme native de l'enzyme n'en présente pas non plus<sup>142-144</sup>. Par contre, des études ont démontré que la TG2 peut être désactivée via la formation de ponts disulfures au sein de sa structure à l'aide d'agents oxydants, et que ces liens n'impliquent pas la cystéine catalytique, soit la C277 chez la forme humaine de l'enzyme<sup>94,145</sup>.



Superposition des deux structures

**Figure 2.2** Structure cristalline d'un mime de l'intermédiaire acyl-enzyme de la hTG2<sup>51</sup>

Le groupe de Khosla s'est intéressé à l'influence, sur l'activité enzymatique de la hTG2, de la présence de ponts disulfures. Ils sont arrivés à la conclusion que trois cystéines, soit les résidus C230, C370 et C371, pourraient être utilisées, en milieu cellulaire, comme interrupteur pour activer ou désactiver l'activité de la hTG2. En effet, ils ont trouvé que la présence d'un pont disulfure entre la C370 et la C371 mène à la désactivation de l'enzyme, tout comme la présence d'un lien S-S entre la C230 et la C370. Fait intéressant, bien qu'aucune hTG2 cristallisée n'ait montré la présence d'une liaison S-S entre la C230 et la C370, l'analyse des structures montre que ces deux résidus se situent assez près l'un de l'autre pour permettre la formation d'une telle liaison, et ce, autant dans la forme ouverte que dans la forme fermée de l'enzyme<sup>142</sup>. De plus, ils ont démontré que la présence de la C230 à proximité de la C370 favorise la formation subséquente du pont disulfure avec la C371, menant à l'inactivation de l'enzyme. C'est pourquoi les auteurs proposent que la C230 joue le rôle d'un senseur rédox en milieu cellulaire en initiant l'oxydation menant à l'inactivation de l'enzyme. Ce mécanisme serait spécifique à la TG2 puisque, bien que d'autres types de TGases (TG1, TG4, TG5 et TG7) possèdent des cystéines vicinales au sein de leur structure, la TG2 est la seule possédant une troisième cystéine à proximité<sup>142</sup>. De plus, il est intéressant de noter que, dans les conditions testées par les auteurs, la présence de calcium dans l'environnement de l'enzyme diminue la propension de celle-ci à former l'un ou l'autre des deux ponts disulfures étudiés<sup>142</sup>.

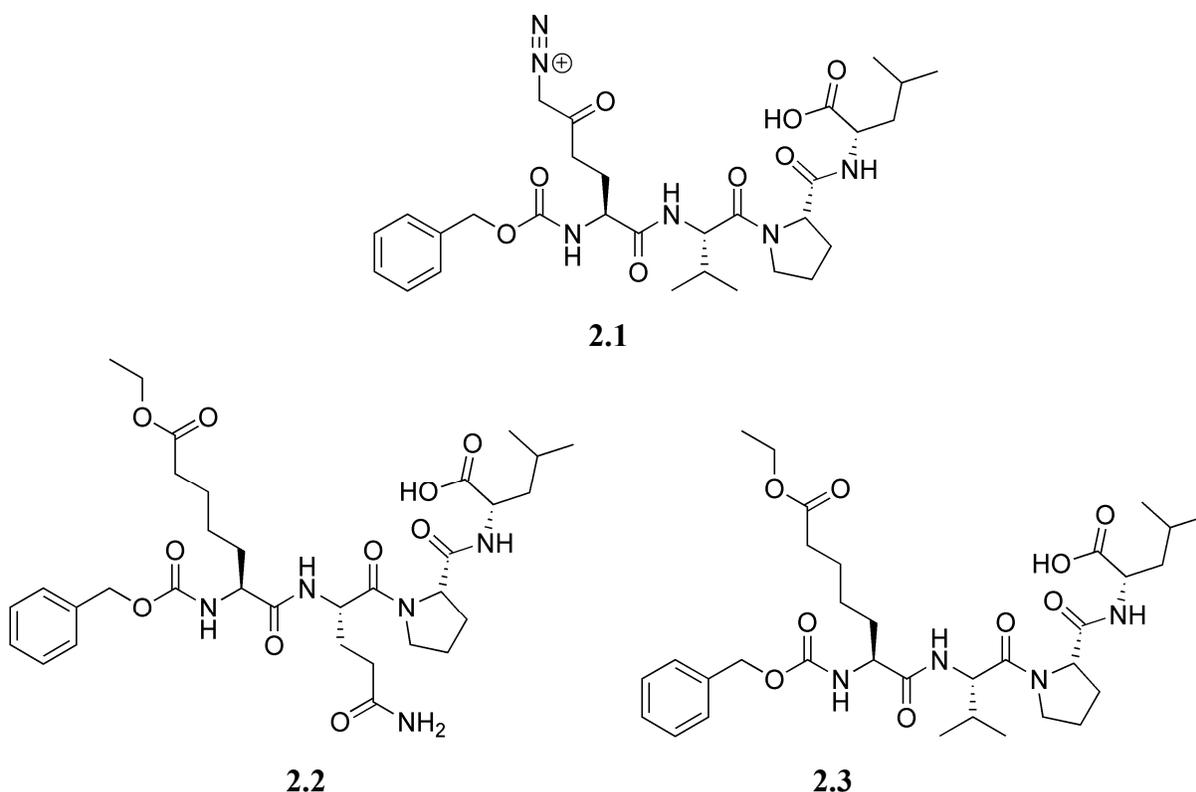


**Figure 2.3 Migration sur gel natif de différents conformères de la TG2<sup>51,110</sup>**

L'oxydation de la hTG2 aurait aussi une influence sur la conformation de la protéine. Afin de le démontrer, le groupe de Khosla a utilisé les gels natifs, consistant à ne pas dénaturer la protéine avant de procéder à la migration, en absence d'agents dénaturants. Dans ce cas, le

déplacement de la protéine au sein du gel est affecté, notamment, par la conformation de celle-ci. Lors de cette étude, les auteurs ont montré que, dans un milieu oxydant, la hTG2 a plutôt tendance à adopter la forme ouverte. Les auteurs suggèrent que la présence de ponts disulfures diminue la flexibilité de la structure dans la région charnière, soit entre le cœur  $\alpha/\beta$  et le baril- $\beta$ 1, diminuant ainsi la possibilité pour la protéine d'adopter la forme fermée<sup>142</sup>.

Les différentes études de conformations de la TG2 effectuées à l'aide des gels natifs ont aussi démontré, comme le montre la Figure 2.3, qu'en absence de ligands, soit après plusieurs séries de chromatographies par exclusion de taille, la forme ouverte de l'enzyme prédomine, mais que la présence de GTP tend à favoriser la forme fermée<sup>110</sup>. D'un autre côté, une fois que la hTG2 a réagi avec l'inhibiteur irréversible **1.12**, la forme ouverte est favorisée, et ce, même en présence de GTP<sup>51</sup>. Ceci laisse donc présager que la forme ouverte de l'enzyme est celle qui serait impliquée dans la réaction de transamidation.

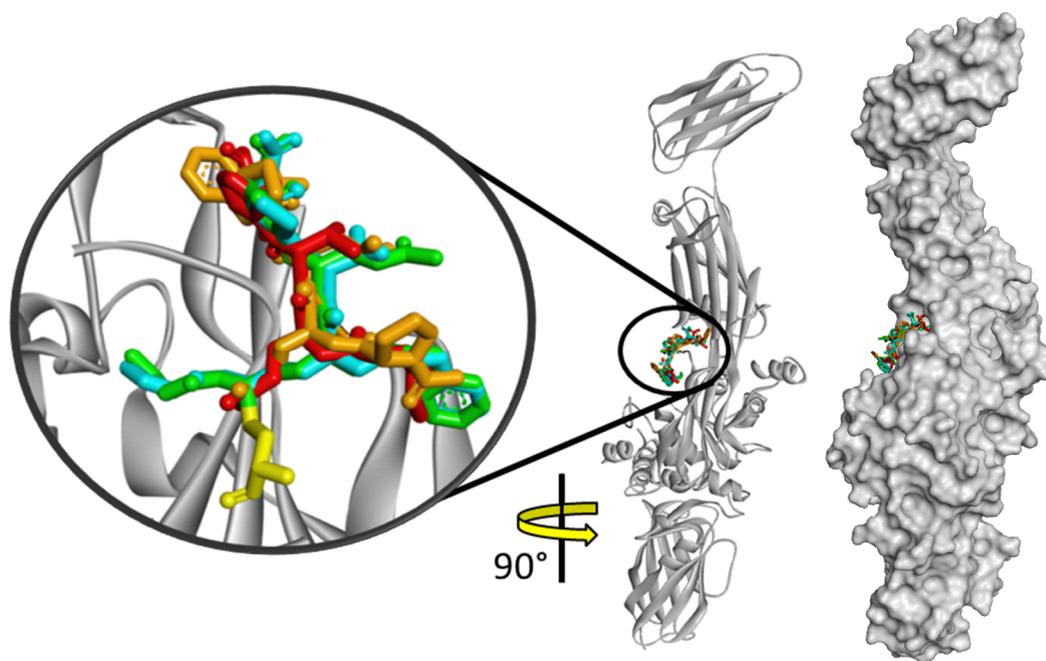


**Figure 2.4 Inhibiteurs irréversibles de la hTG2 développés par la compagnie Zedira**

Finalement, un dernier groupe de recherche, qui s'intéresse au développement de médicaments potentiels pour le traitement de la maladie céliaque et travaillant pour la compagnie allemande Zedira, a récemment réussi à cristalliser la hTG2 en présence

d'inhibiteurs irréversibles (codes PDB 3S3J, 3S3P et 3S3S, mai 2011, 2,25 à 2,50 Å), dont les structures sont présentées à la Figure 2.4 .

Ces trois molécules se lient à la forme ouverte de l'enzyme, comme il est possible de le constater à la Figure 2.5. Les trois structures obtenues suite à la cristallisation de l'enzyme, préalablement inhibée, sont très similaires à celle publiée ultérieurement par le groupe de Khosla<sup>51</sup>, mis à part l'absence de ponts disulfures. De plus, le mode de liaison de leurs trois molécules est semblable à celui de la molécule **1.12**, soit l'Ac-P(DON)LPF-NH<sub>2</sub>, développé par le groupe de Khosla<sup>51</sup>. Tout ceci vient donc renforcer l'hypothèse que la forme ouverte de l'enzyme serait la forme biologiquement active.



**Légende :** Jaune : Cystéine catalytique (C277) ; Rouge : molécule **2.1** ; Vert : molécule **2.2** ; Bleu : molécule **2.3** ; Orange : Ac-P(DON)LPF-NH<sub>2</sub>

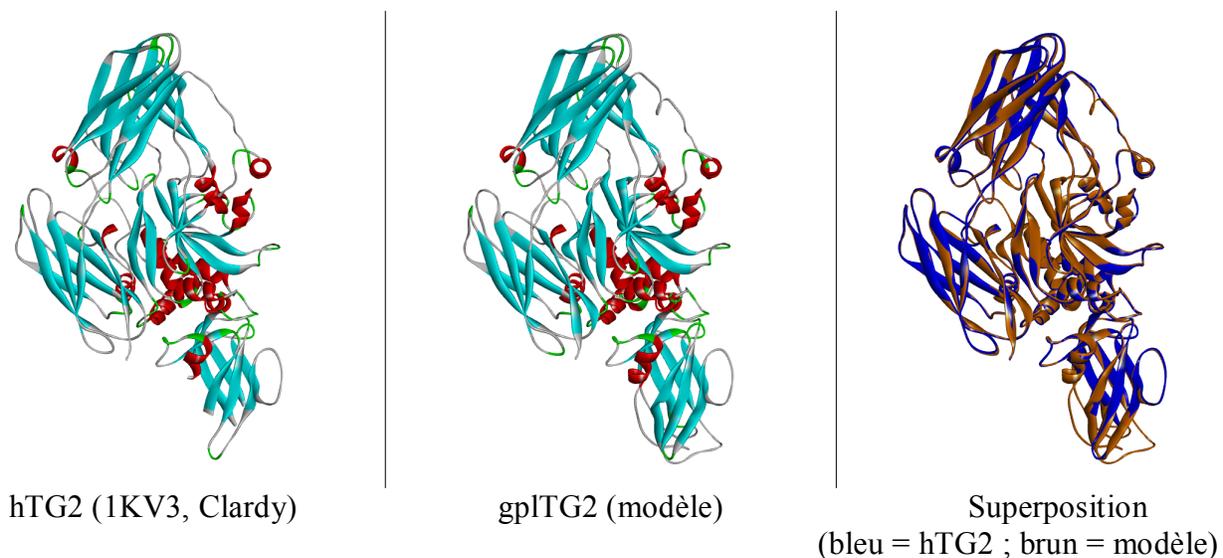
**Figure 2.5 Structure cristalline de différents inhibiteurs irréversibles liés à la hTG2**

### **2.2.2. Construction et validation du modèle d'homologie de la forme fermée de la gpITG2**

Dans le cas de la gpITG2, l'enzyme avec laquelle notre groupe travaille, aucune structure cristalline n'est connue jusqu'à présent. Par contre, la connaissance de diverses

structures de la forme fermée de la TG2 a permis la construction et la validation, par un ancien membre du groupe, le Pr. Roberto A. Chica, d'un modèle d'homologie de la gpITG2 adoptant cette conformation<sup>118,146</sup>.

Pour ce faire, les coordonnées PDB de différentes structures cristallines de formes fermées de TGases ont été utilisées, soit celles de la hTG2 (code PDB 1KV3, mars 2002, 2,80 Å)<sup>37</sup>, de la rsbTG2 (code PDB 1G0D, mai 2001, 2,50 Å)<sup>139</sup>, de la hTG3 (code PDB 1L9M, mai 2002, 2,10 Å)<sup>147</sup> et du hFXIIIa (code PDB 1EVU, mai 2000, 2,01 Å). Les séquences de ces différentes protéines ont été alignées avec celle de la gpITG2 et plusieurs modèles ont été générés à l'aide du logiciel Modeller 8v1<sup>148</sup>. Ces structures ont par la suite été minimisées à l'aide du module Discover d'InsightII puis la qualité des modèles a été analysée à l'aide de différents programmes disponibles en ligne, soit Molprobity<sup>149</sup>, Whatcheck<sup>150</sup> et ProsaII<sup>151</sup>. Un modèle a alors été retenu et soumis à une dynamique moléculaire sans contrainte à 300 K pendant 300 ps, afin de vérifier sa stabilité générale. La Figure 2.6, présentée ci-dessous, montre la grande similarité du modèle retenu avec la structure cristalline de la hTG2 (code PDB 1KV3, février 2009, 2,80 Å)<sup>37</sup>.



**Figure 2.6 Comparaison du modèle d'homologie de la forme fermée de la gpITG2 avec la structure cristalline de la hTG2 (1KV3)**

### 2.2.3. Construction et validation du modèle d'homologie de la forme ouverte de la gpITG2

Subséquentement, la découverte de la forme ouverte de la hTG2 par le groupe de Khosla<sup>51</sup> a incité notre groupe de recherche à construire, pour la gpITG2, un modèle d'homologie de ce nouveau conformère. Pour ce faire, une stratégie similaire à celle utilisée pour la construction du modèle de la forme fermée a été adoptée. Par contre, dans ce cas, les coordonnées PDB d'une seule structure cristalline, soient celles de la hTG2 (code PDB 2Q3Z, octobre 2007, 2,00 Å)<sup>51</sup>, la seule structure cristalline de la forme ouverte connue à l'époque, ont été utilisées comme gabarit pour la construction initiale des modèles. Les détails de la méthodologie employée sont présentés au Chapitre 7.

**Tableau 2.1 Analyse de la qualité des modèles d'homologie de la forme ouverte de la gpITG2<sup>119</sup>**

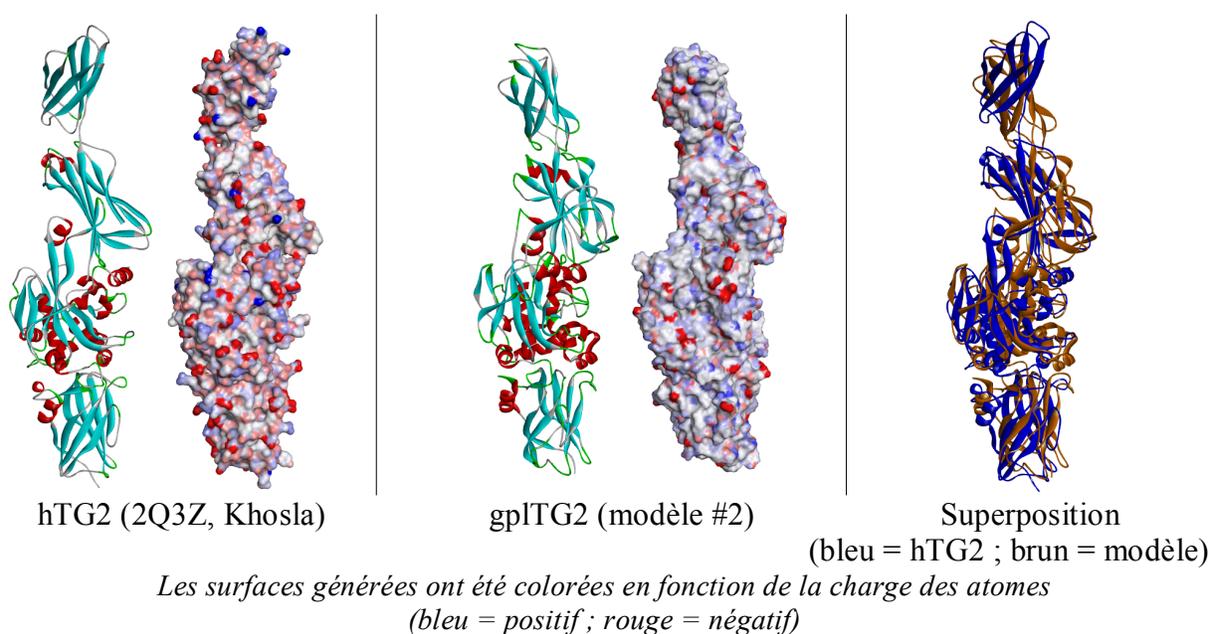
Structure cristalline ou modèle	Énergie totale (kcal)	RMSD <sup>b</sup> (Å)	Qualité du graphique de Ramachandran après minimisation (%)			Nombre de résidus sélectionnés <sup>c</sup> étant aberrants	Test Prosa <sup>d</sup>
			Favorisé	Acceptable	Aberrant		
			<b>2Q3Z<sup>a</sup></b>	N/D	N/D		
<b>1</b>	5113	2,99	86,17	11,5	2,33	0	√
<b>2</b>	4975	4,01	84,72	13,1	2,18	0	√
<b>3</b>	4996	5,59	85,01	11,93	3,06	1	√
<b>4</b>	5000	3,93	84,13	13,54	2,33	2	√
<b>5</b>	4989	4,46	85,59	11,64	2,77	4	×

<sup>a</sup> Coordonnées de la structure cristalline sans minimisation énergétique subséquente. <sup>b</sup> Le RMSD a été calculé pour tous les atomes de la chaîne principale disponibles dans la structure 2Q3Z en utilisant PyMol. <sup>c</sup> Les résidus W241, C277, H305, W332, H335, C336, T360, P361, Q362, E363 and Y519 ont été sélectionnés par rapport à leur importance proposée dans la liaison du substrat donneur et dans la réactivité enzymatique<sup>115</sup> <sup>d</sup> Un crochet (√) indique que les interactions des résidus sont favorables selon ProsaII tandis qu'un « × » indique qu'elles ne le sont pas.

En tout, cinq différents modèles ont été, au départ, générés. Ces cinq structures ont par la suite été minimisées, puis analysées selon différents paramètres, tel que présenté au Tableau 2.1, afin de retenir le meilleur.

Dans un premier temps, le modèle #1 a été rejeté vue son énergie totale plus haute que les autres. En effet, les quatre autres structures possèdent des énergies totales similaires contrairement au modèle #1, et ce, après minimisation énergétique de toutes les structures. De son côté, le modèle #3 a été rejeté sur la base de sa valeur de RMDS significativement plus élevée, tandis que le modèle #5 a été écarté puisqu'il a échoué le test Prosa<sup>151</sup>. Finalement, la discrimination entre le modèle #2 et le modèle #4 s'est effectuée sur la base de résidus choisis pour leur importance proposée dans la liaison du substrat donneur et dans la réactivité enzymatique<sup>115</sup>. En effet, ces deux modèles sont très semblables si tous les paramètres généraux sont observés. Par contre, chez le modèle #4, deux des onze résidus identifiés comme étant potentiellement importants pour la liaison du substrat donneur et la réactivité enzymatique se retrouvent dans une zone aberrante du graphique de Ramachandran. De son côté, le modèle #2 ne présente aucun de ces résidus dans cette situation. C'est pourquoi le modèle #2 a été choisi comme modèle d'homologie de la forme ouverte de la gpITG2.

La Figure 2.7 présente une comparaison tridimensionnelle du gabarit de départ, soit la structure de la hTG2 cristallisée dans la forme ouverte (code PDB 2Q3Z, octobre 2007, 2,00 Å), et du modèle d'homologie de la gpITG2 retenu.



**Figure 2.7** Comparaison du modèle d'homologie de la forme ouverte de la gpITG2 retenu (#2) avec la structure cristalline de la hTG2 2Q3Z

Bien que semblables, ces deux structures présentent quelques différences qu'il est important de souligner. En effet, il est possible de constater, lorsque les structures en rubans sont observées, que les différentes structures secondaires présentes dans le modèle semblent moins bien définies que dans le cas de la structure cristalline utilisée comme référence. De plus, la structure tertiaire du modèle est légèrement plus compacte que celle de la structure cristalline.

Le fait que ce modèle d'homologie semble moins fiable que celui de la forme fermée repose essentiellement sur le fait qu'une seule structure cristalline a pu être utilisée comme gabarit, faute d'existence de d'autres structures de TGase dans la forme ouverte. Ceci a donc diminué, dès le départ, la variété des modèles proposés par le logiciel Modeler 9v2<sup>148</sup>, obligeant, dans un certain sens, ce dernier à aligner la séquence de la gpITG2 sur la structure cristalline de la hTG2. Néanmoins, la grande similitude des séquences de la gpITG2 et de la hTG2 se traduit par l'obtention d'un modèle dont l'allure générale ressemble à celle de la structure utilisée comme référence, de même que la distribution des charges à la surface de l'enzyme<sup>119</sup>.

L'utilisation de ce modèle d'homologie dans des études d'arrimage moléculaire sera présentée au Chapitre 5.

### **2.3. Expression recombinante et purification de la hTG2**

Bien que la gpITG2, par sa facilité d'obtention à large échelle, via l'expression recombinante<sup>135</sup>, et sa grande homologie avec l'enzyme humaine, représente un bon choix de modèle d'études, elle ne représente pas la cible pharmacologique réelle. De plus, le manque de données structurales à son sujet demeure un problème de taille pour l'étude mécanistique, pour l'identification de sites de liaisons de toutes sortes ainsi que pour la conception de nouveaux inhibiteurs. C'est pourquoi notre groupe s'est intéressé à l'optimisation d'une méthode d'expression et de purification de la hTG2.

La littérature rapporte essentiellement, pour l'expression recombinante de cette enzyme, deux types de plasmides. Le premier greffe, en N-terminal de l'enzyme, une séquence polyhistidines<sup>59,136</sup> tandis que le deuxième y greffe une protéine, la glutathion S-transférase

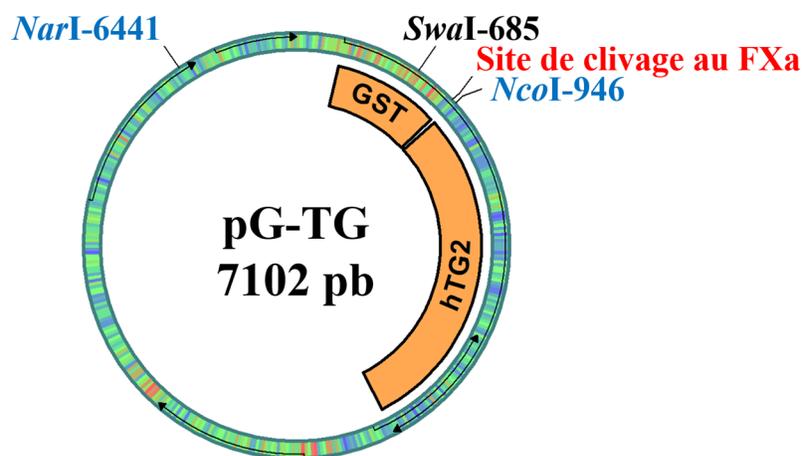
(GST)<sup>137</sup>. Dans les deux cas, les protéines ainsi exprimées auront pour caractéristique de pouvoir être purifiées à l'aide de la chromatographie d'affinité.

Les protéines arborant une séquence polyhistidines pourront être purifiées sur des colonnes où des complexes de Ni-NTA auront été greffés. Dans ce cas, le nickel sera en mesure de chélater l'anneau imidazole contenu dans les histidines, ce qui fera adhérer la protéine à la colonne<sup>152,153</sup>. Suite aux différents lavages permettant d'éliminer les protéines indésirables, une élution à l'aide d'une solution concentrée d'imidazole peut être effectuée, permettant de relâcher l'enzyme d'intérêt. L'avantage, dans ce cas, est que la séquence d'histidines ajoutée à la protéine d'intérêt est très courte, réduisant au minimum les effets indésirables possibles sur le repliement et l'activité enzymatique<sup>154</sup>. D'un autre côté, l'affinité du complexe de nickel pour l'imidazole étant relativement bonne, la constante de dissociation ( $K_d$ ) étant de l'ordre de 1 à 10  $\mu\text{M}$ <sup>155,156</sup>, la rétention non-spécifique de protéines indésirables, contenant elles aussi des histidines à la surface de leur structure, reste une chose courante avec ce type de système.

De leur côté, les protéines auxquelles une GST est ajoutée pourront être purifiées à l'aide de colonnes où le substrat natif de l'enzyme, le glutathion, aura été greffé. Le principal avantage de ce type de système repose sur le fait que, bien que le  $K_d$  du glutathion pour la GST soit plutôt faible, environ 0,5 mM, la spécificité du substrat pour la GST rend ce système moins enclin à la rétention non-spécifique de protéines indésirables. De plus, la GST est connue pour promouvoir la solubilité des protéines auxquelles elle est rattachée<sup>126</sup>. Par contre, la GST étant une protéine de 26 kDa, son ajout est susceptible de causer des ennuis au point de vue de l'analyse structurale, et même de l'activité enzymatique, de la protéine d'intérêt. Néanmoins, ces désagréments peuvent être évités en introduisant une séquence de clivage entre la GST et la protéine d'intérêt qui fera en sorte de pouvoir libérer la protéine d'intérêt de la GST par protéolyse.

Afin de débiter les essais d'expression et de purification de la hTG2 au sein de notre groupe, les plasmides pJLP4<sup>59</sup> et pG-TG<sup>137</sup> nous ont été gracieusement fournis par les groupes de Khosla et de Lai respectivement. Le plasmide pJLP4 contient une séquence hexahistidine en N-terminal de l'enzyme alors que le plasmide pG-TG arbore plutôt une GST au même endroit.

Après transformations de cellules BL21(DE3) chimio-compétentes avec ces deux plasmides, les méthodes d'expression et de purifications préalablement publiées ont été utilisées afin d'effectuer les premiers essais d'expression et de purification<sup>59,157</sup>. À ce stade, il fut possible de rapidement constater que le système utilisant la GST menait à l'obtention d'une enzyme beaucoup plus pure après une seule étape de purification, soit la chromatographie d'affinité, et que le rendement était environ trois fois supérieur avec ce système. C'est pourquoi la fusion GST-hTG2 a été choisie comme étant le système d'expression à utiliser au sein du groupe.



**Figure 2.8 Plasmide pG-TG présentant un site de clivage au FXa**

Par contre, comme le montre la Figure 2.8 présentée ci-dessus, le plasmide pG-TG développé par le groupe de Lai comporte, entre la GST et la hTG2, une séquence de clivage reconnue par le facteur Xa (FXa), une enzyme nécessitant la présence de calcium pour être active. Comme la hTG2 est connue pour s'auto-réticuler lorsqu'elle est mise en présence de calcium sur de longues périodes<sup>142</sup>, l'utilisation du FXa afin de procéder au clivage de la partie GST n'est pas optimale. De plus, comme notre groupe s'intéresse à effectuer des études structurales de la hTG2, comme par exemple étudier le changement de conformation de l'enzyme ou encore déterminer le site de liaison d'inhibiteurs et de substrats, l'utilisation de l'enzyme libre, sans la présence de la GST, reste préférable afin de ne pas créer de faux positifs ou négatifs. C'est pourquoi une mutagénèse dirigée du plasmide pG-TG a été entreprise afin de modifier le site de clivage au FXa (scission en C-terminal de l'arginine de la séquence IEGR) pour un site de clivage à la protéase PreScission<sup>MC</sup> (PSP, scission en C-terminal de la glutamine de la séquence LEVLFQGP).

### 2.3.1. Mutagenèse dirigée du plasmide pG-TG pour modifier la nature du site de clivage

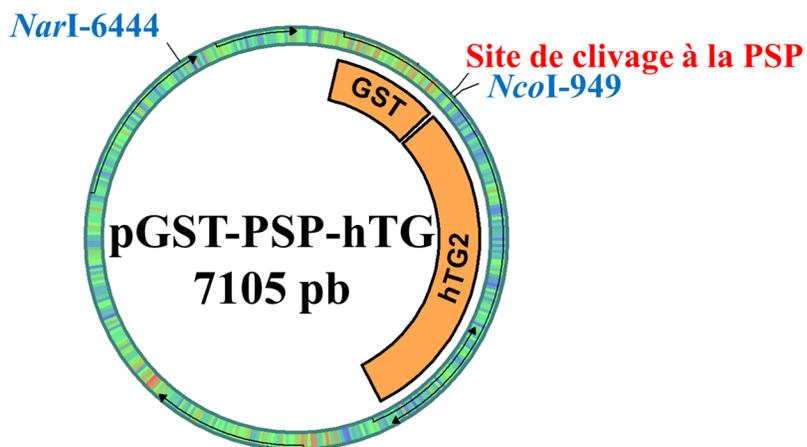
Le choix de la PSP s'est fait pour deux raisons. Premièrement, les conditions de clivage sont très douces, l'enzyme étant active à 4°C et ne nécessitant pas de cofacteur pour jouer son rôle. Deuxièmement, l'avantage le plus intéressant de celle-ci est le fait qu'elle est en réalité une fusion de la protéase du rhinovirus 3C humain avec une GST. Ceci fait en sorte qu'il est possible d'effectuer un clivage directement sur la colonne d'affinité, sans élution préalable de l'enzyme d'intérêt. Le clivage de la partie GST est, en quelque sorte, le moyen utilisé pour procéder à l'élution de la protéine d'intérêt de la colonne d'affinité, la partie GST de celle-ci ainsi que la PSP gardant leur affinité pour le GSH greffé à la colonne, contrairement à la protéine clivée. De plus, ce clivage sur colonne représente un niveau de purification supplémentaire, puisque toutes les protéines indésirables n'ayant pu être délogées lors des lavages précédents, et ne possédant pas la séquence de reconnaissance de la PSP, seront, à cette étape, retenues par la colonne.

Afin de procéder à la mutagenèse dirigée, deux sites de clivage sur le plasmide pG-TG ont été choisis afin d'y introduire un insert contenant les mutations désirées. Comme le montre la Figure 2.8, la première enzyme de restriction choisie est *NcoI*, coupant le plasmide à la 946<sup>e</sup> pb, soit au niveau de la partie codant pour le premier acide aminé de la hTG2, limitant ainsi les possibilités d'introductions de mutations non-désirées au sein de la protéine d'intérêt. La deuxième enzyme sélectionnée est *NarI*, qui coupe le plasmide original à la 6441<sup>e</sup> pb, permettant de générer un insert de taille raisonnable, soit environ 1600 pb.

Afin de générer l'insert convoité pour préparer le plasmide désiré, représenté à la Figure 2.9, une PCR fut réalisée, via une approche traditionnelle, où quatre amorces, soit hTG-PSP-F, hTG-PSP-R, RC-insertPSP-F et RC-insertPSP-R, ont été utilisées conjointement. Malheureusement, en utilisant cette technique, un fragment unique, de bas poids moléculaire, soit d'environ 300 pb, a été obtenu, sans que la présence du fragment désiré, devant contenir environ 2000 pb, ne puisse être détectée.

Pour exclure les problèmes liés à l'activité des polymérases ou encore à l'hybridation des amorces, les deux « demi-réactions » PCR ont été testées. Dans ce cas, d'une manière

indépendante, une PCR avec les amorces hTG-PSP-F et RC-insertPSP-R, et une autre, contenant les amorces hTG-PSP-R et RC-insertPSP-F, ont été effectuées. Les deux fragments attendus, soit un premier d'environ 1700 pb et un second d'environ 300 pb, ont été spécifiquement obtenus.



**Figure 2.9 Plasmide convoité suite à la mutagenèse dirigée du plasmide pG-TG**

Ces deux fragments ont, par la suite, été isolés et purifiés, et une PCR de type amplification par chevauchement<sup>158</sup> (*Site Overlap Extension*) a été effectuée en les utilisant en guise de gabarit, en présence des amorces hTG-PSP-F et hTG-PSP-R.

Cette technique permet l'amplification d'un insert complet contenant la mutation désirée, en utilisant deux fragments de celui-ci ayant en commun la partie mutée. Ces deux fragments vont s'hybrider au niveau des mutations, ce qui permettra, par la suite, à l'aide des amorces, d'amplifier la totalité de l'insert.

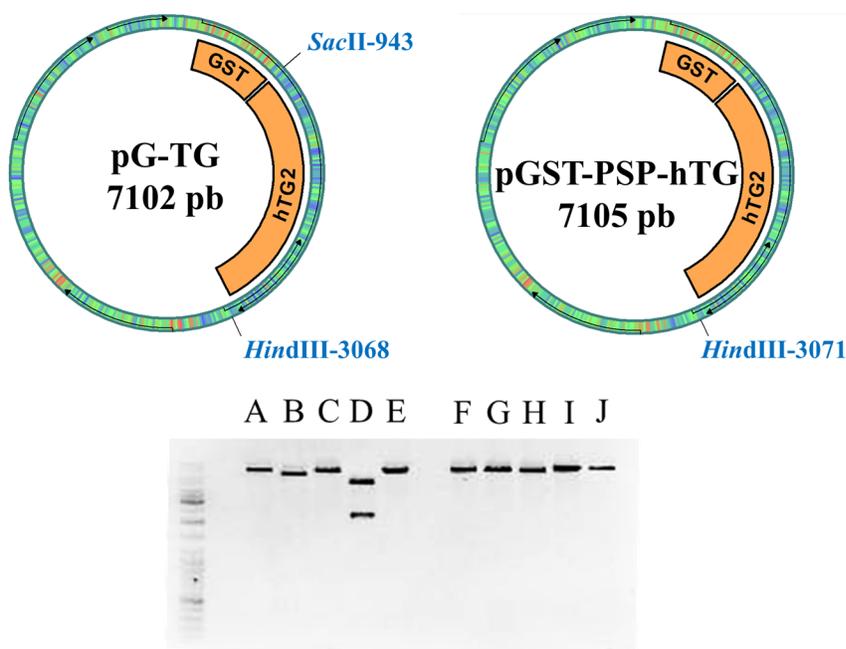
Bien que cette technique n'ait pas été totalement spécifique, des impuretés à 1700 pb et à 300 pb étant toujours très présentes, l'insert désiré, devant contenir environ 2000 pb a aussi été obtenu, puis soumis à une double digestion à l'aide des enzymes de restriction *NarI* et *NcoI*.

Dans le cas du plasmide pG-TG, une triple digestion, à l'aide des enzymes de restriction *NcoI*, *NarI* et *SwaI* a été effectuée. Comme le montre la Figure 2.8, le site de reconnaissance de l'enzyme *SwaI* se retrouve entre le site de *NarI* et celui de *NcoI*. L'utilisation d'une triple digestion vient diminuer les chances d'une recircularisation du

vecteur original, ne contenant pas les mutations désirées, lors de l'étape subséquente de ligation du vecteur.

Suite à cette ligation et à la transformation de cellules bactériennes, dix des colonies obtenues ont été repiquées et mises en culture, d'une manière indépendante, afin d'en extraire leur plasmide.

L'identification des colonies ayant incorporé le plasmide convoité a été effectuée à l'aide d'une double digestion utilisant les enzymes de restriction *SacII* et *HindIII*. En effet, comme le montre la Figure 2.10, le plasmide original, pG-TG, est le seul qui contient un site de reconnaissance pour l'enzyme *SacII*, tandis que l'enzyme *HindIII* possède un site de reconnaissance au sein des deux plasmides. Le patron de digestion sera alors visuellement très différent en fonction de la nature du plasmide évalué.



**Figure 2.10 Identification des plasmides contenant la mutation désirée**

En regardant la Figure 2.10, il est possible de voir que le plasmide « D » semble être une recircularisation du vecteur de départ et que le plasmide « B » semble présenter un poids moléculaire légèrement inférieur aux autres. À l'exception de ces deux plasmides, tous les autres ont été soumis pour séquençage complet entre le site *NcoI* et *NarI*.

Finalement, suite à cette analyse, le plasmide « I » a été retenu, puisqu'il contient les mutations désirées et que seulement deux mutations ponctuelles, sans conséquences sur les protéines exprimées, ont été repérées. La première touche la 6555<sup>e</sup> pb qui se révèle être un « G » plutôt qu'un « A » tandis que la deuxième affecte la 6970<sup>e</sup> pb qui est un « G » au lieu d'un « A ». Dans le premier cas, la mutation n'affecte en rien les protéines exprimées, puisqu'elle se révèle être en dehors du cadre de lecture, tandis que la deuxième est une mutation silencieuse au sein de la GST.

### **2.3.2. Optimisation des conditions d'expression à partir du plasmide pG-TG**

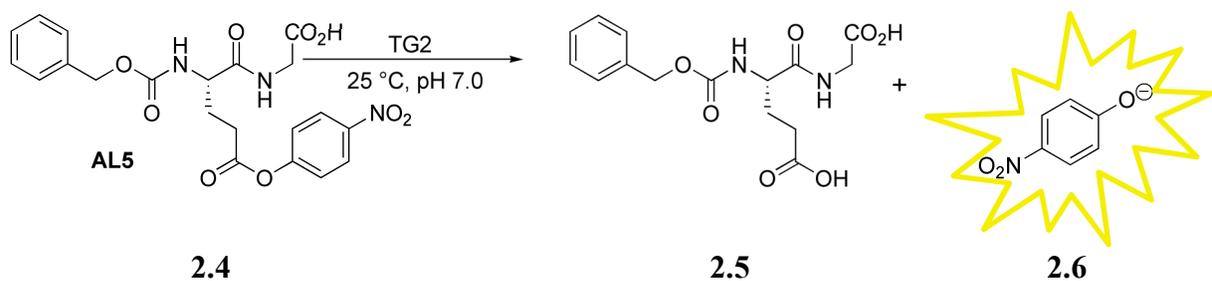
Bien que le groupe de Lai ait construit le plasmide pG-TG permettant l'expression de la hTG2 en fusion avec la GST, ceux-ci n'ont pas rapporté d'optimisation des conditions d'expression de la protéine<sup>137</sup>. Comme les TGases sont reconnues pour être très sensibles aux conditions d'expression, menant à une augmentation de la fraction insoluble de l'enzyme lorsque l'expression se déroule trop rapidement<sup>135,157</sup>, notre groupe s'est intéressé à l'optimisation des conditions d'expression, en se basant sur la méthode utilisée par le groupe de Lai<sup>157</sup>.

L'optimisation des conditions d'expression a été effectuée directement à l'aide du plasmide pG-TG, permettant la construction, en parallèle, du nouveau plasmide pGST-PSP-hTG. Comme seulement quelques acides aminés se situant entre la GST et la hTG2 devaient être modifiés, l'hypothèse fut qu'il soit peu probable que ces changements modifient drastiquement les conditions optimales d'expression de l'enzyme.

Dans un premier temps, les conditions d'expression ont été évaluées, sans s'intéresser au clivage de la partie GST, en éluant, tout simplement, la protéine obtenue à l'aide de GSH, dans la dernière étape de la purification, en utilisant le tampon d'éluion décrit au Chapitre 7.

Comme mentionné précédemment, les TGases ayant tendance à se retrouver dans la fraction insoluble lorsque l'expression se fait trop rapidement, deux paramètres ont été ciblés au départ afin d'être modulés soit la température et la concentration en IPTG utilisées lors de la phase d'induction.

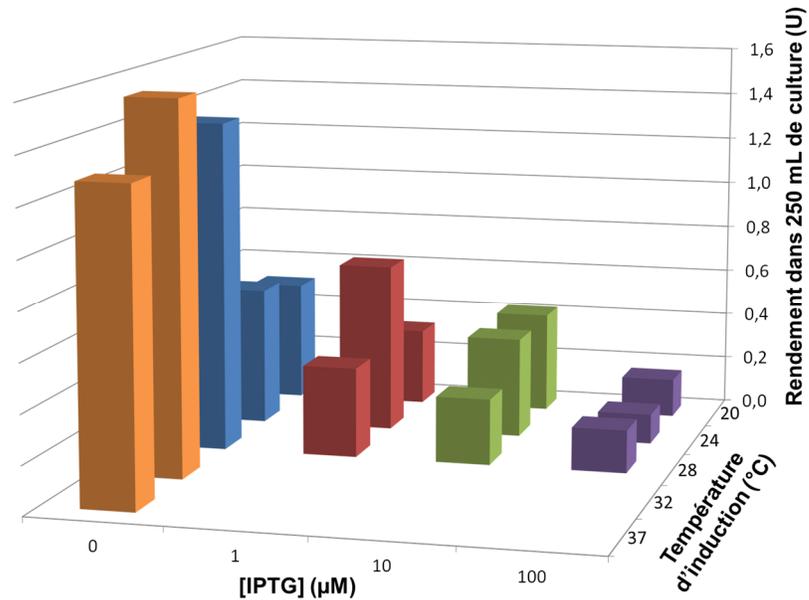
L'activité enzymatique a quant à elle été évaluée à l'aide du test AL5 développé au sein du groupe<sup>50,134</sup>. Ce test consiste à mesurer, en continu, l'absorbance, à 405 nm, de l'ion *p*-nitrophénolate (molécule **2.6**), suite à l'hydrolyse du AL5 (molécule **2.4**) par la TG2, comme illustré à la Figure 2.11. Une unité d'enzyme (U) est définie comment étant la quantité de TG2 nécessaire à la formation de 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrophénolate par minute.



**Figure 2.11 Réaction liée au test d'activité AL5 impliquant la TG2**

Initialement, trois températures d'induction (20, 24 et 28 °C) ainsi que quatre concentrations d'IPTG (0, 1, 10 et 100  $\mu\text{M}$ ) ont été testées. Plusieurs de ces expériences ont pu être menées en parallèle. En effet, pour chacune des températures éprouvées, les quatre concentrations d'IPTG ont été essayées au même moment. C'est pourquoi, afin de faciliter le traitement des échantillons, des volumes de culture de 250 mL ont été utilisés.

Tel qu'il est possible de l'observer à la Figure 2.12, il fut remarqué très rapidement que les faibles concentrations d'IPTG mènent à des rendements d'expression de protéine soluble bien meilleurs et que l'absence d'IPTG semble être, toutes températures confondues, la condition à privilégier. En effet, bien que l'ajout d'IPTG favorise la production de hTG2, l'augmentation de la quantité d'IPTG utilisée accroît la fraction de hTG2 se retrouvant dans la fraction insoluble, diminuant, par le fait même, le rendement global de l'expression. Bien qu'il soit peu commun, ce phénomène de nuisance de l'ajout d'IPTG pour l'expression d'une protéine a été observé dans le cas de TGases, mais aussi pour d'autres protéines<sup>157,159,160</sup>. En effet, dans ces cas, il s'avère que l'expression, au niveau basal dans les cellules, provoquée par la répression incomplète de l'opéron *lac*, peut effectivement mener à une meilleure expression de la protéine d'intérêt<sup>161</sup>.



**Figure 2.12 Optimisation des conditions d’expression de la fusion GST-hTG2 à l’aide du plasmide pG-TG<sup>134</sup>**

Sachant que l’utilisation d’IPTG ne favorise pas l’augmentation du rendement d’expression de protéine soluble, il fut possible de se concentrer sur l’optimisation du paramètre restant, soit la température d’induction. Comme le montre la Figure 2.12 (colonnes oranges), en continuant à augmenter la température d’induction, en absence d’IPTG, il fut possible de déterminer la température optimale, soit de 32 °C.

Bien que cette optimisation se soit essentiellement basée sur les conditions d’expression utilisées par le groupe de Lai<sup>157</sup>, d’autres milieux de culture ont aussi été évalués, comme le LB<sup>162</sup> et le milieu auto-inducteur ZYP-5052<sup>162,163</sup>, sans permettre l’augmentation du rendement d’expression de protéine soluble. De plus, l’utilisation de chaperonnes chimiques, ayant permis de favoriser l’expression recombinante de la gpITG2<sup>135</sup>, n’a pas non plus permis d’augmenter le rendement d’expression de protéine soluble.

### 2.3.3. Optimisation du clivage de la partie GST par la PSP

Une fois les conditions optimales d’expression ayant été trouvées, et ayant en main, cette fois, le nouveau plasmide pGST-PSP-hTG décrit précédemment, une optimisation du clivage de la partie GST, à l’aide de la PSP, a été effectuée. Comme la PSP est aussi une fusion avec la GST, et qu’elle est active à 4 °C, un clivage sur colonne a, dès le départ, été privilégié

afin de diminuer les manipulations à effectuer avec l'enzyme d'intérêt, réduisant ainsi les risques de pertes.

Dans ce cas, deux facteurs ont été pris en considération soit la quantité de PSP à utiliser afin de libérer toutes la hTG2 présente sur la colonne, ainsi que le temps d'incubation nécessaire pour compléter un clivage total.

**Tableau 2.2 Optimisation des conditions de clivage effectué sur colonne de la fusion GST-hTG2 par la PSP à 4 °C<sup>134</sup>**

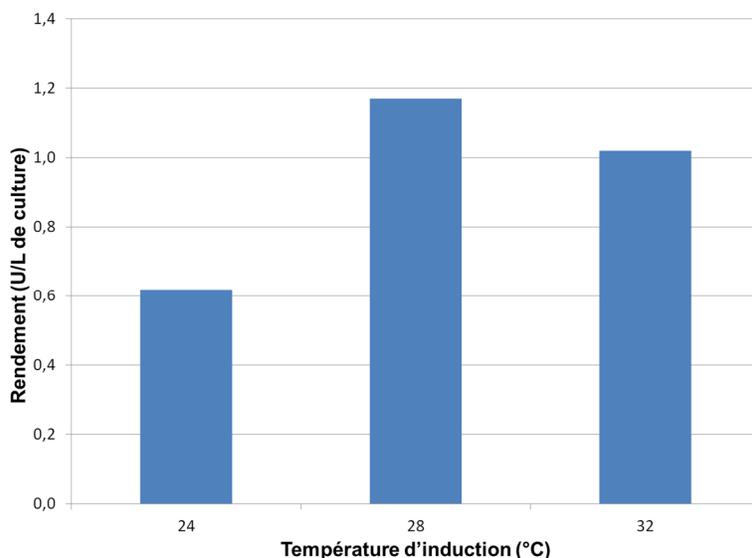
<b>Ratio massique PSP : GST-PSP-hTG2</b>	<b>Temps d'incubation (h)</b>	<b>Pourcentage de clivage (%)</b>
1 : 2	2	50
1 : 2	3	Perte d'activité
1 : 20	2	30
1 : 200	16	10
1 : 20	16	80
1 : 12,5	16	90
1 : 8	16	100

Selon le Tableau 2.2, où le pourcentage de clivage a été estimé par gel SDS-PAGE, l'utilisation de la PSP sur une courte période de temps n'est pas avantageuse, ne permettant pas un clivage complet, ou, encore, menant à une perte d'activité totale chez l'enzyme d'intérêt. Lorsque la PSP est utilisée pour toute une nuit, soit environ 16 heures, la quantité de protéase utilisée devient le seul paramètre qui reste à moduler afin d'être en mesure de cliver totalement la hTG2 de la GST. Il fut donc possible de déterminer qu'un ratio massique de 1 : 8 entre la PSP et la GST-PSP-hTG2 est la condition optimale afin d'obtenir un clivage total de l'enzyme d'intérêt par la PSP à 4 °C, sans perte apparente d'activité.

#### **2.3.4. Évaluation de l'efficacité des conditions d'expression et de purification de la hTG2 à partir du plasmide pGST-PSP-hTG**

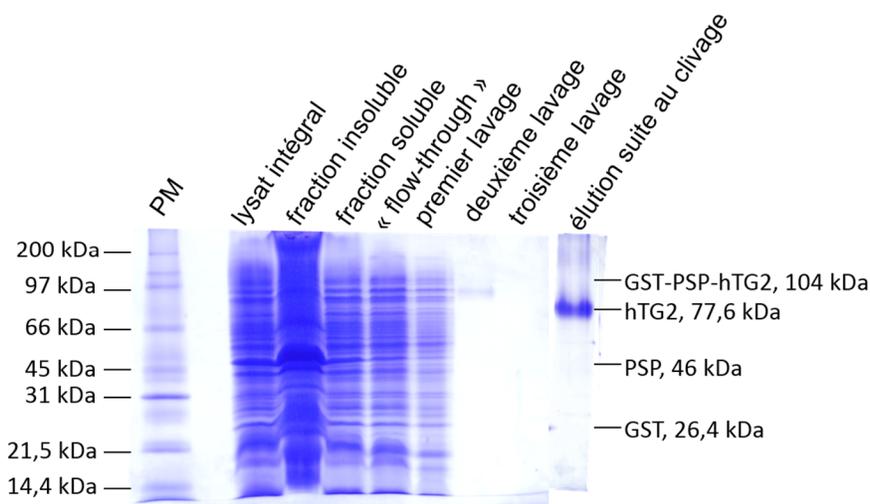
Comme l'optimisation des conditions d'expression effectuée à l'aide du plasmide pG-TG décrite précédemment a permis d'affirmer hors de tout doute que la présence d'IPTG nuit

au rendement d'expression de la fusion GST-hTG2, une optimisation plus raffinée, touchant que la température d'induction, a été effectuée avec le nouveau plasmide pGST-PSP-hTG.



**Figure 2.13 Optimisation de la température d'induction pour l'expression, à l'aide du plasmide pGST-PSP-hTG, de la hTG2 obtenue après clivage complet de la GST<sup>134</sup>**

Cette fois, en travaillant sur 1 L de culture, la température d'induction a été variée entre 24 et 32 °C. Selon la Figure 2.13, il est possible de réaliser que, pour ce nouveau plasmide, l'expression est optimale à 28 °C, plutôt qu'à 32 °C, représentant une différence somme toute mineure, tel qu'attendu, considérant le peu de différences entre les deux vecteurs utilisés.



**Figure 2.14 Gel SDS-PAGE des différentes fractions recueillies lors la purification de la hTG2 dans les conditions optimales<sup>134</sup>**

Comme le montre la Figure 2.14, le protocole d'expression et de purification ainsi optimisé pour le plasmide pGST-PSP-hTG, et décrit en détails au Chapitre 7, permet l'obtention d'une hTG2 de grande pureté et ce, via une seule étape de chromatographie. En effet, suite au clivage de la GST, une seule bande, correspondant à la hTG2, est observée sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

**Tableau 2.3 Analyse de l'efficacité du protocole optimisé d'expression et de purification<sup>134</sup>**

	<b>Protéine totale (mg)</b>	<b>Activité totale (U)</b>	<b>Activité spécifique<sup>a</sup> (U/mg)</b>	<b>Rendement (%)</b>
<b>Surnageant après la lyse cellulaire</b>	560 <sup>b</sup>	5,6	0,010	100
<b>Fraction d'élution après clivage de la PSP</b>	3,5	1,2	0,33	21

<sup>a</sup> Valeurs calculées à l'aide du test d'activité AL5 décrit précédemment basé sur un triplicata; erreur relative < 5 %. Les valeurs indiquées pour le lysat ont été corrigées afin d'éliminer le bruit de fond non-spécifique en mesurant l'activité d'un lysat de cellules BL21(DE3) non-transformées traitées de la même façon que l'échantillon d'intérêt (<15%). <sup>b</sup> Valeurs calculées à partir d'un culot cellulaire de 8 g provenant de 1 L de culture dans le TB.

De plus, l'analyse du surnageant de lyse, rapportée au Tableau 2.3, montre qu'il est possible de récupérer, sur la base d'un litre de culture dans le TB, 3,5 mg de hTG2 possédant une excellente activité spécifique<sup>134,135</sup>, dans un rendement global de 21 %.

**Tableau 2.4 Sommaire des méthodes d'expression et de purification de la hTG2<sup>134</sup>**

<b>Source</b>	<b>Type de fusion</b>	<b>Méthode de purification</b>	<b>Rendement (mg/L de culture)</b>
<b>Cooper<sup>136</sup></b>	His <sub>6</sub> -hTG2	Ni-NTA et His Trap (sans clivage)	0,6
<b>Khosla<sup>59</sup></b>	His <sub>6</sub> -hTG2	Ni-NTA et Hi Trap Q (sans clivage)	5-8
<b>Lai<sup>137</sup></b>	GST-hTG2	GST-Trap (sans clivage)	Non rapporté
<b>Keillor<sup>134</sup></b>	GST-hTG2	GST-Trap avec clivage à la PSP	3,5

Finalement, comme le montre le Tableau 2.4, la méthode développée est la seule rapportée à ce jour permettant d'obtenir, en une seule étape chromatographique, la hTG2 libre.

De plus, le rendement obtenu se compare très bien à ceux publiés par les autres groupes de recherche.

### 2.3.5. Évaluation de la stabilité de la hTG2

Les TGases étant reconnues pour leur susceptibilité à s'agréger causant ainsi une perte d'activité, les conditions d'entreposage de la hTG2 après la purification ont été évaluées.

**Tableau 2.5 Détermination des conditions optimales d'entreposage de la hTG2**

Méthode d'entreposage	Temps d'entreposage	Activité relative (%)
Tampon d'éluion à 4 °C	1 semaine	90
Tampon d'éluion à 4 °C	2 semaines	75
Lyophilisation puis stockage à 4 °C	1 semaine	20
Tampon d'éluion + 10 % glycérol à -80 °C	> 2 mois	100

Selon le Tableau 2.5 présenté ci-dessus, il est possible de remarquer que, pour conserver la hTG2 sur des longues périodes, l'entreposage à -80 °C en présence de 10 % de glycérol est la méthode à favoriser, et ce, à l'image de ce qui est rapporté dans la littérature<sup>59,136,157</sup>. Par contre, pour un stockage à court terme, la conservation à 4 °C ne semble pas poser problème. De plus, bien que la gpITG2 puisse être lyophilisée et gardée à 4 °C par la suite pour de longues périodes<sup>135</sup>, la hTG2 supporte très mal cette technique.

**Tableau 2.6 Effet de la présence de co-solvant sur l'activité de la hTG2<sup>134</sup>**

Co-solvant	Concentration (% v/v)	Activité relative (%)
DMSO	2,5	100
DMSO	5	100
DMF	2,5	90
DMF	5	90
ACN	2,5	68
ACN	5	48

Pour ce qui est de la stabilité de l'enzyme, un autre paramètre a aussi été évalué, soit l'effet de la présence de co-solvants organiques, fréquemment utilisés dans les essais cinétiques. Comme le montre le Tableau 2.6, trois solvants différents ont été testés, chacun à

deux concentrations différentes. Par contre, le composé utilisé dans le test d'activité utilisé (AL5) doit être solubilisé dans un solvant organique, il fut donc impossible de déterminer la vitesse de la réaction enzymatique en absence totale de co-solvants. Les données rapportées ici le sont en termes d'activité relative, où la vitesse maximale obtenue parmi toutes les conditions testées, à l'aide du même lot d'enzyme et la même journée, a été fixée à 100 %.

Selon les résultats obtenus, il est possible de constater que le DMSO et le DMF ont un net avantage sur l'acétonitrile, qui affecte d'une manière importante l'activité enzymatique de la hTG2. Le DMSO semble être un peu plus avantageux d'un point de vue cinétique, étant le solvant menant aux plus grandes vitesses observées. Par contre, le fait qu'il se retrouve sous forme solide lorsque mis sur glace, soit les conditions d'entreposage des solutions utilisées durant les tests, lui nuit, d'un point de vue pratique.

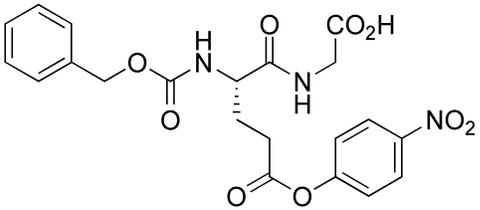
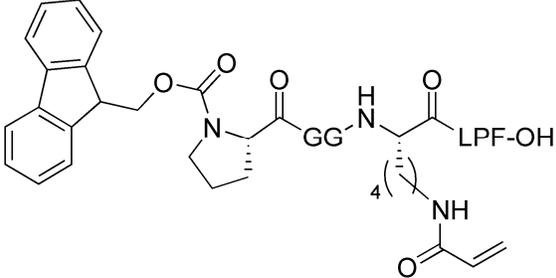
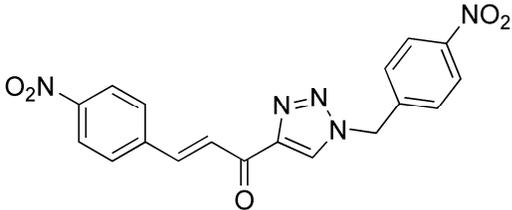
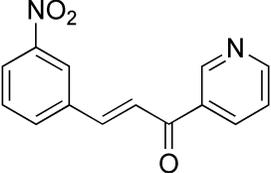
### **2.3.6. Comparaison cinétique entre la hTG2 et la gpITG2**

Finalement, une comparaison cinétique entre la gpITG2 et la hTG2 a été entreprise à l'aide de différents substrats et inhibiteurs connus de la gpITG2.

Dans un premier temps, le  $K_M$  envers la hTG2 déterminé pour AL5 (molécule **2.4**), soit de  $14,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$ , a permis, dès le départ, d'envisager l'utilisation de ce substrat dans un test d'activité colorimétrique, rapide et suivi en continu. En effet, peu de tests d'activité pratiques sont répertoriés pour la hTG2. Un des tests les plus convivial, celui à l'hydroxamate<sup>56,70</sup>, utilisé pour la gpITG2, se trouve à être inefficace pour la hTG2, le Cbz-Gln-Gly, utilisé comme substrat pour la TG2 dans ce test, se révélant être moins bien reconnu par la forme humaine de l'enzyme<sup>136</sup>. De leur côté, les différents tests fluorimétriques<sup>164,165</sup>, développés pour la TG2, ne permettent pas une conversion aisée entre les différentes pentes mesurées et la quantité de produit formé, essentiel à la standardisation des résultats<sup>136</sup>. Des tests d'incorporation de substrats radioactifs sont aussi répertoriés<sup>166</sup>, mais le danger associé à ce type d'essais rend leur utilisation plutôt ardue. Finalement, un test à enzyme couplée, permettant de quantifier la formation d'ammoniaque par la TG2, le  $\text{NH}_4^+$  formé réagissant avec le NADH et l' $\alpha$ -cétoglutarate à l'aide de la GDH<sup>102</sup>, bien qu'utilisable, est lourd à employer dans des études cinétiques d'envergures.

C'est pourquoi toutes les études cinétiques rapportées au Tableau 2.7 ont été effectuées à l'aide du test d'activité AL5<sup>50,134</sup> décrit dans une section précédente.

**Tableau 2.7 Comparaison cinétique entre la hTG2 et la gpITG2<sup>134</sup>**

Composé testé	Paramètre cinétique (unité)	Valeur du paramètre	
		hTG2	gpITG2
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	K <sub>d</sub> (mM)	0,16 ± 0,06	0,09 ± 0,02
<b>Ac-PNPQLPF-OH</b>	K <sub>M</sub> <sup>app</sup> (μM)	11 ± 1 <sup>66</sup>	11,2 ± 0,7
 <p><b>2.4</b></p>	K <sub>M</sub> (μM)	14,0 ± 0,5	9,1 ± 0,7
 <p><b>1.11</b></p>	K <sub>i</sub> (μM)	19 ± 6	42 ± 17 <sup>62</sup>
	k <sub>inact</sub> (min <sup>-1</sup> )	0,14 ± 0,03	0,46 ± 0,08 <sup>62</sup>
 <p><b>1.20</b></p>	K <sub>i</sub> (μM)	1,0 ± 0,1	0,17 ± 0,05
 <p><b>1.21</b></p>	K <sub>i</sub> (μM)	4,0 ± 0,6	3,0 ± 0,6

La hTG2 montre une dépendance au calcium du même ordre de grandeur que la gpITG2. De plus, la séquence de haute affinité développée au sein du groupe, soit Ac-PNPQLPF-OH<sup>66</sup>, agit bel et bien comme un très bon substrat donneur de la hTG2. Dans ce cas, les valeurs de  $K_M^{app}$  obtenues ont été mesurées à l'aide d'un test de compétition<sup>167</sup> entre AL5 et l'Ac-PNPQLPF-OH.

De plus, quelques inhibiteurs connus de la gpITG2, et développés au sein du groupe, ont été testés envers la hTG2. Les inhibiteurs réversibles, pour lesquels des valeurs de  $K_i$  ont été calculées, ont été soumis à un test de compétition avec AL5<sup>116,117</sup>. Du côté de l'inhibiteur irréversible, la molécule **1.11**, la méthode de Stone et Hofsteenge<sup>168</sup> a été utilisée afin de calculer les valeurs de  $K_i$  et de  $k_{inact}$ . Néanmoins, pour ces trois inhibiteurs, tous les paramètres cinétiques mesurés envers la hTG2 sont très près de ceux obtenus avec la gpITG2.

Tous les résultats ainsi obtenus démontrent que la gpITG2 est un excellent modèle de la hTG2. En effet, les données cinétiques étant, dans l'ensemble, très similaires, elles permettent de penser que la grande homologie des séquences se traduit aussi dans la structure tridimensionnelle des différents sites de liaison des substrats et inhibiteurs évalués. Ceci ouvre donc la porte à l'extrapolation, vers la hTG2, des différents résultats obtenus par le groupe dans le passé avec la gpITG2, utilisée comme mime de la forme humaine.

## 2.4. Conclusion

Les modèles jouent un rôle primordial en recherche, permettant de formuler des hypothèses de départ pouvant, par la suite, être mises à l'épreuve à l'aide d'expériences concrètes, permettant d'acquérir des informations de toutes sortes.

C'est pourquoi, en travaillant avec la gpITG2, qui est structurellement mal caractérisée, le développement de modèles d'homologies, tant de sa forme ouverte que de sa forme fermée, fut essentiel à la progression des recherches effectuées par notre groupe.

Le modèle de la forme fermée, basé sur plusieurs structures cristallines de TGases, s'est révélé beaucoup plus fiable que celui de la forme ouverte, basé sur la seule structure cristalline connue à l'époque.

De plus, étant pleinement conscients que les modèles ne sont pas le reflet exact de la réalité, l'importance de travailler avec l'enzyme humaine, la cible pharmacologique réelle et la TG2 la mieux caractérisée structurellement, s'est avérée de plus en plus nécessaire.

Sachant que la solubilité de la hTG2 nuit à l'expression recombinante de celle-ci, l'utilisation d'un vecteur d'expression permettant de créer une fusion avec la GST, une protéine reconnue pour favoriser le repliement et la solubilité des protéines auxquelles elle est rattachée, est apparue rapidement comme étant la voie à privilégier.

En modifiant un plasmide fourni par le groupe de Lai, afin d'introduire une séquence peptidique permettant le clivage protéolytique, par la PSP, de la partie GST rattachée à la TG2, il fut possible d'optimiser le premier protocole d'expression et de purification simple et efficace de la hTG2 libre. La méthode ainsi développée permet l'obtention, via 1 L de culture dans le TB, de 3,5 mg de hTG2, soit l'équivalent de 1,2 U d'enzyme.

De plus, la caractérisation cinétique de la hTG2 a permis de démontrer que le test d'activité AL5, préalablement développé pour la gpITG2, est aussi applicable pour la hTG2, ouvrant ainsi la porte à l'usage d'un nouveau test d'activité simple, rapide et en continu pour cette enzyme.

La possibilité de travailler avec l'enzyme humaine au sein de notre groupe donne lieu à penser au développement de nouvelles avenues de recherche, comme, par exemple, l'investigation approfondie du changement conformationnel de l'enzyme, ou encore l'étude des sites de liaison des multiples substrats et inhibiteurs de la hTG2.

## **Chapitre 3 : Synthèse d'inhibiteurs compétitifs réversibles de la TG2**

### **3.1. La genèse de la chimie médicinale : la découverte de la synthèse organique**

De nos jours, les produits issus de la synthèse organique sont omniprésents. Il est possible de penser, par exemple, à tous les contenants de plastique qui nous entourent et qui sont devenus, aux fils des ans, des indispensables dans la cuisine. Ou encore aux différents pigments développés, soit pour agrémenter notre quotidien en embellissant les murs que nous croisons, ou bien en nous divertissant à travers nos fabuleux téléviseurs. En effet, peu importe vers quoi nous nous tournons, les produits issus de la synthèse organique sont partout et quasi impossible à éviter.

De plus, il ne faut pas oublier toute l'industrie du médicament, à laquelle la médecine actuelle doit une fière chandelle, permettant de sauver, chaque année, d'innombrables vies. En effet, la possibilité de pouvoir créer, sans cesse, de nouvelles molécules, pouvant, par la suite, être testées afin de traiter diverses pathologies a permis des avancées spectaculaires dans le traitement de plusieurs maladies. Il est possible de mesurer l'ampleur de cette avancée, entre autres, par l'augmentation fulgurante de l'espérance de vie dans les 100 dernières années. En effet, au Canada, tout sexe confondu, l'espérance de vie au début des années 1900 était d'environ 48 ans, alors qu'elle tourne plutôt autour de 80 ans à l'heure actuelle!

Bien que cette avancée ne soit pas seulement attribuable à l'apparition des médicaments de synthèse, ceux-ci permettent maintenant de soigner des maladies qui étaient létales à l'époque, comme les infections bactériennes, et permettent même de traiter des pathologies qui n'étaient pas connues à ce moment-là, comme le VIH et une multitude de cancers.

Par contre, la découverte de nouvelles molécules possédant des propriétés pharmacologiques intéressantes demeure un travail long et laborieux. En effet, en plus de devoir identifier une cible biologique précise impliquée dans la pathologie à traiter, il faut

trouver des molécules permettant d'influer sur cette cible de la manière désirée, en l'activant ou la désactivant, et ce, sans créer des effets secondaires plus grands que les bénéfices encourus.

Deux grandes lignes de pensées sont présentes dans la découverte de nouvelles molécules : l'approche rationnelle et le criblage à haut débit.

Dans le criblage à haut débit, on veut tester, sur une cible biologique connue, plusieurs molécules différentes, issues de banques de produits chimiques, une après l'autre, afin d'en trouver au moins une ayant les effets recherchés. Par la suite, ces molécules actives peuvent être optimisées, en variant la position ou la nature de groupements fonctionnels et en vérifiant de nouveau leur activité. Il s'agit donc d'une méthode basée essentiellement sur les essais et erreurs.

De l'autre côté, l'approche rationnelle permet d'identifier, à l'aide de structures cristallines ou encore de modèles théoriques, le site de liaison du substrat natif de la cible et ainsi déterminer comment une molécule synthétique pourrait être construite afin de s'arrimer à ce site pour optimiser, le plus possible, son interaction avec la cible. Dans ce cas, il faut que la cible soit connue et bien caractérisée, et rien ne garantit qu'une fois construite, la molécule créée à partir du modèle agira de la manière désirée.

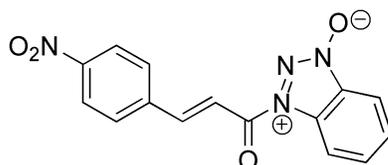
C'est pourquoi, très souvent, ces deux approches sont combinées. Dans un premier temps, un criblage à haut débit est effectué afin de trouver des familles de molécules ayant l'effet désiré envers la cible, et, par la suite, on tente d'optimiser l'arrimage entre la cible et la molécule de synthèse via une approche rationnelle.

Le prochain chapitre présentera donc la synthèse de nouvelles molécules, via une approche d'essais et erreurs, que l'on souhaite être des inhibiteurs compétitifs réversibles de la TG2. Le design de ces nouvelles structures a été réalisé afin d'améliorer les inhibiteurs préalablement conçus par le groupe de deux façons : en trouvant une alternative au groupement nitro et en développant un nouveau squelette, moins susceptibles aux attaques nucléophiles.

### 3.2. La découverte d'inhibiteurs réversibles de la TG2

Comme mentionné au Chapitre 1, une nouvelle classe d'inhibiteurs réversibles compétitifs de la TG2 a été découverte, un peu par hasard, par notre groupe de recherche. En effet, il était connu qu'un groupement Cbz situé en N-terminal de substrats donneurs de la TG2 augmente l'affinité de ceux-ci pour la transglutaminase. Le groupe s'est donc penché sur l'importance de la rigidité de ce substituant quant à l'effet qu'il peut avoir sur l'augmentation du pouvoir inhibitoire des peptides.

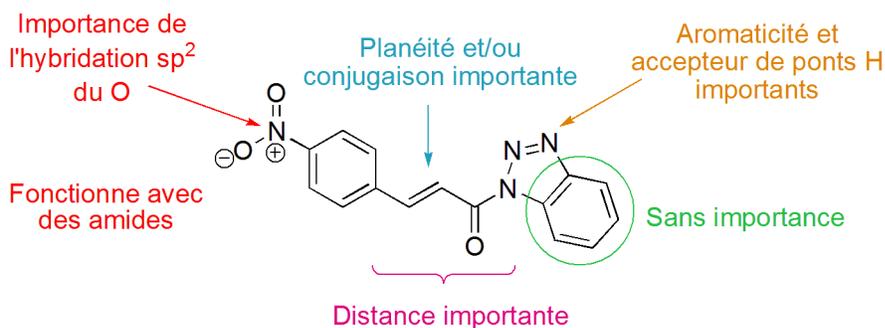
Lors de cette étude, un sous-produit de réaction, la molécule **1.18**, présentée ultérieurement à la Figure 1.7 et reproduite ci-dessous, a été isolée et testée vis-à-vis de la TG2. Étonnamment, celle-ci a présenté une inhibition de type réversible et compétitive.



**1.18**

**Figure 1.7 Inhibiteur compétitif obtenu par isolation d'un sous-produit de réaction**

Par la suite, une étude structure-activité sommaire a permis d'identifier certains pharmacophores au sein de ce squelette trans-cinnamoyl, nécessaires à la rétention des propriétés inhibitrices des différentes structures testées. Les conclusions ont été résumées à la Figure 1.8, reproduite ci-dessous.



**Figure 1.8 Conclusions tirées de l'étude structure-activité des dérivés trans-cinnamoyl<sup>116,117</sup>**

### 3.3. Développement de nouveaux inhibiteurs réversibles compétitifs de la TG2

#### 3.3.1. Vérification de l'importance de groupements nitro sur le pouvoir inhibitoire de la classe des triazoles

Parmi les molécules identifiées précédemment comme des inhibiteurs réversibles compétitifs de la TG2 se trouve la classe des triazoles. Un des avantages, au niveau de la synthèse, de ces inhibiteurs, est la possibilité de varier facilement les groupements fonctionnels présents dans les molécules, puisqu'une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire<sup>169,170</sup> est à la base de la formation du cycle triazole au cœur de leur structure.

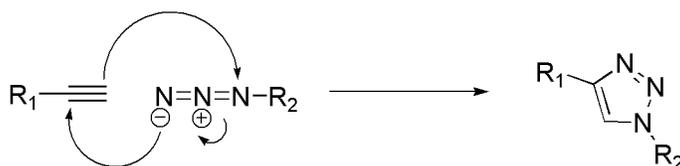
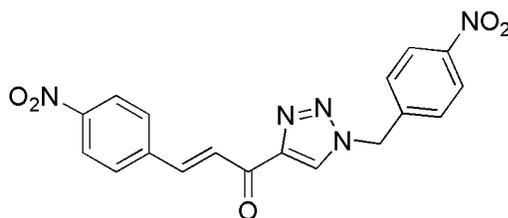


Figure 3.1 Mécanisme général de cycloaddition 1,3-dipolaire

Cependant, le sujet le plus probant de cette famille, la molécule **1.20**, possède, au sein de sa structure, deux groupements nitro, comme le montre la Figure 3.2.



**1.20**

$$IC_{50} = 2,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$$

$$K_i = 0,17 \pm 0,05 \mu\text{M}$$

Figure 3.2 Structure et données cinétiques (gpITG2) du meilleur inhibiteur de la classe des triazoles développé par le groupe<sup>117</sup>

Dans une optique de développement de médicaments, le groupement nitro peut causer des problèmes s'il se révèle être un pharmacophore essentiel à la rétention du pouvoir inhibitoire de la structure. En effet, ce type de groupement est connu pour mener à la production d'effets secondaires importants lors de sa métabolisation par l'organisme<sup>171</sup>, pouvant mener à l'abandon des recherches sur toute la gamme des molécules parentes.

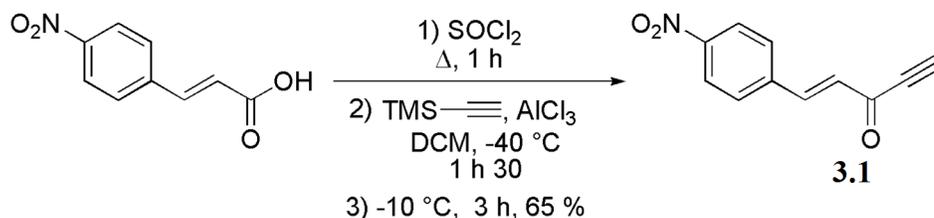
Toutefois, s'il est démontré que le groupe nitro n'est pas essentiel à l'activité inhibitrice des molécules, il pourrait être remplacé par un groupe similaire lors des étapes de développement. C'est dans cette optique que de nouvelles molécules ont été synthétisées, puis testées envers la gpITG2. En effet, cette étude a été réalisée à une époque antérieure au développement de la méthode d'expression et de purification de la hTG2 par le groupe.

### 3.3.1.1. Synthèse de nouvelles molécules basées sur le squelette triazole

Dans le cadre de cette étude, deux approches ont été empruntées : la synthèse de différentes ynones, permettant de varier les groupements en position 4 du trans-cinnamoyle, ainsi que la synthèse de différents azotures permettant d'explorer la diversification des substituants au niveau du groupement benzyle.

#### 3.3.1.1.1. Diversification fonctionnelle de la partie trans-cinnamique

Dans le cas des ynones, le dérivé nitré a été synthétisé selon une méthode décrite par Miller *et al.*<sup>172</sup> consistant à transformer, dans une première étape, l'acide *p*-nitrocinnamique en chlorure d'acyle avant de soumettre celui-ci, dans un deuxième temps, à une désilylation électrophile du triméthylsilylacétylène, en présence de chlorure d'aluminium. Cette réaction a permis d'obtenir, comme montré à la Figure 3.3, dans un rendement de 65 %, l'ynone désirée, après parachèvement et colonne chromatographique.

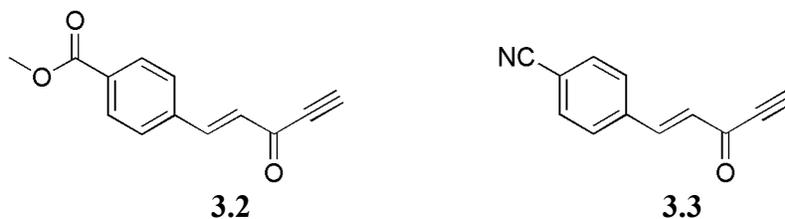


**Figure 3.3 Synthèse du fragment ynone servant à la cycloaddition 1,3-dipolaire**

Le même type d'approche a aussi été utilisé afin de procéder à la synthèse d'un dérivé méthylester et d'un dérivé cyano, illustrés à la page suivante.

Dans leur cas, les acides trans-cinnamiques n'étant pas commerciaux, ils ont été préparés à partir des aldéhydes parents, grâce à une réaction de Wittig<sup>116</sup>. Par contre, dans les deux cas, la réaction de désilylation électrophile du triméthylsilylacétylène en présence de chlorure d'aluminium n'a pas mené aux produits désirés. Dans les deux cas, les spectres

RMN  $^1\text{H}$  ne montrent pas la présence d'un alcyne terminal, tandis que les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  ne montrent pas la présence d'une liaison triple au sein du produit majoritairement recueilli.

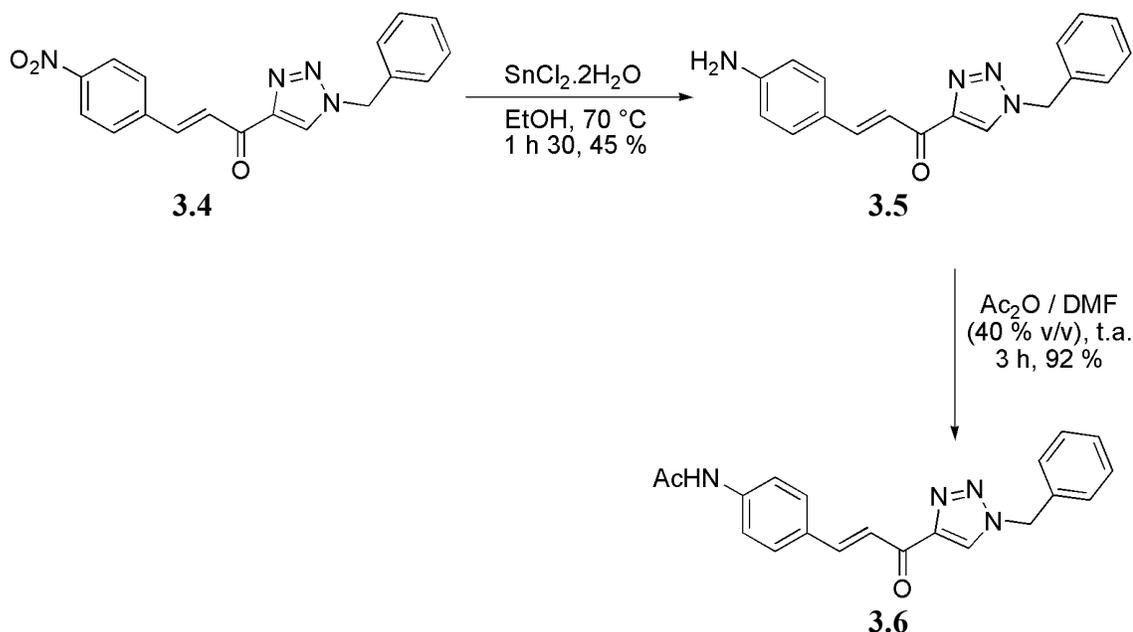


**Figure 3.4 Structures de deux ynones permettant l'évaluation de l'importance du groupement nitro pour la liaison des inhibiteurs à l'enzyme**

D'autres approches ont aussi été expérimentées. Par exemple, un couplage au palladium entre un stannane et le chlorure d'acyle dérivé des acides trans-cinnamiques<sup>172</sup> a été testé, tout comme une approche de formation d'un alcool propargylique pouvant, par la suite, être oxydé en cétone. L'approche utilisée pour la formation de l'alcool propargylique fut le couplage entre un trans-cinnamaldéhyde et le triméthylsilylacétylène, à l'aide de triflate de zinc<sup>173</sup>.

Malheureusement, dans tous les cas, il fut impossible d'obtenir les ynones désirées. Dans le cas de la formation de l'alcool propargylique, l'aldéhyde de départ fut récupéré, tandis que dans le cas du couplage au palladium, une sous-réaction qu'il ne fut possible d'identifier est venue parasiter la réaction désirée. En effet, dans ce cas, un produit, sans liaison triple, ni groupement silyl, est récupéré en majorité, sans être le chlorure d'acyle de départ, ni l'acide carboxylique parent. Par conséquent, ces approches de formation de nouvelles ynones ont donc été abandonnées.

Néanmoins, afin de vérifier si le groupement nitro situé sur la partie trans-cinnamique de la molécule est nécessaire au pouvoir inhibitoire, une réduction en amine d'un inhibiteur connu<sup>117</sup>, la molécule **3.4**, a été effectuée, à l'aide de chlorure d'étain (II) dihydraté, permettant d'obtenir, après parachèvement et colonne chromatographique, le produit désiré dans un rendement acceptable de 45 %. Par la suite, cette amine a été mise en présence d'anhydride acétique afin de greffer un groupement acétyle à l'azote. Dans ce cas, la réaction a permis d'obtenir, après neutralisation et précipitation dans l'hexane, le produit convoité avec un très bon rendement, soit de 92 %. Cette stratégie est présentée à la Figure 3.5.



**Figure 3.5 Réduction en amine et ajout d'un acétyle à un inhibiteur compétitif réversible connu de la TG2**

*3.3.1.1.2. Analyse du pouvoir inhibitoire des molécules sans groupement nitro sur le fragment trans-cinnamique*

Pour comparer le pouvoir inhibitoire des différentes molécules qui seront présentées dans cette section, les valeurs d'IC<sub>50</sub> seront utilisées. Cette valeur correspond à la concentration d'inhibiteur nécessaire afin de diminuer la vitesse initiale de la réaction enzymatique de moitié.

Il s'agit donc d'un paramètre qui variera en fonction des conditions réactionnelles utilisées, comme la concentration du substrat impliqué dans le suivi de l'évolution de la réaction enzymatique. Il est donc utile de préciser que tous les essais cinétiques menant à l'obtention d'un IC<sub>50</sub> ont été effectués dans les mêmes conditions réactionnelles. De plus, la gpITG2 a été utilisée pour tous ces essais, puisqu'ils ont été réalisés préalablement à la mise en œuvre de la technique d'expression et de purification de la hTG2 par le groupe.

En regardant le Tableau 3.1, il est possible de constater que, bien que conférant une affinité appréciable pour l'enzyme, la présence d'un groupement nitro en position 4 du groupe trans-cinnamique n'est pas essentielle à l'activité inhibitrice. En effet, le composé acétylé

demeure un inhibiteur de la TG2, même si son pouvoir inhibitoire a diminué d'environ un ordre de grandeur.

**Tableau 3.1 Comparaison, avec le dérivé nitré, d'IC<sub>50</sub> de molécules de la famille des triazoles sans groupement nitro sur la partie trans-cinnamique**

Substituant	Molécule	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
-NO <sub>2</sub>	3.4	4,3 $\pm$ 0,3 <sup>117</sup>
-NH <sub>2</sub>	3.5	>100
-NHAc	3.6	77 $\pm$ 9

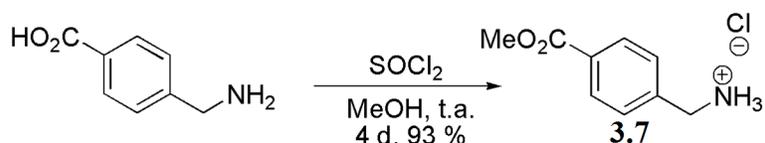
Par contre, un peu comme pour la génération précédente d'inhibiteurs réversibles compétitifs développée par le groupe, il semble que la présence d'un oxygène hybridé sp<sup>2</sup> s'avère primordiale à cette position. En effet, la présence d'une amine, pouvant quand même faire des ponts H, ne permet pas la rétention du potentiel d'inhibition de la molécule, contrairement à l'amide.

Il s'avère donc se confirmer que le groupement nitro n'est pas essentiel pour garder la propension d'inhibition de la classe des triazoles et que son remplacement par un amide semble porter fruit. De plus, il serait intéressant de vérifier si la position sur le cycle aromatique de cet amide pourrait être modifiée, afin d'optimiser les interactions avec l'enzyme, et permettre d'abaisser l'IC<sub>50</sub> de cette classe de molécules.

#### 3.3.1.1.3. Diversification fonctionnelle de la partie benzylique

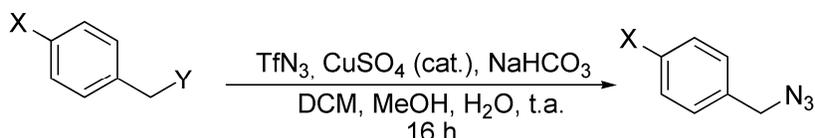
Comme un groupe nitro est aussi présent sur la partie benzylique du meilleur inhibiteur précédemment identifié pour cette famille, il a été décidé de tenter de diversifier la fonctionnalisation de cette région, afin de trouver des alternatives à ce groupement potentiellement problématique dans une optique de développement de molécules au potentiel pharmaceutique.

Afin d'évaluer l'effet de la présence d'un ester en position 4 du cycle benzylique, une estérification de l'acide *p*-(aminométhyl)benzoïque a été effectuée, en présence de méthanol et de chlorure de thionyle<sup>174</sup>.



**Figure 3.6 Estérification de l'acide *p*-(aminométhyl)benzoïque**

Par la suite, différents fragments contenant un azoture ont été construits, en utilisant, comme substrats de départ, différentes amines.



Entrée	Molécule	X	Y	Rendement (%)
1	3.7	CO <sub>2</sub> Me	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	96
2	3.8	CO <sub>2</sub> H	NH <sub>2</sub>	93
3	3.9	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	97

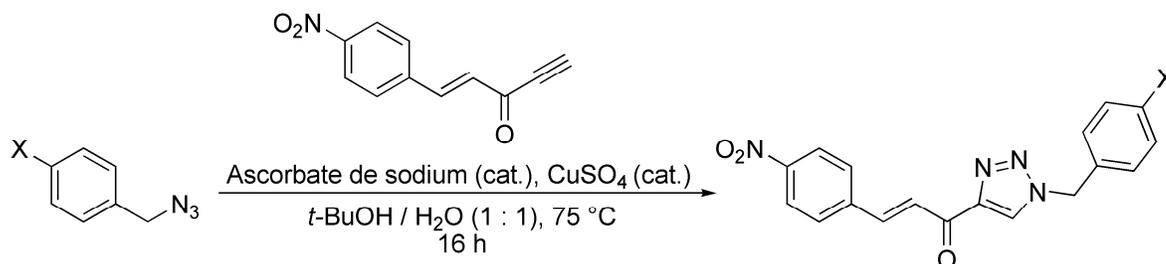
**Figure 3.7 Synthèse de différents azotures benzyliques à partir d'amines**

Tel que décrit par Cavender *et al.*<sup>175</sup>, et repris par Nyffeler *et al.*<sup>176</sup>, il est possible de convertir une amine en azoture via l'utilisation de l'azoture de triflate, sous catalyse de Cu<sup>2+</sup>, en milieu légèrement basique, dans un mélange d'eau, de méthanol et de dichlorométhane. Cette réaction mène à l'obtention des azotures désirés, et ce, avec d'excellents rendements, comme le démontre la Figure 3.7.

Par la suite, ces azotures ont été mis en présence de l'ynone nitrée **3.1**, de sulfate de cuivre (II) et d'ascorbate de sodium, afin d'effectuer une cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I)<sup>117,170,177</sup>. Dans le cas de cette réaction, l'ascorbate de sodium joue le rôle d'agent réducteur, permettant la formation *in situ* du Cu<sup>+</sup>, métal permettant d'orienter la réaction de cycloaddition, afin de produire majoritairement l'isomère désiré du cycle triazole.

En effet, bien que le mécanisme n'ait pas fait le sujet d'études approfondies, il est connu que le Cu<sup>+</sup>, en milieu basique, dispose de la propriété de s'insérer dans une liaison triple terminale afin de se lier au carbone<sup>170,178</sup>, permettant, par le fait même, la polarisation de cette liaison, nécessaire à la régiosélectivité de la réaction de cycloaddition.

Les faibles rendements obtenus pour les molécules **3.10** et **3.11** sont principalement dus à la mauvaise solubilité des composés dans le solvant permettant leur purification par chromatographie sur gel de silice.



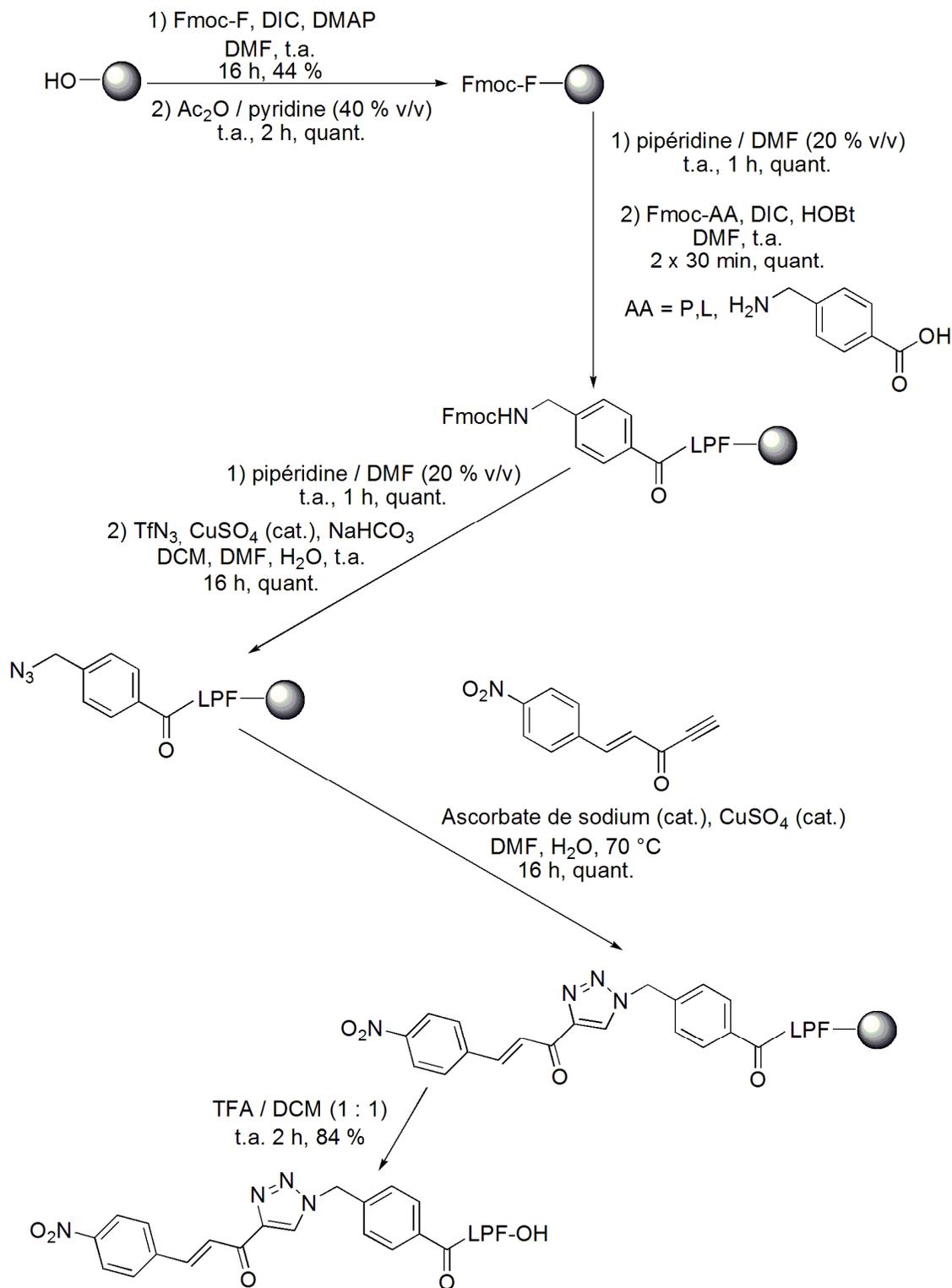
Entrée	Molécule	X	Rendement (%)
1	3.10	CO <sub>2</sub> Me	12
2	3.11	CO <sub>2</sub> H	11
3	3.12	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	72

**Figure 3.8 Préparation de triazoles via une réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I)**

En plus de ces trois nouvelles molécules, et, comme cette classe d'inhibiteur est de type compétitif avec le substrat donneur de l'enzyme, il a été songé de greffer, à la partie benzylique, une portion de la séquence de haute affinité développée par le groupe<sup>62</sup> (PNPQLPF). Pour ce faire, l'hypothèse voulant que l'inhibiteur remplace le début de la séquence a été formulée, et il a été choisi de d'ajouter les acides aminés LPF au cycle benzylique.

Pour la construction de la molécule, nous avons voulu tirer avantage de la synthèse en phase solide. En effet, ce type de synthèse permet, entre autres, de faciliter le traitement des différentes réactions, en permettant l'élimination aisée des sous-produits de réaction à chacune des étapes et l'obtention d'un produit d'une pureté appréciable, et ce, en grande quantité, plus rapidement qu'en effectuant une synthèse en solution.

Comme décrit à la Figure 3.9 présentée à la page suivante, une résine de Wang a été utilisée, et, par conséquent, une stratégie Fmoc<sup>179</sup> a été employée. Les acides aminés ont été greffés en partant de la fin de la séquence, en utilisant le diisocarbodiimide (DIC) comme agent de couplage. Après avoir greffé le premier acide aminé à la résine, soit la phénylalanine, un blocage des sites de la résine n'ayant pas réagis a été effectué à l'aide d'anhydride acétique.



### 3.13

Figure 3.9 Synthèse sur support solide d'un dérivé triazole incorporé dans une séquence d'acides aminés

Une fois les acides aminés greffés à la résine, il fut aussi possible d'ajouter, via la même stratégie de synthèse, l'acide 4-(Fmoc-aminométhyl)benzoïque. Ensuite, après déprotection, il fut choisi de tenter la formation de l'azoture directement sur la résine.

Pour ce faire, la résine a été gonflée à l'aide de dichlorométhane (DCM), puis l'azoture de triflate a été ajouté. Le sulfate de cuivre et le bicarbonate de sodium ont été dissous dans un minimum d'eau (0,2 mL) et du diméthylformamide (DMF) a été ajouté (0,5 mL), afin d'homogénéiser la solution et s'assurer que la résine reste bien gonflée. Après 16 heures d'agitation, il fut possible de constater que la fonction amine a bel et bien réagit (test de Kaiser<sup>180</sup> négatif) et que la bande infrarouge spécifique au groupement azoture<sup>181</sup>, situé à environ 2100 cm<sup>-1</sup>, est bel et bien présente. Pour l'analyse infrarouge, il fut possible de tout simplement préparer une pastille de KBr en incorporant quelques billes de la résine, afin de vérifier la présence de la bande spécifique au groupement N<sub>3</sub>.

Ensuite, la dernière étape avant le clivage fut la réaction de cycloaddition, elle aussi effectuée à l'aide de la résine. Dans ce cas, un chauffage fut nécessaire afin de rendre la réaction quantitative, et, tout comme pour la formation de l'azoture, une petite quantité d'eau, dans laquelle le sulfate de cuivre et l'ascorbate de sodium ont préalablement été dissous, a été ajoutée au solvant de la réaction (DMF). La progression de la réaction a été suivie à l'aide de la spectroscopie infrarouge, où la disparition de la bande à 2100 cm<sup>-1</sup>, caractéristique de l'azoture, permet d'affirmer que la réaction est bel et bien complète.

Finalement, la libération du produit fixé sur la résine a été effectuée via l'utilisation d'acide trifluoroacétique (TFA) dans le DCM. Après le lavage de la résine au DCM et évaporation, le produit brut obtenu a été purifié via une précipitation à l'éther. Après toutes ces étapes de synthèse, il fut possible de récupérer la molécule **3.13**, dans un excellent rendement global de 84 %, basé sur l'addition initiale du premier acide aminé.

#### *3.3.1.1.4. Analyse du pouvoir inhibitoire des molécules sans groupement nitro sur le fragment benzyle*

Comme pour les valeurs cinétiques présentées plus haut, les valeurs d'IC<sub>50</sub> ont été utilisées afin de comparer le potentiel d'inhibition des différentes molécules envers la gpITG2. Ces valeurs sont présentées au Tableau 3.2.

**Tableau 3.2 Comparaison, avec le dérivé nitré, d'IC<sub>50</sub> de molécules de la famille des triazoles sans groupement nitro sur la partie benzylique**

Substituant	Molécule	IC <sub>50</sub> (µM)
-NO <sub>2</sub>	<b>1.20</b>	2,1 ± 0,3 <sup>117</sup>
-CO <sub>2</sub> Me	<b>3.10</b>	8,4 ± 0,6
-CO <sub>2</sub> H	<b>3.11</b>	14 ± 3
-SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	<b>3.12</b>	8,2 ± 0,8
-LPF-OH	<b>3.13</b>	16,6 ± 0,3

Ces données démontrent que le groupement nitro sur la partie benzylique n'est pas essentiel au pouvoir inhibitoire et qu'il serait facilement remplaçable par d'autres fonctions facilement modulables, comme les esters ou encore une séquence d'acides aminés.

Au niveau des valeurs d'IC<sub>50</sub> proprement dites, peu de différences sont observables vis-à-vis des quatre nouvelles molécules testées. De plus, si ces valeurs sont comparées avec celle du composé **3.4**, molécule ne possédant aucun substituant sur le groupement benzyle, soit un IC<sub>50</sub> d'environ 4,3 µM<sup>117</sup>, il est possible de remarquer qu'aucune de ces nouvelles molécules n'a permis d'augmenter le potentiel d'inhibition de cette classe de composés, et ce, même la molécule **3.13**, où l'inhibiteur a été inséré dans une séquence peptidique de haute affinité envers la TG2.

Il est donc permis de se questionner sur la pertinence de la diversification de la substitution du groupement benzyle. En effet, mis à part le groupement nitro, la molécule la plus efficace demeure la molécule sans substitution à ce niveau. De plus, le composé dinitré (molécule **1.20**) présente une certaine forme de symétrie, pouvant expliquer son meilleur pouvoir inhibitoire par rapport au composé sans substitution sur le groupement benzyle. En effet, cette molécule a potentiellement accès à un plus grand nombre de modes de liaison avec l'enzyme, permettant d'accroître son efficacité.

Aussi, il serait également pertinent de se questionner sur le mode réel de liaison de ces inhibiteurs à l'enzyme, afin de pouvoir mieux comprendre les interactions qui sont importantes ou non, dans une perspective de design rationnel de nouvelles molécules. Des études en ce sens ont été entreprises et seront l'objet des deux chapitres suivants.

### 3.3.2. Susceptibilité du squelette trans-cinnamoyle à l'attaque des thiols

Néanmoins, le principal désavantage du squelette trans-cinnamoyle demeure la présence d'un accepteur de Michael au sein de la structure. En effet, la liaison double est très polarisée, dû à la présence du carbonyle, la rendant susceptible à une attaque nucléophile, notamment par le glutathion, présent en grande quantité, jusqu'à 10 mM<sup>127</sup>, dans les cellules humaines.

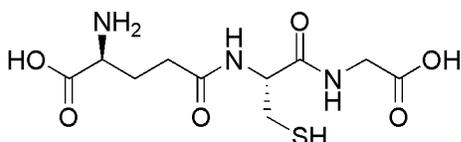


Figure 3.10 Structure du glutathion (GSH)

#### 3.3.2.1. Vérification de la susceptibilité à l'attaque des thiols

Afin de vérifier la susceptibilité réelle du squelette trans-cinnamoyle à l'attaque nucléophile d'un thiol, deux des molécules les plus prometteuses synthétisées par le groupe<sup>116,117</sup>, présentées précédemment à la Figure 1.11, reproduite ci-dessous, ont été mises dans des conditions mimant l'environnement physiologique d'une cellule (HEPES 50 mM, pH 7,4, 0,2 mM GSH) auquel a été ajouté 3 % d'acétonitrile, afin de permettre la solubilité des inhibiteurs (0,03 mM).

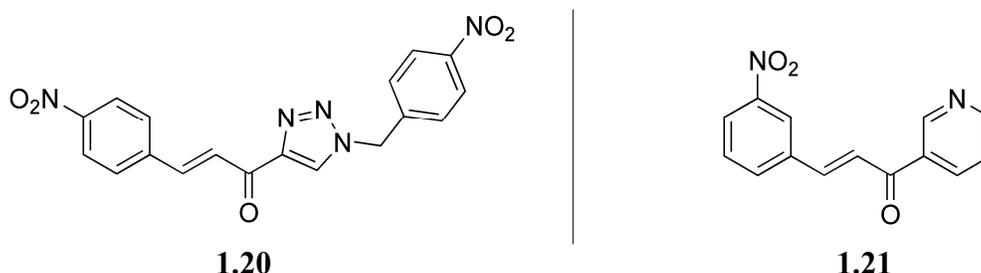
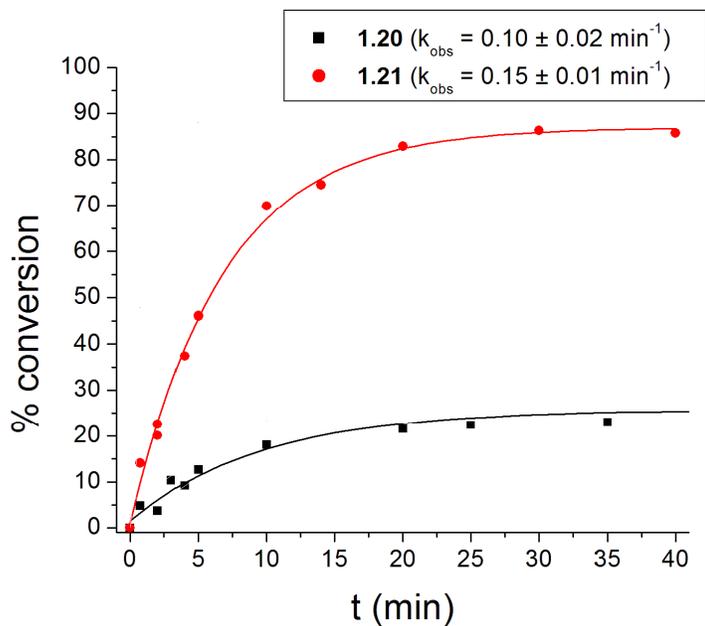


Figure 1.11 Inhibiteurs réversibles de la TG2 basés sur le squelette trans-cinnamoyle

Par la suite, ces mélanges ont été analysés par LC-MS, sur une période variant de 40 à 320 minutes, et un pourcentage de conversion a été calculé, selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Aire sous le pic de l'inhibiteur lié au GSH}}{\sum \text{Aires sous le pic (inhibiteur seul et inhibiteur lié au GSH)}} \times 100 \quad 3.1$$

Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 3.11.



Entrée	Molécule	Temps de rétention <sup>a</sup> (min)
1	1.20 + GSH	3,43
2	1.20	5,72
3	1.21 + GSH	4,71
4	1.21	7,07

<sup>a</sup>Colonne Luna C18 2,5  $\mu\text{m}$  50 x 3 mm. Après une minute à 50 % MeOH/H<sub>2</sub>O, un gradient continu, sur 8 minutes, allant de 50 % à 90 % MeOH/H<sub>2</sub>O a été utilisé.

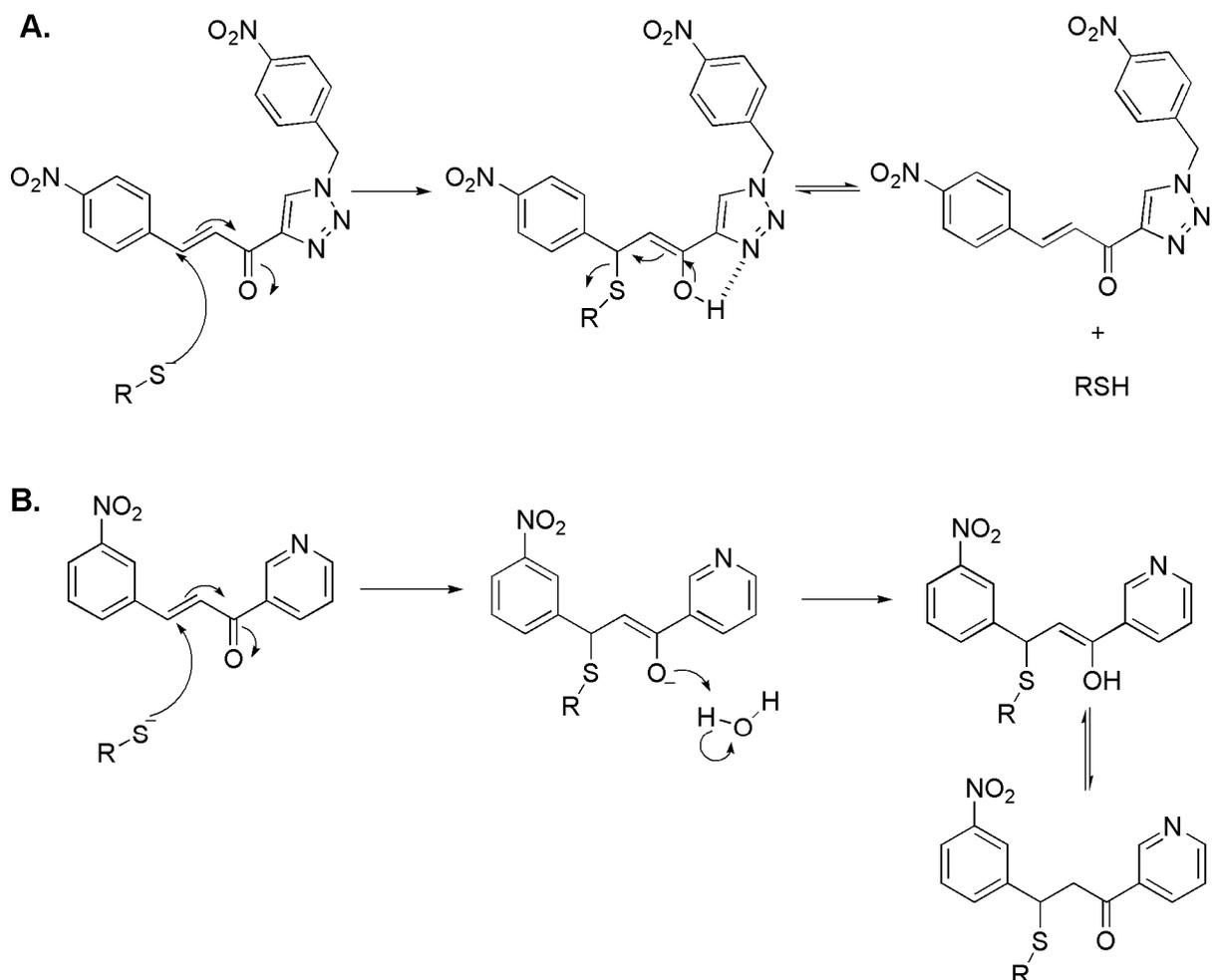
**Figure 3.11 Analyse, via LC-MS, de la susceptibilité à l'attaque par le GSH des molécules 1.20 et 1.21**

Cette étude a permis de démontrer la susceptibilité réelle des molécules préalablement développées dans le groupe à l'attaque de thiols. En effet, pour la molécule **1.21**, de type azachalcone, la conversion est quasi-totale après une trentaine de minutes d'incubation. Par contre, les résultats sont plus surprenants pour la molécule **1.20**, de type triazole.

En effet, dans ce cas, la conversion stagne à environ 20 %, et ce, sur une période de plus de 5 heures d'incubation (résultats non-présentés ici). Néanmoins, ce type de molécules présente une susceptibilité non-négligeable à l'attaque par un thiol, mais permet aussi d'espérer la possibilité d'enrayer la réaction chimique indésirable de se produire, en modifiant légèrement le squelette trans-cinnamoyle.

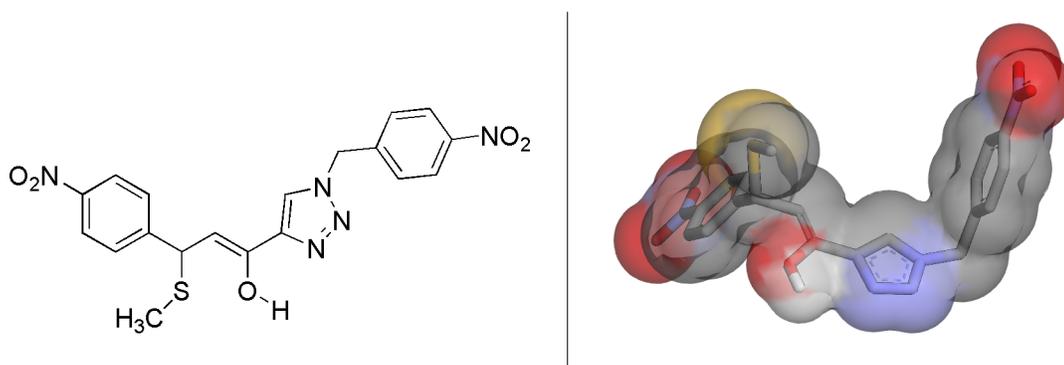
Dans le cas du dérivé triazole, l'hypothèse avancée afin de justifier la réversibilité de la réaction avec le thiol est la proximité d'un des azotes du cycle triazole avec l'hydrogène de la fonction énoil créée lors de l'addition nucléophile. Cette proximité permettrait au dérivé triazole de stabiliser l'intermédiaire énoil, par pont H, tel que présenté dans le mécanisme « A » de la Figure 3.12, facilitant ainsi la réaction inverse.

Dans le cas des dérivés de type azachalcone, cette stabilisation est impossible, comme illustré dans le mécanisme « B » de la Figure 3.12, justifiant, par le fait même, la conversion quasi-totale du composé en quelques minutes, en présence d'un thiol.



**Figure 3.12 Suggestion de mécanismes permettant d'expliquer les résultats obtenus face à la susceptibilité d'attaque par un thiol du squelette trans-cinnamoyle**

De plus, une minimisation énergétique, utilisant un champ de force de type AMBER dans une boîte d'eau autour de la molécule, tentant de mimer l'environnement chimique utilisé lors de l'expérience, a été effectuée afin de visualiser, en trois dimensions, si cette hypothèse reste plausible. Cette minimisation a permis de constater qu'effectivement, dans l'espace, l'azote du cycle triazole et l'oxygène de l'énol peuvent se retrouver très près l'un de l'autre, venant appuyer notre hypothèse. Une représentation tridimensionnelle de cette minimisation est présentée à la Figure 3.13.



**Figure 3.13 Proximité d'un azote du cycle benzotriazole avec l'hydrogène de la fonction énol de l'adduit d'addition nucléophile**

Ceci nous a donc mené à tenter de modifier le squelette trans-cinnamoyle afin de diminuer la susceptibilité envers l'attaque par les thiols, en conservant, bien évidemment, le pouvoir inhibitoire des nouvelles molécules créées.

### 3.3.2.2. Synthèse de nouvelles classes d'inhibiteurs permettant de diminuer la susceptibilité à l'attaque des thiols

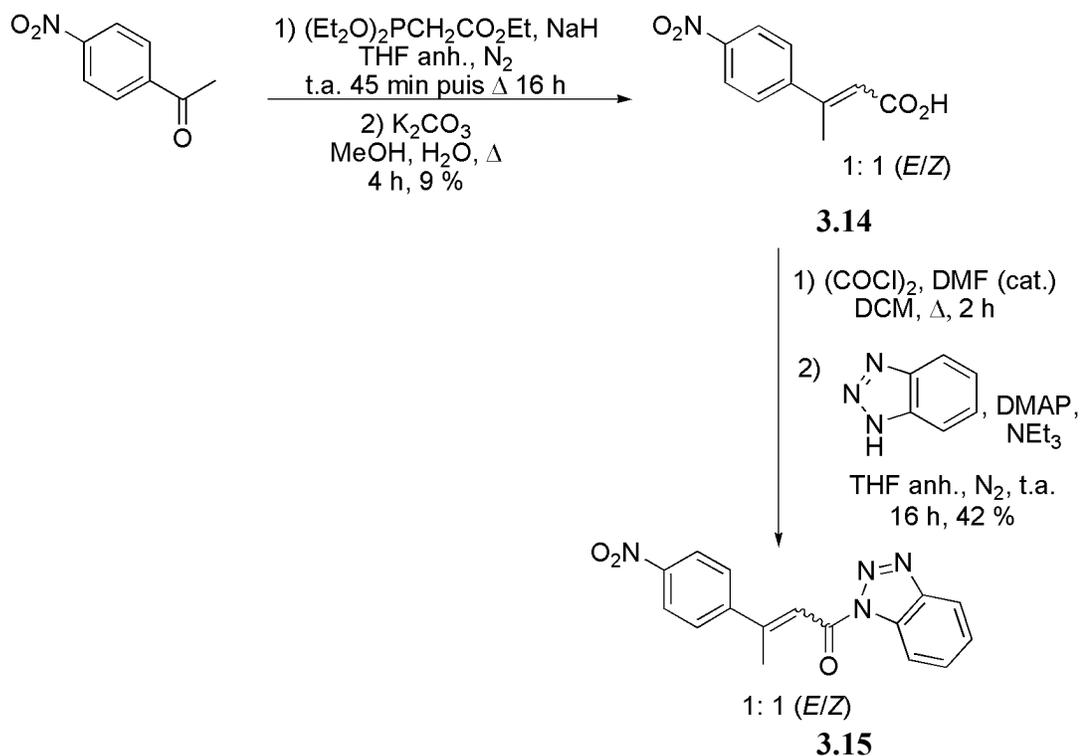
Trois approches ont été explorées : l'ajout de groupements à la liaison double du cinnamoyle afin de réduire son électrophilie, l'insertion de cycles (aromatiques ou non) afin de remplacer le groupement trans-cinnamoyle et l'utilisation d'une liaison triple plutôt que d'une liaison double dans le squelette trans-cinnamoyle.

#### 3.3.2.2.1. Fonctionnalisation du carbone $\beta$ de la fonction trans-cinnamoyle

De prime abord, nous avons pensé ajouter une chaîne carbonée au carbone  $\beta$  de la liaison double de la fonction trans-cinnamoyle. En effet, en ajoutant une chaîne carbonée à cette position, il serait possible de diminuer l'électrophilie du carbone  $\beta$ , puisqu'une chaîne

carbonée, par effet inductif répulsif, augmente la densité électronique des carbones voisins. De plus, en ajoutant un substituant à cette position, l'encombrement stérique est augmenté, réduisant ainsi le potentiel d'une attaque nucléophile sur la liaison double.

Pour ces raisons, deux molécules de cette classe ont été synthétisées, soit une possédant un groupement méthyl et une autre possédant un groupement isopropyl sur le carbone  $\beta$  de la fonction énone.



**Figure 3.14. Synthèse du (*E/Z*)- $\beta$ -méthyl-*p*-nitrocinnamoylbenzotriazolylamide**

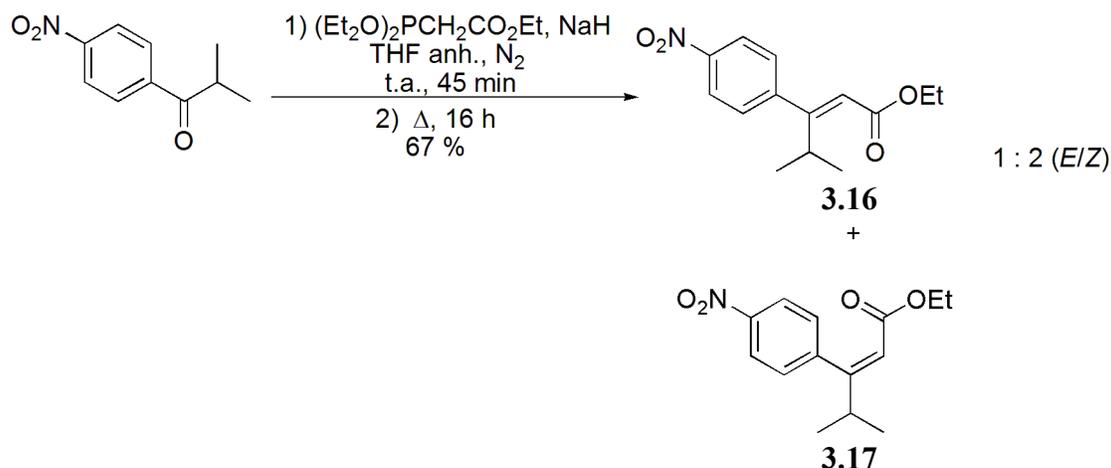
Dans le cas du dérivé méthylé (molécule 3.15), il a été obtenu via une réaction effectuée en milieu basique entre le benzotriazole et le chlorure d'acyle synthétisé à l'aide de l'acide carboxylique parent. Cet acide carboxylique (molécule 3.14) a quant à lui été préparé via une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons suivie d'une saponification de l'ester, à l'aide d'une procédure décrite dans la littérature<sup>182</sup>.

Un mélange 1 : 1 a été obtenu dès le départ entre les diastéréoisomères *E* et *Z* et ceux-ci n'ont pu être séparés par chromatographie flash. La prépondérance de chacun des diastéréoisomères a été évaluée par spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$ , via le dédoublement des pics,

possédant une hauteur semblable dans tous les cas, correspondants au groupement méthyle additionné à la liaison double, ainsi qu'à la fonction carbonylée.

Le benzotriazole a été choisi comme point de comparaison puisqu'il permet d'être facilement greffé à une molécule. Son utilisation va ainsi faciliter la quantification directe de l'effet des modifications apportées au squelette trans-cinnamoyle de la molécule, puisque le *E-p*-nitrocinnamoylbenzotriazolylamide (molécule **3.31**) a été préalablement synthétisé et évalué par le groupe<sup>116</sup>.

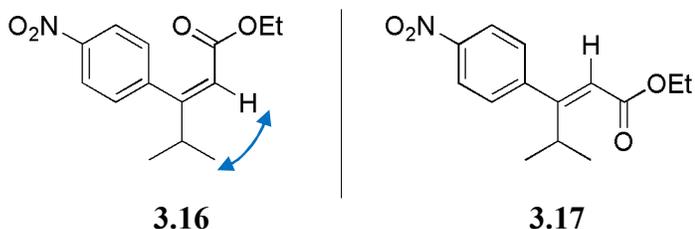
De son côté, le dérivé contenant un isopropyl sur le carbone  $\beta$  a été synthétisé via une stratégie similaire où, dans un premier temps, une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons a été effectuée<sup>182</sup>, tel que présenté à la Figure 3.15.



**Figure 3.15 Préparation du (*E/Z*)- $\beta$ -isopropyl-*p*-nitrocinnamoate d'éthyle**

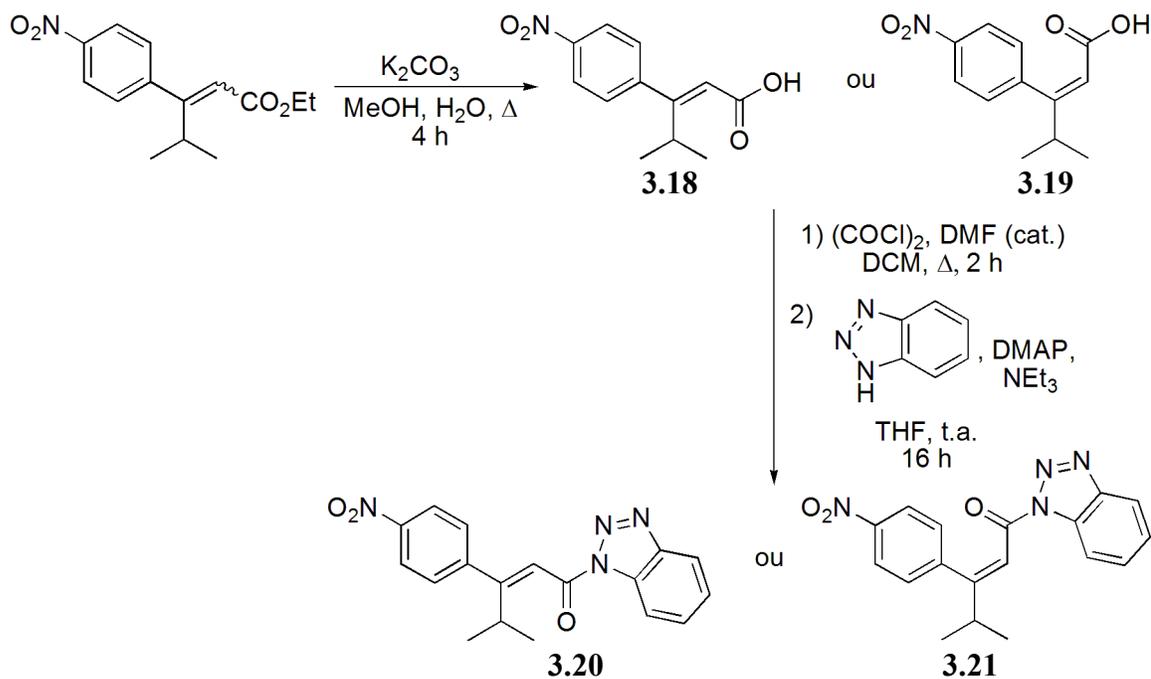
Contrairement au dérivé méthylé, il fut possible de séparer les deux diastéréoisomères formés par chromatographie sur gel de silice, et une prépondérance de 2 : 1 en faveur de l'isomère *Z* a été obtenue.

L'identification de chacun des diastéréoisomères a été effectuée par spectroscopie RMN de type NOESY<sup>183</sup>. Ce type d'analyse permet d'évaluer l'interaction spatiale des hydrogènes d'une molécule. Comme le montre la Figure 3.16, le composé **3.16** a le potentiel d'être distingué de la molécule **3.17** à l'aide de cette méthode puisque, dans le premier cas, le proton vinylique peut interagir avec les protons du groupe isopropyl, tandis que, dans le second cas, cette interaction est impossible.



**Figure 3.16 Interactions spatiales du proton vinylique permettant la distinction entre des alcènes *E* et *Z* par spectroscopie RMN de type NOESY**

Par la suite, une saponification a été effectuée<sup>182</sup>, suivie de la formation du chlorure d'acyle permettant le couplage subséquent du benzotriazole, comme présenté à la Figure 3.17.



Entrée	Molécule	Liaison double	Rendement saponification (%)	Rendement couplage (%)
1	3.20	<i>E</i>	65	71
2	3.21	<i>Z</i>	69	62

**Figure 3.17 Synthèse en parallèle des molécules (*E/Z*)- $\beta$ -isopropyl-*p*-nitrocinnamoylbenzotriazolamide**

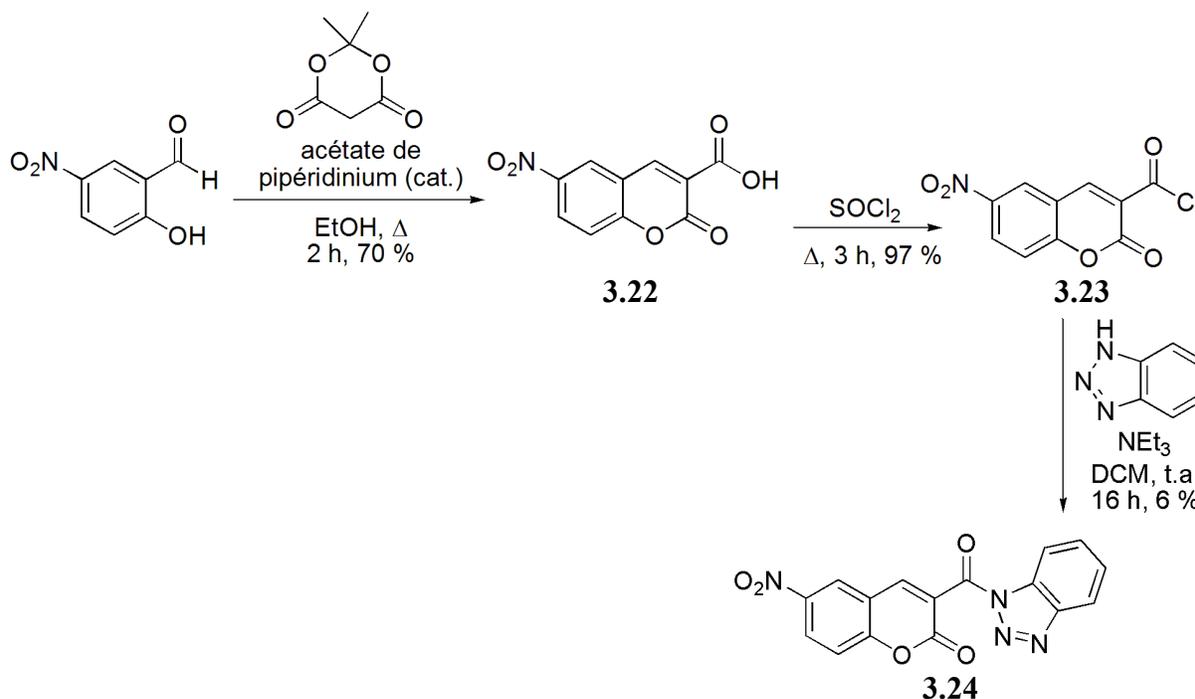
Cette séquence a permis d'obtenir deux nouvelles molécules pouvant être testées envers la TG2 et permettant de vérifier deux éléments à la fois :

- 1) l'influence de la présence d'un groupement volumineux en position  $\beta$  de la fonction énone,
- 2) l'effet de la géométrie de la liaison double sur l'interaction avec l'enzyme de cette classe d'inhibiteurs réversibles compétitifs.

### 3.3.2.2.2. Utilisation de cycles afin de remplacer la liaison double du squelette *trans*-cinnamoyle

Une autre approche envisagée afin de diminuer la susceptibilité de nos inhibiteurs réversibles à une attaque nucléophile par les thiols fut l'utilisation d'un cycle permettant de remplacer la liaison double du squelette *trans*-cinnamoyle.

Pour sa commodité de synthèse, un cycle coumarine a tout d'abord été préparé.



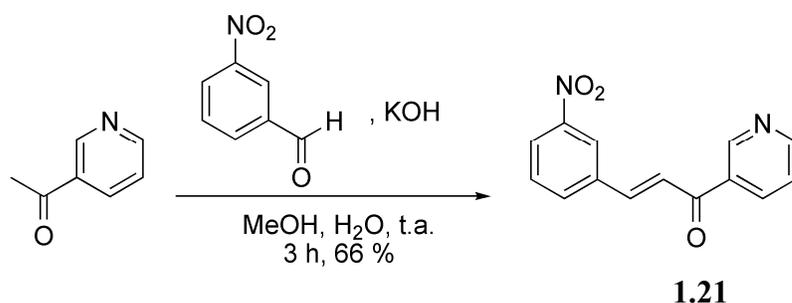
**Figure 3.18 Synthèse du 6-nitro-2-oxo-2H-chromène-3-benzotriazolylamide**

L'hypothèse de départ pour l'utilisation de ce type de cycle réside sur le fait que la liaison double de la coumarine est impliquée dans l'aromaticité du cycle, ce qui devrait réduire son électrophilie.

La préparation de la molécule convoitée a été effectuée via une condensation de Knoevenagel, catalysée par l'acétate de pipéridinium, entre l'acide de Meldrum et le 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde<sup>184</sup>. Par la suite, l'acide carboxylique a été converti en chlorure d'acyle à l'aide du chlorure de thionyle afin d'être couplé au benzotriazole. Cette séquence a permis d'obtenir, dans un rendement très modeste, dû, entre autres, à la faible nucléophilie du benzotriazole ainsi qu'à la faible solubilité du composé, la molécule **3.24**, pouvant être testée pour déterminer son pouvoir inhibiteur ainsi que sa propension à réagir avec les thiols.

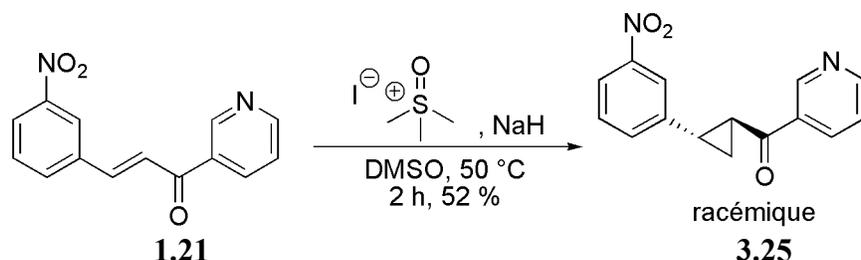
Une autre option considérée a été l'utilisation d'un cyclopropane en remplacement de la liaison double du cinnamoyle. Comme la cyclopropanation peut s'effectuer directement à l'aide d'un composé déjà synthétisé par le groupe, la molécule **1.21**, un dérivé de la classe des azachalcones, a été sélectionnée. Ceci permettra, par le fait même, de pouvoir comparer le potentiel d'inhibition des nouvelles molécules préparées avec un inhibiteur de référence. Le choix de la molécule **1.21** a été fait pour la rapidité de synthèse du composé et sa préparation possible à large échelle, ainsi que pour la bonne solubilité de la molécule dans différents solvants organiques, ainsi que dans les solutions aqueuses utilisées pour les essais biologiques.

La préparation de l'azachalcone de départ a été effectuée par une condensation aldolique en milieu basique entre le 3-nitrobenzaldéhyde et le 3-acétylpyridine<sup>116</sup>, comme présenté à la Figure 3.19.



**Figure 3.19 Synthèse du (*E*)-3-(3-nitrophényl)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-én-1-one**

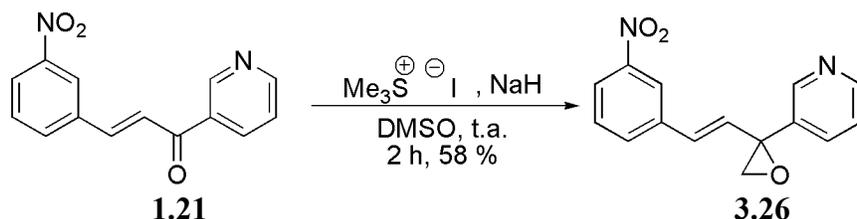
Par la suite, la cyclopropanation a été réalisée à l'aide de la réaction de Corey-Chaykovsky<sup>185,186</sup>, permettant l'obtention d'un mélange racémique du cyclopropane anti, géométrie confirmée par spectroscopie RMN de type NOESY, décrite précédemment.



**Figure 3.20 Synthèse du trans-2-(3-nitrophényl)cyclopropyl(pyridin-3-yl)méthanone à l'aide de la réaction de cyclopropanation de Corey-Chaykovsky**

De plus, une réaction similaire a pu être réalisée, toujours sur l'azachalcone de référence **1.21**, permettant la formation, dans ce cas, d'un époxyde<sup>185,187</sup> à partir de la cétone contenue dans le squelette cinnamoyle. Comme la liaison double de la molécule **3.26** n'est

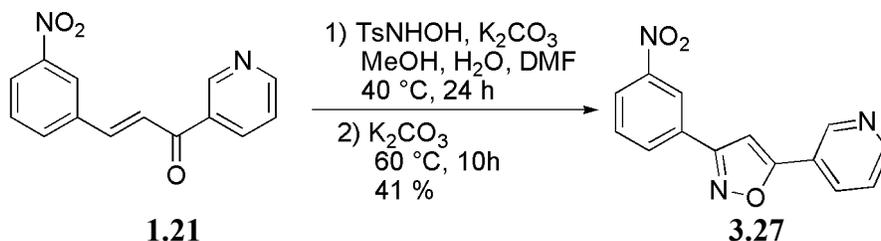
plus conjuguée à un carbonyle, son électrophilie est fortement diminuée, ce qui devrait diminuer, voire enrayer, la propension de cette classe de molécules à subir l'attaque nucléophile d'un thiol. La réaction d'époxydation<sup>185,186</sup> effectuée est présentée à la Figure 3.21.



**Figure 3.21 Préparation du 3-(2-(3-nitrostyryl)oxiran-2-yl)pyridine via une époxydation de Corey-Chaykovsky**

Finalemment, le dernier cycle utilisé afin de remplacer le squelette trans-cinnamoyl fut l'isoxazole. En effet, ce type de cycle, en plus d'être aromatique, diminuant ainsi l'électrophilie de la liaison double, a l'avantage de posséder un oxygène à l'intérieur du cycle, permettant de mimer le carbonyle du cinnamoyl. De plus, comme pour les deux molécules précédentes, il est possible d'obtenir ce cycle en utilisant, comme point de départ, l'azachalcone de référence **1.21**.

Le cycle isoxazole peut être formé de manière régiosélective, selon une méthode décrite par Tang *et al.*<sup>188</sup>, à l'aide d'une cétone  $\alpha/\beta$ -insaturée, comme la molécule **1.21**, et du *N*-hydroxy-4-toluènesulfonamide<sup>189</sup> (TsNHOH), en milieu basique. Cette méthode a permis d'obtenir la molécule **3.27**, dans un rendement appréciable de 41 %, qui sera, subséquemment, testée comme inhibiteur de la TG2 ainsi que pour son potentiel d'attaque par un thiol.

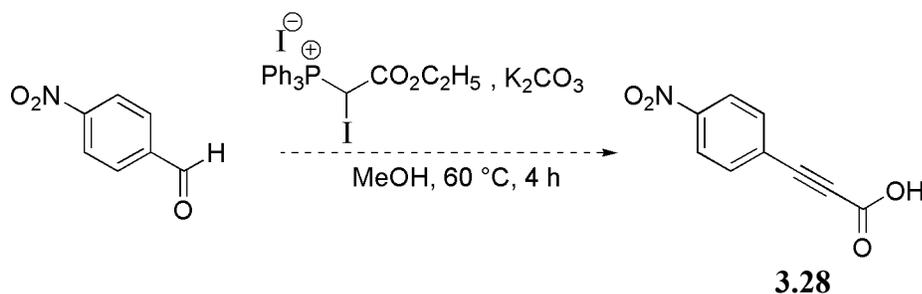


**Figure 3.22 Synthèse du 3-(3-(3-nitrophényl)isoxazol-5-yl)pyridine à partir d'une azachalcone**

### 3.3.2.2.3. Utilisation d'un gabarit ynone en substitution à la fonction trans-cinnamoyle

La dernière avenue utilisée afin de diminuer la propension de la fonction trans-cinnamoyle à l'attaque nucléophile d'un thiol a été une substitution de la liaison double du squelette pour une liaison triple.

Afin d'y parvenir, différentes méthodes de synthèse ont été explorées. Par exemple, comme décrit par Chenault *et al.*<sup>190</sup>, la préparation d'acides propynoïques  $\beta$ -substitués est possible via une réaction entre un aldéhyde (ou une cétone) et l'iodure d'(éthoxycarbonyliodométhyl)triphénylphosphonium en milieu basique. Cette réaction permet de former, dans un premier temps, l'ester  $\alpha$ -iodo- $\alpha,\beta$ -insaturé, qui, en milieu basique, subit une élimination permettant la formation de la liaison triple.

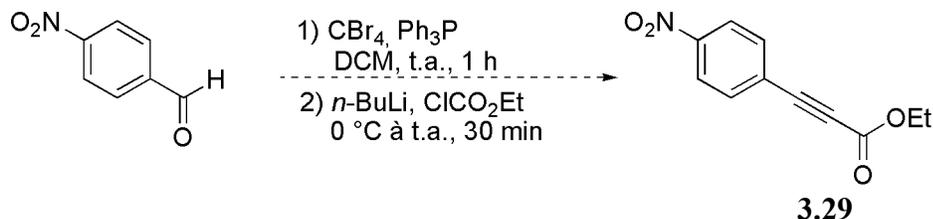


**Figure 3.23** Voie de synthèse envisagée de l'acide 3-(4-nitrophényl)propynoïque à l'aide d'iodure d'(éthoxycarbonyliodométhyl)triphénylphosphonium en milieu basique

Néanmoins, cette méthode, décrite à la Figure 3.23, n'a pas permis la préparation du composé **3.28** convoité, dû à la difficulté d'obtenir le sel de phosphonium mono-iodé, nécessaire à la réaction.

En effet, l'iodure d'(éthoxycarbonyliodométhyl)triphénylphosphonium doit être synthétisé à partir du bromure d'(éthoxycarbonylméthyl)triphénylphosphonium et d'iode<sup>190</sup>, mais tous les essais effectués ont mené à des mélanges des composés non-, mono-, ou di-iodés. Lorsque ces mélanges complexes ont été utilisés avec le *p*-nitrobenzaldéhyde en milieu basique, une mixture d'énone et d'ynone, difficilement séparables, a été obtenue, ce qui nous a menés à envisager une autre stratégie de synthèse.

Une option tentée a été la réaction de Corey-Fuchs<sup>191,192</sup>, toujours à l'aide du *p*-nitrobenzaldéhyde, comme présenté à la Figure 3.24.

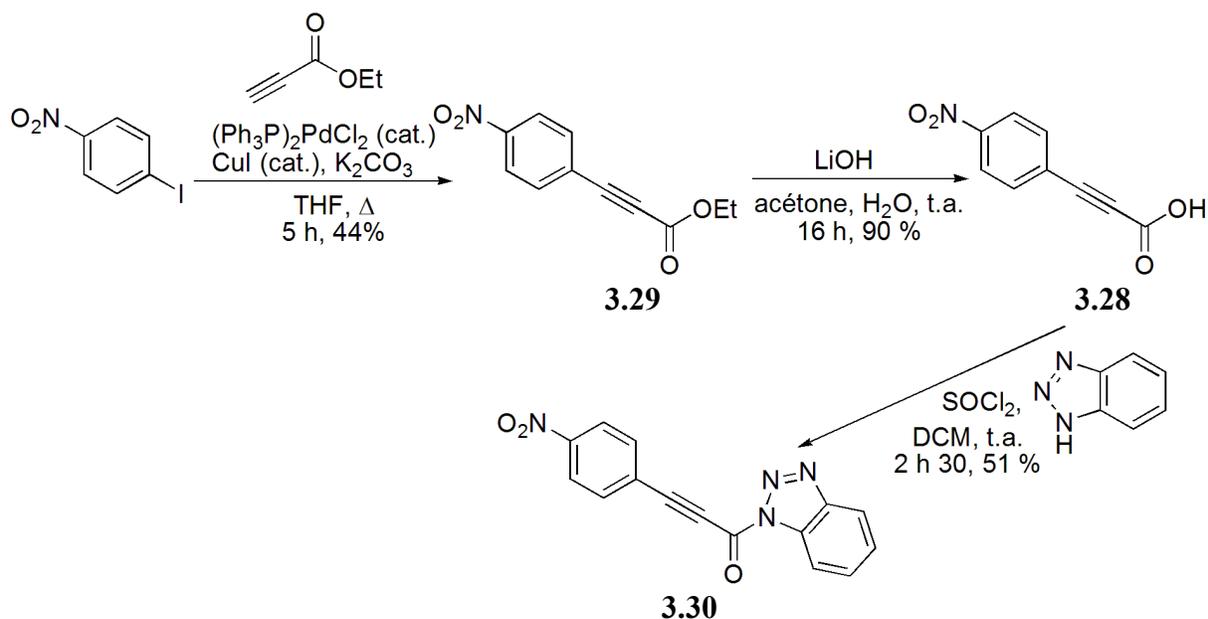


**Figure 3.24 Réaction de Corey-Fuchs permettant la préparation du 3-(4-nitrophényl)propiolate d'éthyle**

Cette réaction, qui se déroule en deux temps, permet la formation, dans une première étape, d'un dérivé 1,1,-dibromoalc-1-ène, qui, dans une deuxième étape, en milieu basique, peut être transformé en alcyne. De plus, en milieu fortement basique, l'alcyne terminal ainsi formé pourrait être directement déprotonné, permettant une addition nucléophile sur le chloroformate d'éthyle, menant ainsi directement à l'ester **3.29** désiré.

Néanmoins, lorsque tentée avec le *p*-nitrobenzaldéhyde, cette réaction a mené à l'isolation du dibromoalcène, et toutes les tentatives permettant la formation de l'alcyne ont mené à l'obtention de produits de dégradation. Cette voie de synthèse a donc été, elle aussi, mise de côté.

La dernière approche considérée a été un couplage de type Sonogashira<sup>178,193</sup> entre le 1-iodo-4-nitrobenzène et le propiolate d'éthyle, tel que présenté à la Figure 3.25.



**Figure 3.25 Préparation du 1-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-3-(4-nitrophényl)prop-2-yn-1-one via un couplage de Sonogashira**

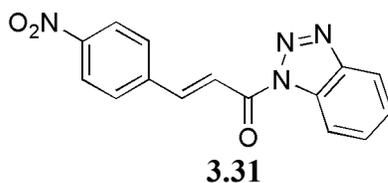
Bien que le rendement du couplage au palladium soit modeste, cette réaction permet l'obtention de l'ester désiré, après purification par chromatographie sur gel de silice. Ce composé peut par la suite être saponifié, permettant l'obtention de l'acide carboxylique désiré, avec un rendement acceptable de 37 % sur deux étapes. Finalement, le benzotriazole a été greffé à la structure via une réaction avec le chlorure d'acyle formé *in situ*, à l'aide du chlorure de thionyle<sup>194</sup>. Rappelons que le benzotriazole a été sélectionné pour fin de comparaison du pouvoir inhibitoire du nouveau composé **3.30** avec la molécule de référence, le *E-p*-nitrocinnamoylbenzotriazolamide.

### 3.3.2.3. Analyse du pouvoir inhibitoire des molécules visant à diminuer la susceptibilité à l'attaque par un thiol

Afin de comparer le potentiel d'inhibition des nouvelles molécules présentées aux sections précédentes, les valeurs d'IC<sub>50</sub> seront utilisées. Les essais ont, pour la plupart, été effectués à l'aide de la hTG2, disponible à ce moment dans le groupe. Par contre, comme il a été démontré au Chapitre 2 que les paramètres cinétiques de la gpITG2 et de la hTG2 sont comparables lorsqu'utilisées dans des conditions réactionnelles similaires<sup>134</sup>, les quelques essais cinétiques effectués avec la gpITG2 n'ont pas été repris et seront utilisés afin de comparer les différentes molécules les unes avec les autres.

#### 3.3.2.3.1. Molécules de types benzotriazoles

Dans un premier temps, les molécules incluant un cycle de type benzotriazole seront évaluées. Le pouvoir inhibitoire de ces composés sera comparé à celui de la molécule **3.31**, un inhibiteur réversible connu<sup>116</sup> de la classe des *trans*-cinnamoyles.



**Figure 3.26** Structure de la molécule de référence *E-p*-nitrocinnamoylbenzotriazolamide

À la vue du Tableau 3.3, présenté à la page suivante, il est possible de constater que, bien que la présence d'un groupement méthyl en position β du cinnamoyle ait véritablement

enrayé la susceptibilité de la liaison double à l'attaque du GSH, la molécule **3.15** a perdu son potentiel d'inhibition.

**Tableau 3.3 Comparaison des valeurs d'IC<sub>50</sub> des molécules liées au benzotriazole**

Substituant	Molécule	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<i>E</i> -cinnamoyle	<b>3.31</b>	12 $\pm$ 3
<i>E/Z</i> -cinnamoyle $\beta$ -méthylé	<b>3.15</b>	> 900
<i>E</i> -cinnamoyle $\beta$ -isopropylé	<b>3.20</b>	> 900
<i>Z</i> -cinnamoyle $\beta$ -isopropylé	<b>3.21</b>	> 900
coumarine	<b>3.24</b>	145 $\pm$ 23
ynone	<b>3.30</b>	2,6 $\pm$ 0,2

Deux hypothèses peuvent être soulevées afin d'expliquer cette perte d'interactions avec l'enzyme. Premièrement, l'ajout d'un groupement méthyle en position  $\beta$  du carbonyle amène, à cette position, un groupe plus volumineux que l'hydrogène, et donc, l'encombrement stérique pourrait expliquer la mauvaise liaison du composé. Deuxièmement, ce groupement carboné est aussi plus hydrophobe que l'hydrogène, et, par conséquent, si une zone hydrophile de l'enzyme se trouve à proximité du méthyl ajouté, il se peut que cela nuise au bon positionnement de la molécule au sein de l'enzyme.

De plus, comme le composé **3.15** est un mélange équimolaire des isomères *E* et *Z*, les molécules **3.20** et **3.21** ont quand même été évaluées afin de s'assurer qu'un des isomères n'est pas un piètre inhibiteur et l'autre un excellent, menant à l'obtention d'un faux négatif avec le composé **3.15**.

Malheureusement, ces deux molécules se sont avérées être aussi de mauvais inhibiteurs, et, par conséquent, leur susceptibilité à l'attaque du GSH n'a pas été évaluée, puisque ce type de structure ne pourra être envisagé afin de remplacer la génération précédente.

De son côté, le dérivé coumarine conserve un certain potentiel d'inhibition, bien qu'il se révèle être environ 12 fois inférieur au trans-cinnamoyle parent. Toutefois, dans ce cas, la liaison double de la coumarine demeure susceptible à l'attaque nucléophile du GSH, ce qui permet d'écarter aussi cette classe de molécule.

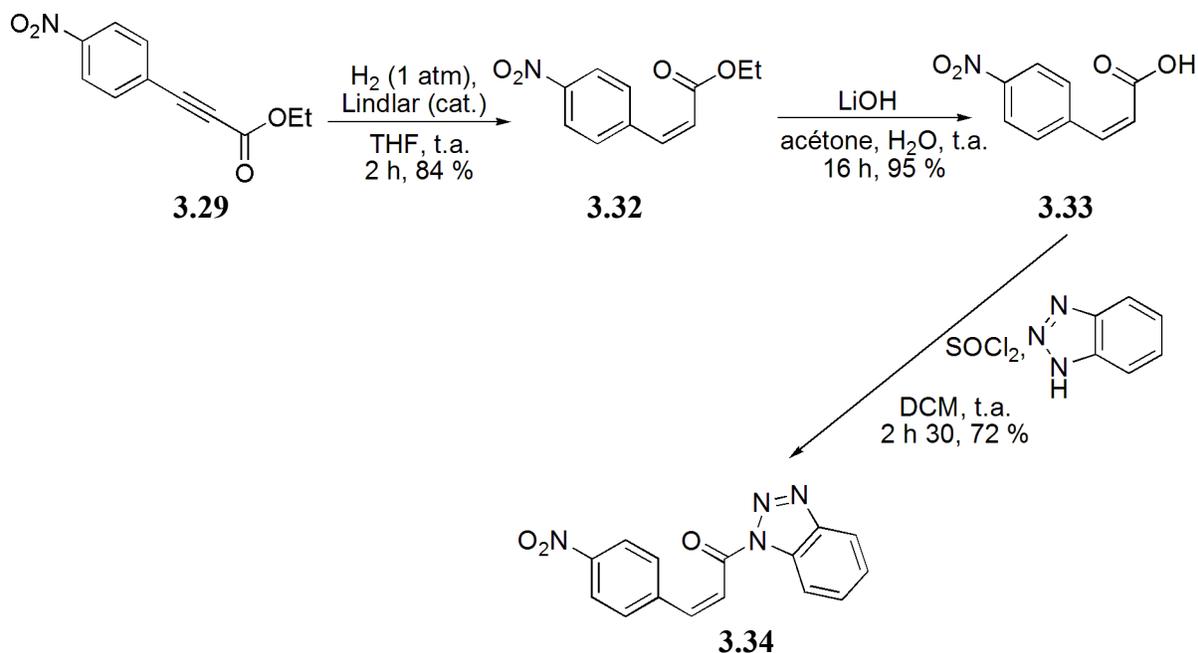
Cette réactivité de la coumarine reste surprenante, puisque la liaison double est impliquée dans l'aromaticité du cycle, mais, comme la réduction spécifique de cette liaison double est possible en utilisant du  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ <sup>195</sup>, ceci démontre un caractère plus près de l'alcène non-conjugué pour ce lien, expliquant ainsi la réactivité vis-à-vis une attaque nucléophile de la part d'un thiol.

Finalement, le composé le plus prometteur du lot semble être le dérivé ynone. En effet, ce composé se révèle être un inhibiteur près de cinq fois plus efficace que la molécule de référence.

Par contre, il n'a pas été possible de prouver, hors de tout doute, la diminution de l'électrophilie de la liaison multiple. En effet, plusieurs tests d'addition du GSH ont été conduits, et aucun n'a permis d'obtenir un résultat satisfaisant. En effet, la molécule **3.30** et ses dérivés ionisent très mal, rendant l'utilisation du LC-MS futile. De plus, cette molécule, très peu soluble, ne permet pas l'utilisation de la RMN  $^1\text{H}$  dans des conditions de type biologique afin de vérifier la présence, ou non, d'un proton vinylique qui apparaîtrait suite à une addition de GSH. Malgré tout, la plus grande densité électronique du carbone hybridé  $\text{sp}$  de l'alcyne laisse à penser que, en comparaison avec le carbone de type  $\text{sp}^2$  de la liaison double, ce nouveau gabarit devrait nuire à la réaction indésirable. Cette nouvelle classe de molécules est donc prometteuse, mais nécessite la poursuite des investigations au sujet de la propension à l'attaque nucléophile des thiols.

D'un autre côté, en obtenant l'ynone **3.30**, ceci a ouvert la porte à l'obtention aisée de l'alcène *Z* parent de la molécule **3.31**, permettant de déterminer l'effet de la géométrie de la liaison double sur le pouvoir d'inhibition des molécules de la classe des cinnamoyles.

Cet alcène *Z* a été préparé à partir de l'ester **3.29**, à l'aide d'une hydrogénation catalytique utilisant le catalyseur de Lindlar. L'ester a par la suite été saponifié avant de greffer le benzotriazole à la structure, via la formation d'un chlorure d'acyle *in situ* à l'aide du chlorure de thionyle<sup>194</sup>, comme décrit précédemment.



**Figure 3.27 Préparation du *Z*-*p*-nitrocinnamoylbenzotriazolylamide à partir du 3-(4-nitrophényl)propylate d'éthyle**

En regardant le Tableau 3.4, présenté ci-dessous, il est possible de constater qu'étonnamment, une grande différence d'inhibition peut être observée entre les deux diastéréoisomères, et ce, au profit de l'isomère *Z*. En effet, ce dernier est près de six fois plus efficace que son analogue *E*.

**Tableau 3.4 Comparaison du potentiel d'inhibition des diastéréoisomères *E* et *Z* du *p*-nitrocinnamoylbenzotriazolylamide**

Substituant	Molécule	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
<i>E</i> -cinnamoyle	<b>3.31</b>	12 $\pm$ 3
<i>Z</i> -cinnamoyle	<b>3.34</b>	2,1 $\pm$ 0,1

Ceci démontre donc que l'agencement spatial des différents groupes est primordial afin d'obtenir une liaison optimale à l'enzyme. Par contre, sans plus d'informations au niveau des interactions inhibiteur-enzyme à optimiser, il sera difficile d'effectuer un design rationnel de molécules.

#### 3.3.2.3.2. Molécules dérivées d'une azachalcone

Finalement, le Tableau 3.5 permet la comparaison des IC<sub>50</sub> des composés synthétisés à partir de l'azachalcone **1.21**.

**Tableau 3.5 Comparaison des valeurs d'IC<sub>50</sub> des molécules dérivées d'une azachalcone**

Substituant	Molécule	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
azachalcone	1.21	4,0 $\pm$ 0,6 <sup>134</sup>
trans-cyclopropane	3.25	147 $\pm$ 10
époxyde	3.26	151 $\pm$ 21
isoxazole	3.27	> 900

Selon ces données, il est possible de remarquer que le fait de remplacer le squelette trans-cinnamoyle central de la molécule par un cycle réduit de beaucoup le pouvoir d'inhibition des molécules obtenues.

En effet, dans le meilleur des cas, pour les composés **3.25** et **3.26**, l'inhibition est diminuée d'un peu moins de 40 fois par rapport à l'azachalcone de référence. Dans le pire des cas, pour le dérivé contenant un isoxazole, la molécule ne présente pratiquement pas de pouvoir inhibitoire envers la hTG2.

Comme pour les molécules évaluées à la section précédente, quelques hypothèses peuvent être soulevées afin d'expliquer ces résultats. Par exemple, le trans-cyclopropane présente une chiralité, absente de la molécule de référence, qui pourrait expliquer le manque d'affinité pour l'enzyme. Dans le cas de l'époxyde, l'oxygène possède une hybridation différente de celle du carbonyle, de type sp<sup>3</sup> plutôt que sp<sup>2</sup>, ce qui pourrait nuire au bon arrimage de cette partie de la molécule avec la hTG2. Finalement, l'isoxazole, un cycle aromatique amenant une plus grande contrainte géométrique au sein de la structure, pourrait diminuer la flexibilité globale de la molécule l'empêchant de maximiser ses interactions avec la protéine.

Néanmoins, encore une fois, en absence de données structurales sur le mode de liaison de nos inhibiteurs réversibles avec l'enzyme, il est difficile d'identifier clairement le problème auquel nous sommes confrontés, et, conséquemment, il est difficile de songer, de manière rationnelle, à des moyens de le contourner. C'est pour cette raison qu'une étude du mode de liaison de nos composés a été entreprise et les résultats seront présentés au chapitre suivant.

### 3.4. Conclusion

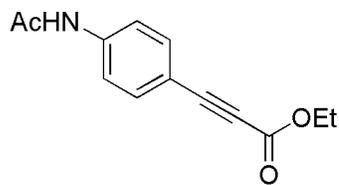
Ce chapitre est un bel exemple d'une variante du criblage à haut débit, où des molécules, dérivées d'un inhibiteur préalablement identifié, un peu par hasard, sont construites à l'aveugle, puis testées afin de vérifier si elles conservent, ou non, leur propriété inhibitrice. Cette technique permet de formuler des hypothèses quant aux pharmacophores essentiels à la molécule idéale, sans toutefois être en mesure de vérifier concrètement ces théories.

La première partie de notre étude a permis de valider le fait que, pour la classe des triazoles, le groupement nitro sur la partie trans-cinnamique n'est pas essentiel à l'activité inhibitrice et qu'il pourrait facilement être remplacé par un amide.

De plus, la synthèse de quelques composés triazoles via une cycloaddition azoture-ynone catalysée au cuivre (I) a permis de soulever la question de l'importance de la fonctionnalisation de la partie benzylique de cette classe de molécules, puisqu'aucun des nouveaux composés synthétisés n'est meilleur que le composé sans fonctionnalisation sur ce cycle.

Pour ce qui est du problème de réaction indésirable des trans-cinnamoyles avec des thiols comme le GSH, il semble que la substitution de la liaison double par une liaison triple soit la voie à privilégier pour le futur. En effet, l'IC<sub>50</sub> de 2,6 μM de la molécule **3.30** en fait une des plus puissantes développées par le groupe jusqu'à présent.

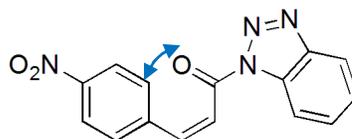
Néanmoins, la réactivité envers les thiols de cette classe de molécules n'a pu être évaluée, dû à la mauvaise ionisation de ce type de structure. Il serait donc intéressant de combiner les résultats obtenus et de développer un composé comme celui présenté à la Figure 3.28, où l'amide pourrait aider à l'ionisation ainsi qu'à la solubilité de cette classe de molécules. Cet ester pourrait, par la suite, être facilement couplé au benzotriazole, tel que décrit au sein du chapitre, pour le transformer en un inhibiteur plus que probable de la hTG2.



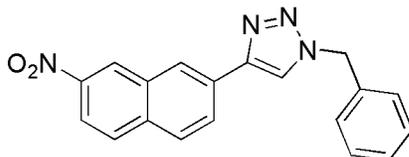
3.35

**Figure 3.28 Structure d'une ynone permettant l'évaluation potentielle, par LC-MS, de la susceptibilité à l'attaque des thiols de la nouvelle classe d'inhibiteurs réversibles identifiée**

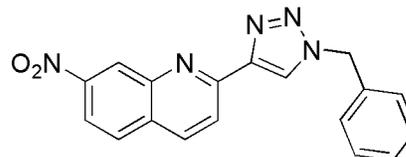
De plus, la structure de la molécule 3.34, soit le cinnamoyle *Z*, ouvre la porte à la conception de nouveaux cycles permettant de remplacer le squelette cinnamoyle. En effet, la ressemblance de cette molécule avec des cycles tels que le naphthalène ou encore la quinoline est frappante, comme le montre la Figure 3.29.



3.34



3.36



3.37

**Figure 3.29 Proposition de structures de type naphthalène ou quinoline permettant de mimer le cinnamoyle *Z***

Une investigation du potentiel d'inhibition de ces classes d'inhibiteurs devrait être largement à considérer, puisque, dans ces deux cas, la susceptibilité à l'attaque des thiols devrait être complètement enrayée, vue l'aromaticité des cycles.

Finalement, cette étude a aussi révélé l'importance de s'attarder au mode de liaison de nos composés avec l'enzyme. En effet, il fut étonnant de constater que l'ajout d'un simple groupement méthyle sur le carbone  $\beta$  du cinnamoyle enlève tout pouvoir inhibitoire à la structure, et que l'alcène *Z* est plus efficace que le dérivé *E*. Afin d'être en mesure de faire un design rationnel de nouvelles structures, des données sur la manière dont sont liés nos composés à la TG2 sont indispensables. Le début de cette étude sera le principal objet des chapitres suivants.

# Chapitre 4 : Études cinétiques des inhibiteurs réversibles

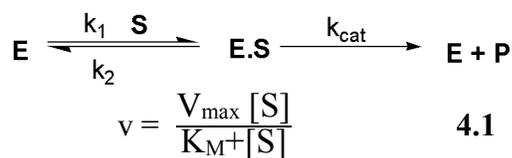
## 4.1. Les fondements de la cinétique enzymatique

L'étude de la cinétique d'une réaction chimique, comme d'une réaction enzymatique, peut nous apporter plusieurs renseignements au niveau du mécanisme réactionnel impliqué.

En effet, des études cinétiques faites sur une réaction chimique typique peuvent nous informer sur la vitesse relative des différentes étapes de la réaction, permettant d'en identifier l'étape la plus lente, soit celle limitant la vitesse de la réaction globale. Elles permettent aussi de vérifier le nombre de molécules présentes à l'étape limitante, ainsi que sur la nature de ces substances, permettant de formuler et de vérifier des mécanismes réactionnels d'une grande complexité.

Au niveau des réactions enzymatiques, les lois de la cinétique chimique s'appliquent toujours, mais, dans ce cas, l'utilisation, comme catalyseur, d'une enzyme, amènera de légères différences dans le traitement des données. En effet, dans ce cas, la vitesse de la réaction enzymatique sera proportionnelle à la concentration d'enzyme utilisée, et une cinétique de saturation sera observée par rapport à la concentration de substrat utilisée.

Deux chercheurs ont proposés, en 1913, une équation permettant de décrire cette cinétique de saturation, équation qui porte aujourd'hui leurs noms : l'équation de Michaelis-Menten<sup>196,197</sup>, présentée ci-dessous.

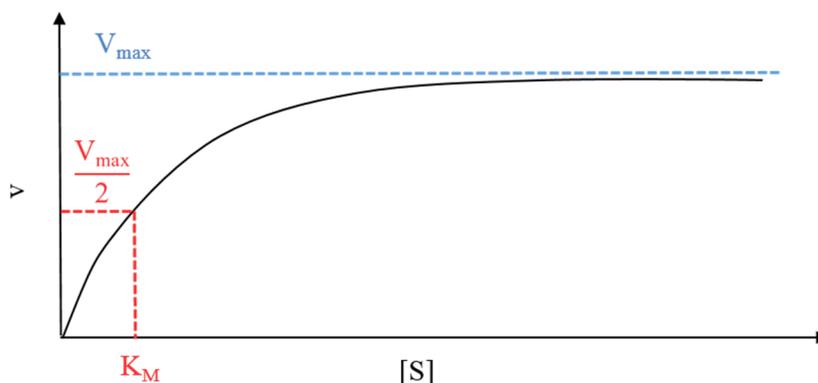


$$\text{où } V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[\text{E}]_0 \quad 4.2$$

**Figure 4.1 Schéma cinétique et équation de Michaelis-Menten**

Cette équation représente une relation de type hyperbolique entre la vitesse de la réaction enzymatique et la quantité de substrat utilisée. Comme le montre la Figure 4.2, aux faibles concentrations de substrat, la vitesse augmente de manière linéaire avec la concentration de substrat. À plus haute concentration, l'augmentation de la vitesse est moins rapide par rapport aux concentrations utilisées, allant jusqu'à atteindre un plateau, où la vitesse

reste inchangée même si une plus grande quantité de substrat est employée. Cette vitesse se nomme la vitesse maximale ( $V_{\max}$ ).



**Figure 4.2 Relation hyperbolique de type Michaelis-Menten**

Le terme  $K_M$ , quant à lui, se nomme constante de Michaelis et permet de quantifier l'affinité d'un substrat pour une enzyme. Cette constante peut être obtenue, graphiquement, via la projection, sur l'axe des abscisses, obtenue à une valeur équivalente à la moitié de la vitesse maximale et elle est liée aux paramètres cinétiques décrits plus haut selon la formule suivante :

$$K_M = \frac{k_2 + k_{\text{cat}}}{k_1} \quad 4.3$$

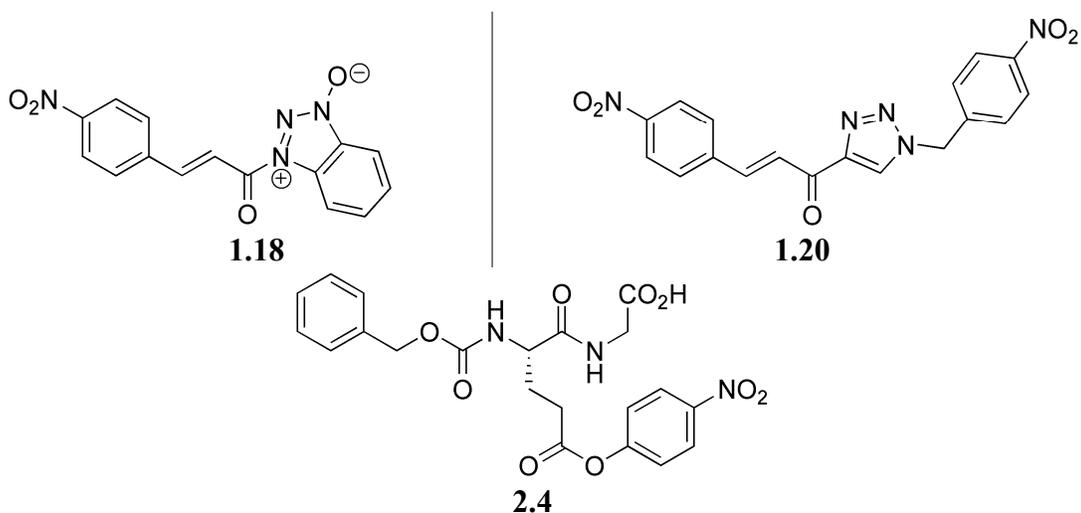
Par contre, l'étude des réactions enzymatiques se complexifie drôlement lorsqu'entre en jeu plus d'une molécule dans le schéma réactionnel d'une enzyme. Il est possible de penser, comme pour la transglutaminase, à une réaction enzymatique impliquant plus d'un substrat, ou encore à l'utilisation simultanée d'un inhibiteur et d'un substrat.

Un pionnier dans la recherche sur ces schémas cinétiques complexes est le chercheur Wallace W. Cleland. Ce dernier s'est intéressé notamment à l'étude des mécanismes de type « ping-pong »<sup>198-200</sup>, comme celui de la TGase, mais aussi au développement d'outils informatiques permettant de faciliter le traitement de ces données cinétiques complexes<sup>201,202</sup>.

Le présent chapitre utilisera donc les outils développés par ces pionniers de la cinétique enzymatique, ainsi que de plusieurs autres les ayant suivis, afin de déterminer l'influence de la présence du calcium, un métal essentiel à l'activité enzymatique de la TG2, sur l'affinité des inhibiteurs réversibles développés au sein du groupe pour l'enzyme, ainsi que pour déterminer les fondements d'une inhibition dépendante du temps pour ces mêmes molécules.

## 4.2. Approfondissement des connaissances cinétiques sur les inhibiteurs réversibles

Les inhibiteurs réversibles développés précédemment dans le groupe ont évidemment été sujet à une évaluation cinétique. Les molécules **1.18** et **1.20** présentées ci-dessous ont été soumises à une étude cinétique complète de leur profil d'inhibition envers la TG2.



**Figure 4.3 Structures de deux inhibiteurs au profil cinétique préalablement obtenu ainsi que du substrat utilisé lors des essais cinétiques**

Dans ces deux cas, la vitesse initiale de la réaction enzymatique en présence des inhibiteurs est inférieure à la vitesse de la réaction enzymatique de référence, sans inhibiteur, et cette vitesse n'atteint jamais zéro, concordant avec une inhibition de type réversible. De plus, en variant la concentration des inhibiteurs et du substrat utilisé pour les essais cinétiques, le AL5 (molécule **2.4**), il fut possible de constater une augmentation du  $K_M^{app}$  et une valeur de  $V_{max}$  stable, soit un profil concordant avec une inhibition compétitive envers le substrat donneur de l'enzyme. Ces deux structures ont donc démontré une inhibition de type compétitive et réversible envers la TG2.

Les autres molécules synthétisées sur le même gabarit n'ont pas été aussi rigoureusement caractérisées cinétiquement, et seules des valeurs d' $IC_{50}$  ont été mesurées dans ces cas, comme mentionné au chapitre précédent.

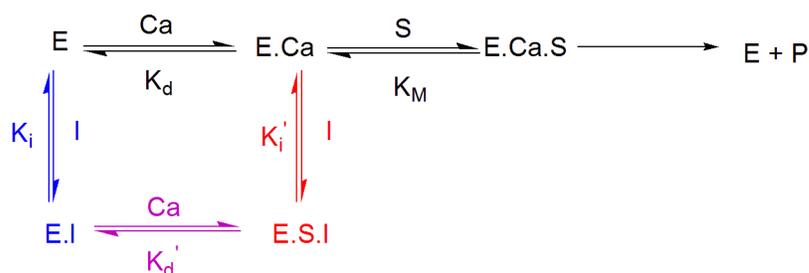
Malgré tout, la TG2 demeure une enzyme complexe, à deux substrats, nécessitant, de surcroît, la présence d'un métal, le  $\text{Ca}^{+2}$ , pour être active. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence de la présence de nos inhibiteurs réversibles sur la liaison du calcium à l'enzyme.

#### 4.2.1. Influence des inhibiteurs réversibles sur la liaison du calcium à l'enzyme

En effet, un partenariat avec la firme Evotec nous a permis d'envoyer quelques-uns de nos meilleurs composés, dont la molécule **1.20**, afin de les tester envers différents types de transglutaminases, ainsi que pour effectuer des tests en milieu cellulaire.

Une des manipulations effectuées par cette firme a été de varier la quantité de calcium présent dans leur tampon d'analyse afin de vérifier l'effet sur l' $\text{IC}_{50}$  des composés. Ils en sont venus à la conclusion que l' $\text{IC}_{50}$  de la molécule **1.20** passe de 5  $\mu\text{M}$  en présence de 0,2 mM de calcium à environ 100  $\mu\text{M}$  en présence de 5 mM de calcium. En guise de comparaison, le tampon utilisé par notre groupe pour les essais cinétiques en contient environ 3 mM.

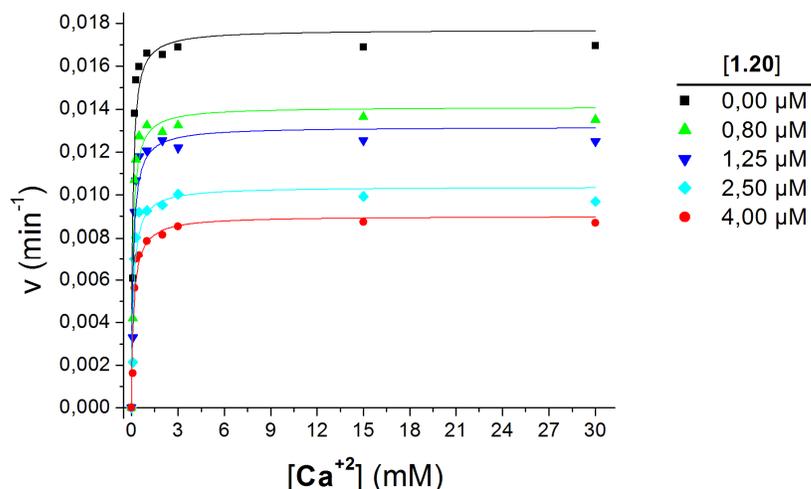
Ce résultat, obtenu par Evotec, a donc permis de soulever l'hypothèse que le calcium pourrait influencer le mode de liaison de nos inhibiteurs à l'enzyme, modulant ainsi leur affinité et affectant la puissance mesurée, en fonction de la quantité de métal utilisée. C'est pour cette raison qu'une étude du profil d'inhibition de la molécule par rapport au calcium a été entreprise.



**Figure 4.4 Schéma des équilibres hypothétiques possibles entre l'enzyme, le calcium et l'inhibiteur**

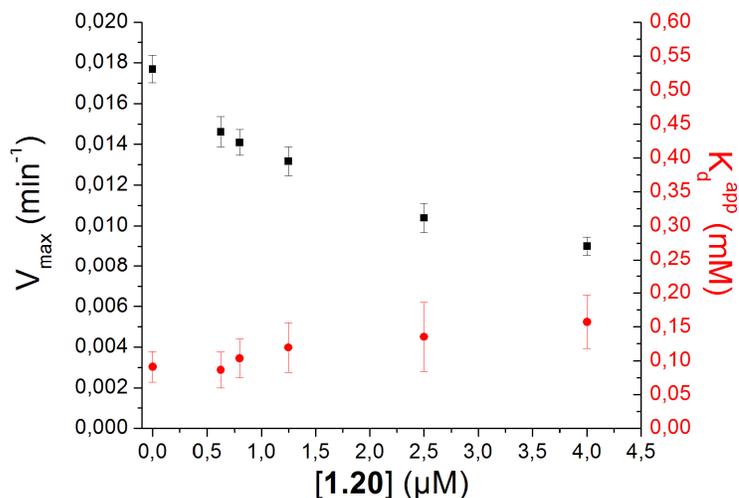
Afin de déterminer quels équilibres, situés dans le carré formé dans la partie gauche de la Figure 4.4, existent réellement entre l'enzyme, l'inhibiteur, et le calcium, une concentration fixe de substrat, dans ce cas-ci le AL5, a été utilisée pour tous les essais cinétiques, permettant de s'attarder uniquement à l'effet de la variation de la quantité de calcium sur l'inhibition.

Les cinétiques ont été conduites avec la gpITG2 dans un tampon dépourvu de calcium afin de pouvoir moduler facilement la quantité de métal présent lors de chaque essai. Les courbes cinétiques de type Michaelis-Menten ainsi obtenues sont présentées ci-dessous.



**Figure 4.5** Courbes de type Michaelis-Menten obtenues en variant la concentration de calcium et d'inhibiteur ([AL5] = 54 μM)

À la vue de ces courbes, il est clair que l'augmentation de la concentration d'inhibiteur affecte à la baisse la vitesse maximale de l'enzyme lorsque la concentration de calcium est modulée. Par contre, l'effet sur la variation du  $K_d$  du calcium est moins évident à percevoir.



**Figure 4.6** Variation du  $K_d^{app}$  du calcium et du  $V_{max}$  de l'enzyme en présence de l'inhibiteur réversible 1.20

En regardant la Figure 4.6, il semble que le  $K_d^{app}$  du calcium augmente en présence d'inhibiteur. Néanmoins, compte tenu des incertitudes sur ces valeurs, il est impossible de tirer une conclusion hors de tout doute raisonnable.

Afin de déterminer le schéma cinétique impliqué entre le calcium et notre inhibiteur, il fut nécessaire d'employer un autre type de graphique que la courbe de Michaelis-Menten.

Pour ce faire, il existe différentes techniques permettant de linéariser la fonction hyperbolique 4.1 présentée plus haut, et les graphiques les plus courants sont présentés au Tableau 4.1.

**Tableau 4.1 Linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten**

Type de graphique	Relation mathématique	Identification visuelle du type d'inhibition	Désavantage principal
<b>Lineweaver-Burk</b>	$1/v$ en fonction de $1/[S]$	Oui	Suramplification des erreurs due à la réciproque
<b>Eadie-Hofstee</b>	$v$ en fonction de $v/[S]$	Oui	Erreur sur la vitesse affecte les deux axes
<b>Hanes-Woolf</b>	$[S]/v$ en fonction de $[S]$	Non	Doit utiliser une large gamme de $[S]$

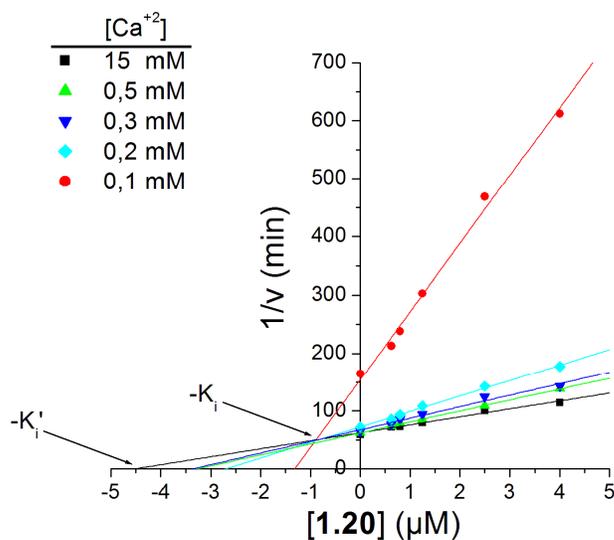
De ces trois graphiques, celui de Lineweaver-Burk est certainement le plus connu et le plus utilisé. Il s'agit d'un graphique de double réciproque de la vitesse en fonction du temps qui permet, lorsque plusieurs concentrations d'inhibiteur sont testées, une identification visuelle du patron d'inhibition<sup>203</sup>.

Une des raisons pour laquelle ce type de graphique est largement utilisé est le fait qu'il permet d'estomper les petites imperfections des courbes de Michaelis-Menten en faisant paraître des données moyennes meilleures qu'elles le sont en réalité<sup>203</sup>. Par contre, le fait d'utiliser des réciproques amène une suramplification des erreurs, surtout aux faibles concentrations, et le choix de la gamme de concentrations doit être fait minutieusement, puisqu'il y a compression des données à haute concentration et emphase sur les points à basse concentration. Pour ces raisons, le traitement de nos données via un graphique de Lineweaver-Burk ne fut pas concluant.

La linéarisation de type Eadie-Hofstee permet quant à elle aussi d'identifier visuellement le patron d'inhibition d'une molécule, mais, dans ce cas, la présence de la vitesse sur les deux axes peut mener rapidement à une déviation de la linéarité en cas d'une erreur systématique lors du calcul de la vitesse<sup>203</sup>. Contrairement au graphique de Lineweaver-Burk, ce type de linéarisation a tendance à faire paraître de bonnes données cinétiques moins bien qu'elles le devraient<sup>203</sup> et l'utilisation de ce type de linéarisation pour les résultats présentés à la Figure 4.5 n'a pas donné les résultats escomptés.

Finalement le graphique de type Hanes-Woolf ne présente pas de grands désavantages, mise à part le fait de devoir couvrir une large gamme de concentrations de substrat lors de la prise des mesures<sup>203</sup>. Cette linéarisation a pu être utilisée avec nos données, mais, d'un autre côté, ce type de graphique ne permet pas de distinguer facilement une inhibition de type incompétitif d'une inhibition non-compétitive mixte, le rendant inutile afin de déterminer un profil d'inhibition.

De plus, les trois graphiques présentés précédemment ne permettent pas la détermination de constantes d'inhibition. Afin de faire d'une pierre deux coups, un graphique de Dixon<sup>204</sup>, mettant en relation la réciproque de la vitesse en fonction de la concentration d'inhibiteur, pour différentes concentrations de substrat, a été construit tel que présenté à la Figure 4.7.



**Figure 4.7** Courbes de Dixon permettant d'identifier le profil cinétique entre le calcium et la molécule 1.20 ainsi que l'obtention des constantes d'inhibition

En se référant au Tableau 4.2, il est possible de constater que le croisement des courbes de Dixon au-dessus de l'axe des abscisses peut être le reflet de deux types d'inhibition : l'inhibition compétitive ou l'inhibition non-compétitive mixte. Par contre, le fait que la Figure 4.6 démontre clairement l'abaissement du  $V_{\max}$  permet de rejeter d'emblée l'inhibition compétitive par rapport au calcium. Un profil d'inhibition non-compétitive mixte est donc retenu.

**Tableau 4.2 Caractéristiques des différents profils d'inhibition**

Type d'inhibition	Variation $K_d^{app}$	Variation $V_{\max}$	Endroit pour le croisement des courbes par rapport à l'axe des abscisses (« x »)	
			Dixon	Cornish-Bowden
Compétitive	↑	---	Au-dessus	Aucun (parallèles)
Incompétitive	↓	↓	Aucun (parallèles)	Au-dessus
Non-compétitive simple	---	↓	Sur l'axe	Sur l'axe
Non-compétitive mixte	↑ ou ↓	↓	Au-dessus ou en-dessous	Au-dessus ou en-dessous

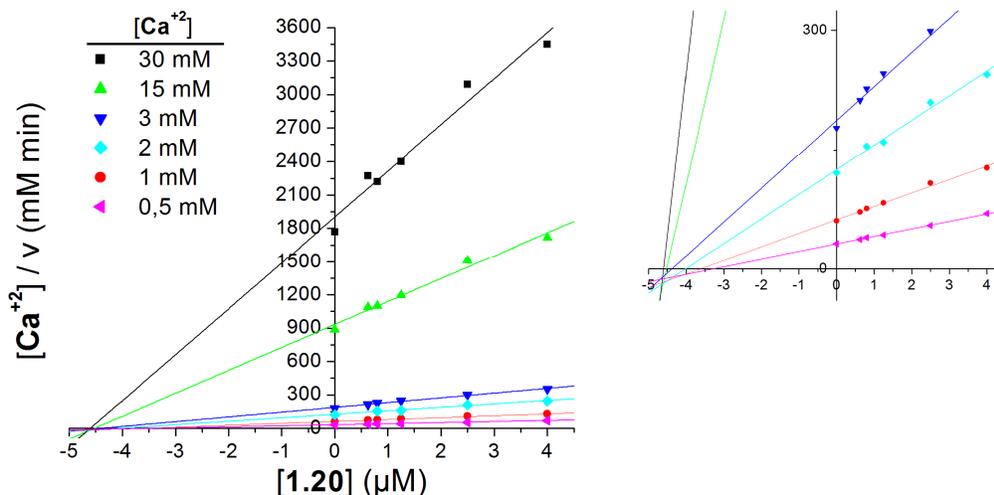
Dans ce cas, il est possible, à l'aide des courbes de Dixon, de déterminer  $K_i$  et  $K_i'$ , qui sont respectivement les constantes d'inhibition pour l'enzyme libre et le complexe enzyme-calcium<sup>204</sup>, tel que décrit à la Figure 4.4.

En effet, la projection sur l'axe des abscisses de l'intersection des différentes courbes donne accès à la valeur de  $-K_i$ , tandis que l'intersection avec l'axe des abscisses d'une courbe représentant une concentration saturante de substrat permet d'obtenir la valeur de  $-K_i'$ .

Sachant que le  $K_d$  préalablement mesuré pour le calcium envers la gpITG2 est de 0,09 mM<sup>134</sup>, la courbe représentant 15 mM de calcium a été utilisée en guise de concentration saturante, puisqu'elle représente plus de 160 fois la valeur de  $K_d$  et se retrouve alors bel et bien dans le plateau des concentrations saturantes de la courbe de Michaelis-Menten. Par conséquent, selon la Figure 4.7, la constante d'inhibition pour l'enzyme libre ( $K_i$ ) est donc de  $0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , tandis que celle pour le complexe enzyme-calcium ( $K_i'$ ) s'établit à  $4,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$ .

Afin d'obtenir une meilleure estimation de la valeur de  $K_i'$ , basée sur plus d'une courbe, il est possible d'utiliser un graphique de type Cornish-Bowden, où, dans ce cas, le rapport de la concentration de substrat et de la vitesse en fonction de la concentration

d'inhibiteur est mis en relation<sup>204</sup>. De plus, ce type de graphique permet aussi, tel que présenté au Tableau 4.2, d'obtenir un deuxième avis sur le profil cinétique existant entre le métal et notre inhibiteur.



**Figure 4.8** Courbes de Cornish-Bowden permettant la détermination de la valeur de  $K_i'$  ainsi que la confirmation du profil cinétique entre le calcium et la molécule 1.20

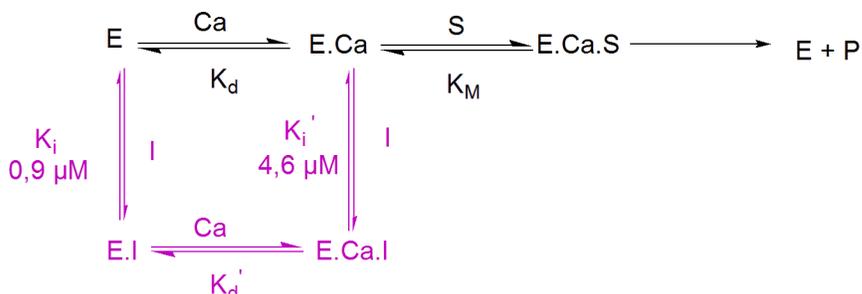
Selon l'agrandissement autour du point d'intersection des courbes, qu'il est possible de voir dans la partie de droite de la Figure 4.8, le point de rencontre des courbes se situe légèrement sous l'axe des abscisses, ce qui reste en accord avec une inhibition de type non-compétitive mixte.

De plus, fait intéressant, lorsque les courbes se rencontrent au-dessus de l'axe des abscisses sur une graphique de Dixon, elles doivent se croiser sous le même axe dans un graphique de Cornish-Bowden, et vice-versa<sup>204</sup>, ce qui est effectivement le cas ici, appuyant une fois de plus le profil d'inhibition non-compétitive mixte.

La projection, sur l'axe des abscisses, du point d'intersection du graphique de Cornish-Bowden donne accès, dans ce cas, à la valeur de la constante d'inhibition pour le complexe enzyme-calcium ( $K_i'$ ), soit environ  $4,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$ .

Cette valeur est donc très similaire à celle déterminée à l'aide du graphique de Dixon et, une chose est certaine, la valeur de  $K_i'$  déterminée à l'aide du graphique de Cornish-Bowden est supérieure à la valeur de  $K_i$  obtenue à l'aide du graphique de Dixon.

En regroupant toutes les informations obtenues, il est possible d'affirmer que la présence d'inhibiteur affecte réellement la liaison du calcium à l'enzyme et vice-versa. De plus, selon ces données, et comme illustré à la Figure 4.9, l'inhibiteur possède une affinité légèrement supérieure pour l'enzyme libre, bien que la molécule puisse aussi lier le complexe enzyme-calcium. Par contre, le profil d'inhibition non-compétitif mixte signifie que la présence du calcium n'est essentielle à la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme.



**Figure 4.9 Résumé du profil cinétique obtenu entre l'enzyme, le calcium et la molécule 1.20**

#### 4.2.2. Dépendance en temps de l'inhibition

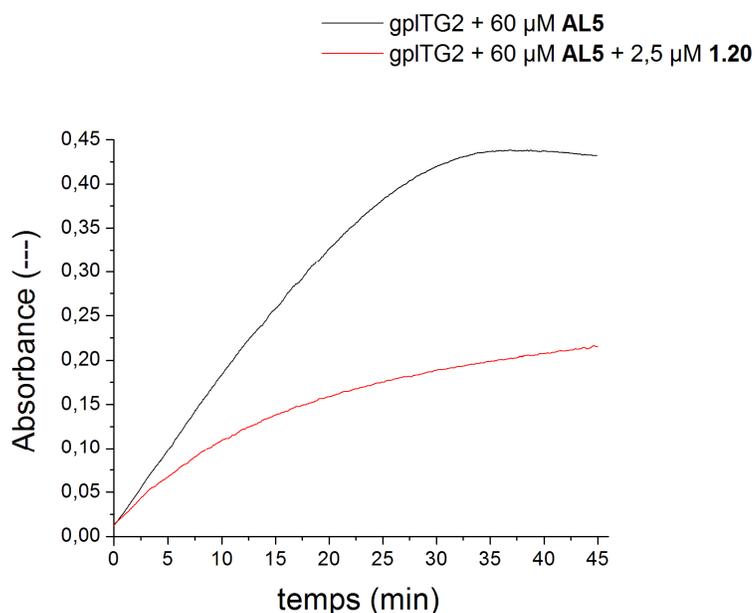
Jusqu'à présent, des cinétiques de courtes durées, soit d'environ 5 à 10 minutes en général, ont été conduites, révélant un profil d'inhibition compétitive réversible envers le substrat donneur<sup>116,117</sup>.

Toutefois, lorsque les cinétiques sont menées sur une plus longue période, soit environ 45 à 60 minutes, il s'est avéré de plus en plus clair que le profil d'inhibition n'est pas une compétition réversible pure, puisque l'inhibition semble dépendante du temps, comme le montre la Figure 4.10.

Une dépendance en temps de l'inhibition peut être le reflet de deux phénomènes :

- 1) une inhibition irréversible, où la vitesse enzymatique atteint un plateau de vitesse nulle après un certain temps, dû à l'inactivation totale de l'enzyme,
- 2) ou encore une inhibition à liaison lente, entraînant un léger changement conformationnel de l'enzyme, retardant ainsi l'atteinte de l'équilibre lors de la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme, mais rendant plus fortes les interactions au sein

du complexe formé, permettant d'observer une cinétique en deux phases, où la vitesse de la réaction enzymatique n'atteint jamais zéro.

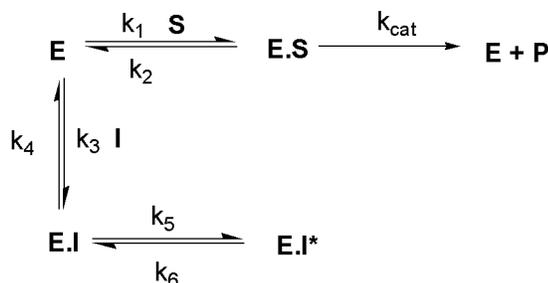


**Figure 4.10 Courbe typique d'une cinétique impliquant AL5 et la molécule 1.20**

À la vue de la Figure 4.10, le profil d'inhibition semble plutôt correspondre à la deuxième option, soit une inhibition à liaison lente. C'est pourquoi nous nous sommes attardés à vérifier cette possibilité, et ce, à l'aide du meilleur inhibiteur réversible développé à ce jour dans le groupe, la molécule 1.20.

#### 4.2.2.1. Vérification d'inhibition à liaison lente

Le profil cinétique typique d'une inhibition à liaison lente est illustré à la Figure 4.11.



**Figure 4.11 Équilibres réactionnels d'une inhibition à liaison lente**

Afin de démontrer une inhibition à liaison lente, un critère doit impérativement être respecté, soit le fait que la constante de vitesse pour la dissociation du complexe E.I soit

nettement supérieure à la constante de vitesse de formation du complexe  $E.I^*$  ( $k_4 \gg k_5$ )<sup>205</sup>. De plus, selon ce schéma, les constantes d'affinité peuvent être définies comme suit<sup>205</sup> :

$$K_M = \frac{k_2 + k_{cat}}{k_1} \quad 4.4$$

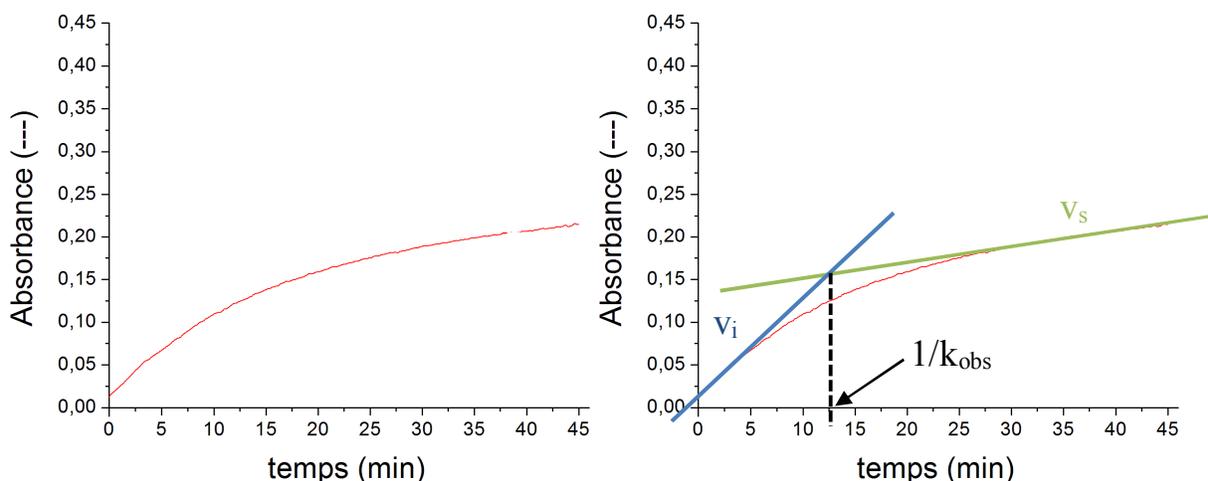
$$K_i = \frac{k_4}{k_3} \quad 4.5$$

$$K_i^* = \frac{k_4 k_6}{k_3 (k_5 + k_6)} \quad 4.6$$

L'évolution de la concentration de produit dans le temps peut, quant à elle, être décrite par la formule suivante<sup>205</sup> :

$$[P] = v_i t + \frac{(v_i - v_s)}{k_{obs}} (1 - e^{-k_{obs} t}) \quad 4.7$$

Cette équation fait intervenir différents paramètres, tels que la vitesse initiale et la vitesse stationnaire de la réaction enzymatique, ainsi que la constante de vitesse observée. Ces différents paramètres peuvent facilement être mesurés sur un graphique mettant en relation la formation de produit en fonction du temps, comme illustré à la Figure 4.12.



**Figure 4.12 Analyse d'une cinétique type d'inhibition à liaison lente**

La mesure de la constante de vitesse observée permet de calculer les constantes de vitesses  $k_5$  et  $k_6$  de la Figure 4.11, représentant respectivement la vitesse de formation et de dissociation du complexe  $E.I^*$ .

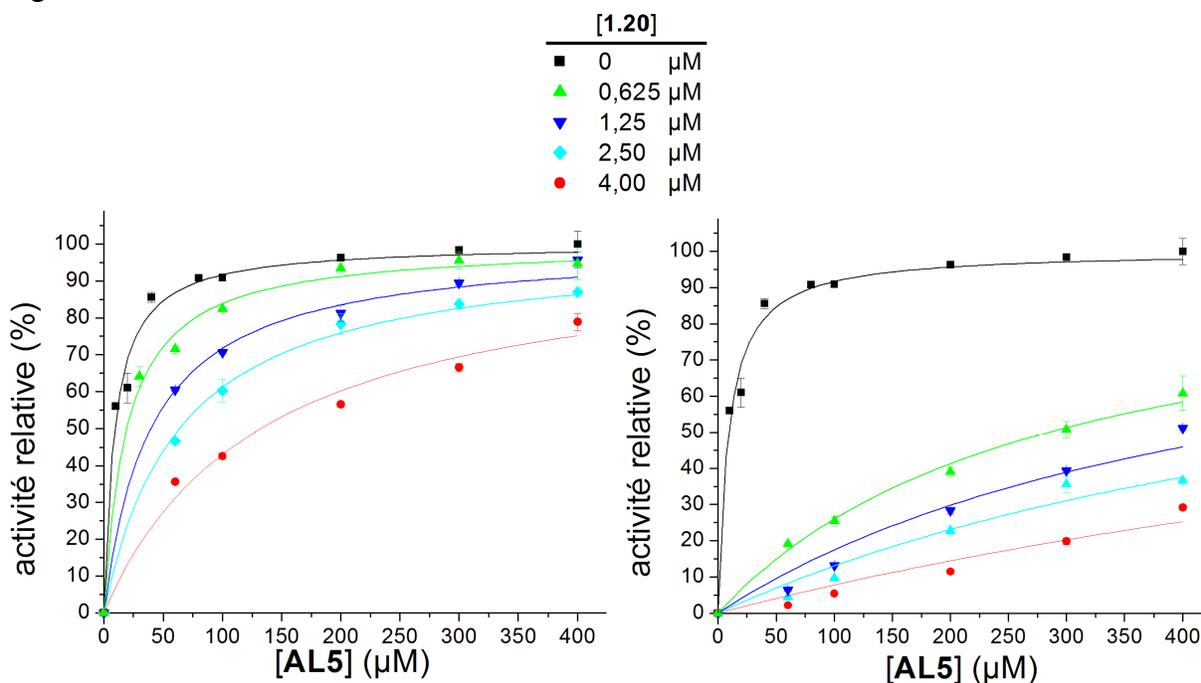
En effet, la constante de vitesse observée est reliée aux constantes de vitesse d'association et de dissociation du complexe E.I\* de la manière suivante<sup>205</sup> :

$$k_{\text{obs}} = k_6 + \frac{k_5 \frac{[I]}{K_i}}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_i}} \quad 4.8$$

De plus, le rapport entre les constantes de vitesse d'association et de dissociation du complexe E.I\* peut être relié au rapport des constantes d'inhibition, selon la formule ci-dessous<sup>205</sup> :

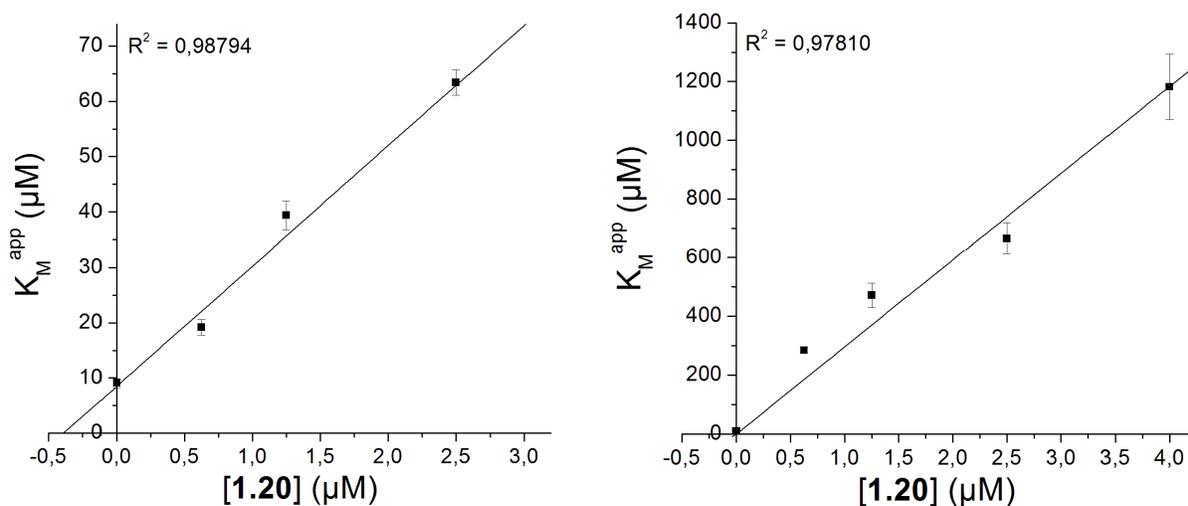
$$\frac{k_5}{k_6} = \frac{K_i}{K_i^*} - 1 \quad 4.9$$

Les valeurs de  $K_i$  et  $K_i^*$  peuvent être calculées à l'aide, respectivement, des courbes de Michaelis-Menten utilisant les mesures des vitesses initiales et stationnaires, illustrées à la Figure 4.13.



**Figure 4.13** Courbes de Michaelis-Menten utilisant la vitesse initiale (gauche) et la vitesse stationnaire (droite)

Ces courbes permettent l'obtention, en variant la concentration d'inhibiteur utilisé, de différentes valeurs de  $K_M^{\text{app}}$ , permettant, par la suite, le calcul des deux constantes d'inhibition.



**Figure 4.14 Détermination graphique des valeurs de  $K_i$  et  $K_i^*$  pour la molécule 1.20**

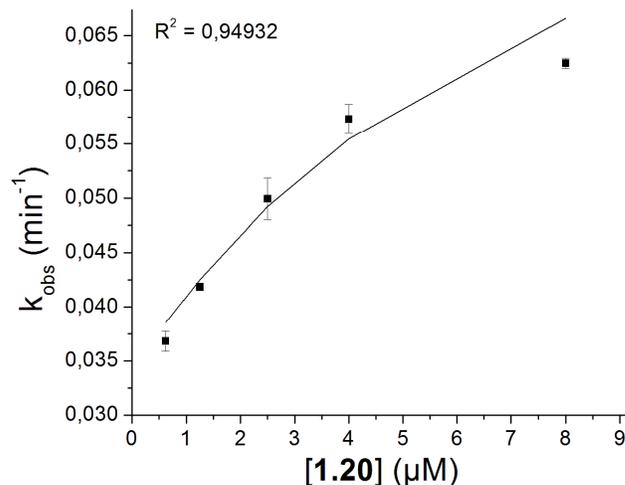
Les droites présentées à la Figure 4.14 ont permis de déterminer, via leur intersection avec l'axe des abscisses, que le  $K_i$  de la molécule **1.20** est de  $0,39 \pm 0,05 \mu\text{M}$ , tandis que le  $K_i^*$  est environ 10 fois inférieur, avec une valeur de  $0,03 \pm 0,01 \mu\text{M}$ .

À l'aide de ces valeurs de  $K_i$  et de  $K_i^*$ , et en utilisant les données de  $k_{\text{obs}}$  mesurées à une concentration fixe et connue de AL5, il est possible de tracer une courbe de régression non-linéaire du  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration d'inhibiteur.

Cette courbe permet de déterminer les valeurs de  $k_5$  et  $k_6$ , via l'utilisation de l'équation **4.8**. En effet, un tel graphique mène à l'obtention d'une hyperbole où l'asymptote verticale donne accès à la valeur de  $k_6$ , tandis que l'asymptote horizontale permet d'obtenir une valeur de  $(k_5 + k_6)$ .

Par conséquent, la détermination de la valeur de  $k_6$  sera fiable si plusieurs données à basse concentration d'inhibiteur sont mesurées, tandis qu'une large gamme de hautes concentrations d'inhibiteur est nécessaire afin d'assurer la crédibilité de la valeur de  $(k_5 + k_6)$ . Le graphique de régression non-linéaire, obtenu en utilisant les valeurs de  $k_{\text{obs}}$  mesurées pour la molécule **1.20** à une concentration fixe de  $300 \mu\text{M}$  de AL5, est présenté à la Figure 4.15.

Selon ce graphique, la constante de vitesse pour la dissociation du complexe  $E.I^*$  ( $k_6$ ) est de  $0,034 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ , tandis que la valeur pour la constante de vitesse caractérisant l'association de ce complexe ( $k_5$ ) est plutôt de  $0,068 \pm 0,009 \text{ min}^{-1}$ .



**Figure 4.15 Détermination des constantes de vitesse  $k_5$  et  $k_6$  pour la molécule 1.20 à l'aide de l'équation 4.8**

Néanmoins, le manque de données à haute concentration d'inhibiteur laisse présager une moins bonne évaluation de la constante  $k_5$  à partir du graphique de la Figure 4.15. D'un autre côté, il est possible de procéder à une seconde évaluation de la valeur de cette constante, en utilisant, cette fois, l'équation 4.9. En considérant le terme  $k_5$  comme seule variable de l'équation, il est possible de lui attribuer une valeur de  $0,41 \text{ min}^{-1}$ , soit une valeur six fois plus élevée que celle obtenue graphiquement.

Le dernier test qui a été effectué afin de mesurer expérimentalement la constante de vitesse  $k_6$  a été un test de mesure de la constante de retour à l'activité suite à une dilution du complexe  $E.I^*$ .

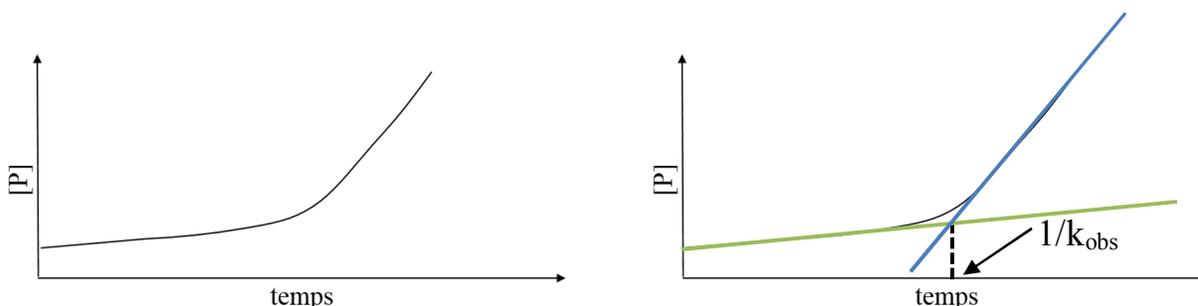
En effet, en procédant à une pré-incubation de l'inhibiteur avec l'enzyme, laissant ainsi la chance au complexe  $E.I^*$  de se former, puis, en procédant à une forte dilution de ce complexe en présence d'une grande concentration de substrat, la constante de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) devient équivalente à la constante de vitesse  $k_6$ .

Cette simplification<sup>205</sup> vient du fait que, en regardant l'équation 4.8 reproduite à la page suivante, lors d'une grande dilution du complexe  $E.I^*$ , le terme  $\frac{[I]}{K_i}$  tend vers zéro, tandis que, à haute concentration de substrat, le terme  $\frac{[S]}{K_M}$  peut être négligé, puisqu'il devient

largement supérieur au terme  $\frac{[I]}{K_i}$ . Ces deux approximations permettent donc d'omettre totalement le terme de droite de l'équation, puisque celui-ci tend vers zéro<sup>206</sup>.

$$k_{\text{obs}} = k_6 + \frac{k_5 \frac{[I]}{K_i}}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_i}} \quad 4.8$$

La constante de vitesse observée ( $k_{\text{obs}}$ ) pour une analyse de retour à l'activité, via la dilution d'un complexe  $E.I^*$ , est mesurée à l'aide de la même technique que celle préalablement utilisée pour la cinétique conventionnelle d'inhibition à liaison lente, comme le démontre la Figure 4.16.



**Figure 4.16 Analyse d'une cinétique de type retour à l'activité**

Afin de réaliser cette expérience, une solution de gpITG2 30 fois plus concentrée qu'à l'habitude a été préparée et l'enzyme a été incubée pendant une heure en présence de  $5,7 \mu\text{M}$  de l'inhibiteur **1.20**. Par la suite, le complexe enzyme-inhibiteur a été dilué de 30 fois avant d'être utilisé, immédiatement, pour une analyse cinétique en présence de  $400 \mu\text{M}$  de AL5. L'échantillon analysé cinétiquement est donc composé de la quantité habituelle d'enzyme, mais l'inhibiteur a été, au final, dilué 600 fois par rapport à la concentration d'incubation.

Néanmoins, le résultat obtenu est plus qu'étonnant. En effet, selon les données préalablement recueillies, une valeur de  $k_6$  égale à  $0,034 \text{ min}^{-1}$  devrait mener à l'obtention d'une valeur de  $1/k_{\text{obs}}$ , pour le test de retour à l'activité, autour de 29 minutes. Par contre, dans notre cas, il ne fut pas possible d'observer une cinétique à deux phases, comme attendu.

En effet, lors de la dilution du complexe  $E.I^*$  après incubation, la vitesse de réaction mesurée initialement n'est pas différente de la vitesse de l'enzyme incubée dans les mêmes conditions, en absence d'inhibiteur. Ceci signifie donc que l'inhibiteur a été libéré

instantanément, venant par le fait même réfuter, hors de tout doute, la possibilité que la dépendance en temps de l'inhibition soit due à une inhibition à liaison lente, malgré les résultats préalablement recueillis.

D'un autre côté, ce test permet aussi de conclure que la dépendance en temps de l'inhibition n'est pas due à une inhibition irréversible, puisque l'enzyme reste pleinement active après une heure d'incubation avec une forte concentration d'inhibiteur.

Le profil d'inhibition de nos molécules semble donc plus complexe qu'envisagé et l'obtention de données structurales quant au mode de liaison de ceux-ci à l'enzyme pourrait nous aider à percer le mystère. Des données en ce sens seront présentées au prochain chapitre.

### 4.3. Conclusion

Les études cinétiques présentées précédemment ont permis de raffiner davantage le profil d'inhibition, face à la TG2, de nos inhibiteurs compétitifs réversibles.

Dans un premier temps, il a été établi que la liaison de nos inhibiteurs à l'enzyme est, comme l'avait présumé la firme Evotec, effectivement influencée par la quantité de calcium utilisée.

En effet, il a été démontré que nos inhibiteurs possèdent une affinité légèrement plus grande pour l'enzyme libre que pour le complexe enzyme-calcium, avec des constantes d'inhibition, pour le composé **1.20**, respectivement de  $0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$  pour l'enzyme libre ( $K_i$ ) et de  $4,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$  pour le complexe enzyme-calcium ( $K_i'$ ). Malgré tout, le profil d'inhibition établi, de type non-compétitif mixte entre le calcium et la molécule **1.20**, démontre que la présence du métal n'est pas essentielle à la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme.

D'un autre côté, il est maintenant clair que l'inhibition est aussi dépendante du temps. Cependant, les deux situations les plus probables permettant d'expliquer ce phénomène, soit l'inhibition irréversible et l'inhibition à liaison lente, ont toutes deux été réfutées.

Bien que toutes les données obtenues convergeaient vers un profil d'inhibition à liaison lente, un test de haute dilution effectué après une longue incubation de l'enzyme en présence de la molécule **1.20** a permis d'établir, hors de tout doute raisonnable, que la dépendance en temps n'est pas liée à ce type d'inhibition. En effet, suite à l'incubation et à la dilution, la

pleine activité enzymatique est retrouvée instantanément, ce qui n'est pas conforme avec un profil d'inhibition à liaison lente. De plus, ce test a fait d'une pierre deux coups puisqu'il a aussi permis de rejeter, par la même occasion, l'hypothèse d'une inhibition irréversible.

Bien qu'il ne soit pas encore possible d'identifier la cause de cette dépendance en temps de l'inhibition, celle-ci cache, quelque part dans le schéma cinétique complexe de la TG2, un équilibre lent, non-identifié pour le moment, qui affecte la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme.

Afin de tenter de trouver la clé permettant d'expliquer ce cas atypique, des études structurales plus approfondies sur le mode de liaison, à la TG2, de différentes molécules ont été entreprises et seront l'objet du prochain chapitre.

## Chapitre 5 : Identification de modes de liaison

### 5.1. Méthodes d'obtention de données structurales associées au mode de liaison de différents ligands

La caractérisation du mode de fonctionnement d'une enzyme repose sur différentes techniques, comme la cinétique enzymatique présentée au chapitre précédent, ou encore la modélisation moléculaire présentée au Chapitre 2.

Par contre, il existe plusieurs autres méthodes à la disposition des chercheurs permettant d'obtenir de l'information sur la manière dont un ligand, que ce soit un substrat ou un inhibiteur, se lie à la protéine d'intérêt.

Parmi ces techniques deux grandes catégories peuvent être répertoriées : les méthodes directes et indirectes.

Dans les méthodes dites directes, il est possible de déterminer, expérimentalement, quelle région de la protéine d'intérêt s'associe au ligand, ou même, dans le meilleur des cas, quels acides aminés sont spécifiquement impliqués. De plus, ces techniques permettent une visualisation tridimensionnelle du site de liaison, permettant, ultimement, l'optimisation du ligand afin de maximiser les interactions effectuées. Dans cette famille de méthodes, il est possible de penser, par exemple, à la cristallographie<sup>207</sup> ou encore à la résonance magnétique nucléaire<sup>208</sup>.

De l'autre côté, les méthodes indirectes amènent de l'information plutôt hypothétique sur la liaison entre la protéine et le ligand, via l'utilisation de modèles mathématiques, comme par exemple dans l'arrimage moléculaire<sup>209,210</sup>, ou encore à l'aide d'études structure-activité<sup>211</sup> entre un ligand et une enzyme, permettant d'effectuer des corrélations pouvant mener à déduire les groupements fonctionnels importants pour la formation du complexe enzyme-ligand. La spectrométrie de masse en tandem<sup>212</sup> entre aussi dans cette catégorie, puisque, certes, elle peut mener à l'identification précise d'acides aminés liés au ligand, mais sans toutefois permettre une visualisation tridimensionnelle du site de liaison en soi. De plus, différentes techniques d'électrophorèse<sup>213,214</sup> (sur gel ou capillaire) peuvent apporter des

informations d'ordre général sur la spécificité de la liaison envers une enzyme en particulier ou un conformère précis, sans toutefois permettre une identification directe des acides aminés impliqués dans la liaison.

Bien évidemment, les méthodes directes permettent d'obtenir des informations d'une plus grande qualité et fiabilité. Néanmoins, ces informations sont plus difficiles à obtenir. En effet, dans le cas de la TG2 par exemple, l'enzyme est reconnue pour sa difficulté à cristalliser dans des conditions natives, et sa taille, qui tourne autour de 80 kDa, ne permet pas l'utilisation de la RMN.

Dans le cas où les méthodes directes ne peuvent être utilisées, les méthodes indirectes restent incontournables. C'est donc pourquoi nous nous sommes tournés dans cette direction afin d'étudier la liaison d'un inhibiteur réversible et d'un substrat accepteur à l'enzyme. Par contre, afin d'obtenir le plus d'informations possibles, plusieurs techniques indirectes ont été combinées, permettant de dresser le portrait le plus juste possible de la situation.

Les techniques qui ont été privilégiées sont l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem, jumelée à des études d'arrimage moléculaire. Cette approche permet donc de jumeler le concret à l'abstrait, en sélectionnant des modes de liaisons, obtenus par modélisation informatique, qui sont en accord avec les données expérimentales, démontrant la formation d'un lien covalent entre la molécule d'intérêt et un ou des résidus spécifiques de l'enzyme.

De plus, dans le cas de l'inhibiteur réversible, une étude par électrophorèse sur gel a aussi été conduite, afin de vérifier lequel des deux conformères de la TG2 permet de lier nos molécules, puisque ces derniers ont une géométrie bien distincte, permettant une migration différente dans des conditions non-dénaturantes, technique aussi nommée électrophorèse sur gel natif<sup>51,110</sup>.

Par contre, comme les deux types de molécules qui seront utilisées dans le cadre de ces études ne forment pas intrinsèquement de liens covalents avec la protéine, l'utilisation d'une technique de marquage doit précéder la spectrométrie de masse en tandem, afin de créer un lien permanent entre le ligand et l'enzyme. Dans le cadre cette recherche, un groupement

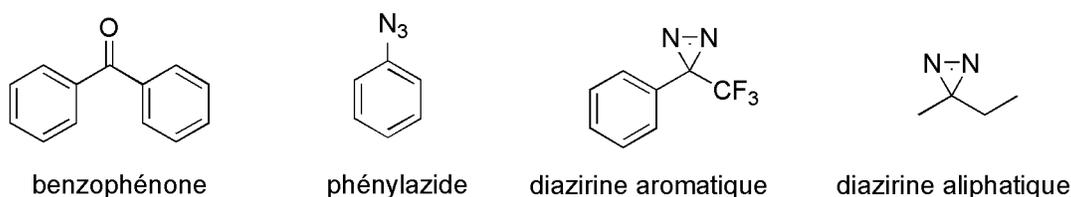
photoactivable, greffé aux ligands étudiés, a été choisi afin de permettre la formation du lien covalent.

Parmi les travaux qui seront présentés au cours de ce chapitre, les études d'arrimage moléculaire, tout comme l'étude conformationnelle par gels natifs, ont été publiés, en 2009, dans le cadre d'un article complet portant sur l'identification du mode de liaison d'un inhibiteur réversible photoactivable, dans « *Biochemistry* ».

### 5.1.1. Choix du groupement photoactivable

L'utilisation d'un groupement photoactivable a comme intérêt de laisser la chance au complexe enzyme-ligand de se former normalement, avant qu'une réaction rapide soit déclenchée, sous l'action de la lumière, créant ainsi un ligand activé, qui aura tendance à réagir rapidement avec ce qui l'entoure, dans ce cas-ci, l'enzyme. Par la suite, la protéine marquée peut être digérée à l'aide de différentes protéases, puis les fragments générés peuvent être séparés par chromatographie liquide puis analysés à l'aide de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)<sup>121,212,215</sup>.

Plusieurs types de groupement photoactivables sont susceptibles d'être utilisés. La Figure 5.1 présente les plus communs.



**Figure 5.1 Structures de différents groupements photoactivables**

Le choix du groupement utilisé s'est effectué sur deux critères principaux : sa faible influence sur le mode de liaison des molécules auxquelles il est greffé, ainsi que la non-sélectivité du marquage effectué par l'espèce réactive générée suite à l'irradiation.

À la vue de la structure de la benzophénone, un groupement très volumineux et aromatique, possédant par conséquent un caractère hydrophobe prononcé, il est peu probable que ce groupement n'influence pas la liaison des molécules à l'enzyme. De plus, ce groupement possède une sélectivité connue pour les résidus méthionine<sup>121</sup>. Il a donc été écarté d'emblée.

De son côté, le groupe phénylazide est aussi volumineux et aromatique, pouvant avoir une influence sur le mode de liaison des molécules qui lui seraient rattachées, et, de plus, sa photoactivation ne permet pas la génération d'une molécule pouvant s'insérer dans des liens C-H non-activés<sup>121</sup>. Cette structure n'a donc pas été retenue.

Finalement, la classe des diazirines s'est imposée comme étant le type de groupement photoactivable à privilégier. En effet, le diazirine, sous l'action d'une lumière UV bénigne pour l'activité enzymatique<sup>120</sup>, permet la formation de dérivés carbène et diazo<sup>121,123</sup>, qui ont la propriété de réagir extrêmement rapidement avec ce qui les entoure, sans regard à la nature des groupements présents, puisqu'ils peuvent même s'insérer dans une liaison C-H non-polarisée. Cette capacité réduit donc les risques que les résultats soient biaisés par la sélectivité du photomarqueur envers certains résidus de la protéine<sup>216</sup>.

Dans le cadre de notre étude, le diazirine aliphatique a été préféré au diazirine aromatique pour sa taille réduite, diminuant les risques d'affecter le mode de liaison du ligand à l'enzyme, ainsi que pour sa facilité de synthèse<sup>131,132</sup> par rapport au dérivé aromatique.

## **5.2. Identification structurale du mode de liaison des inhibiteurs réversibles**

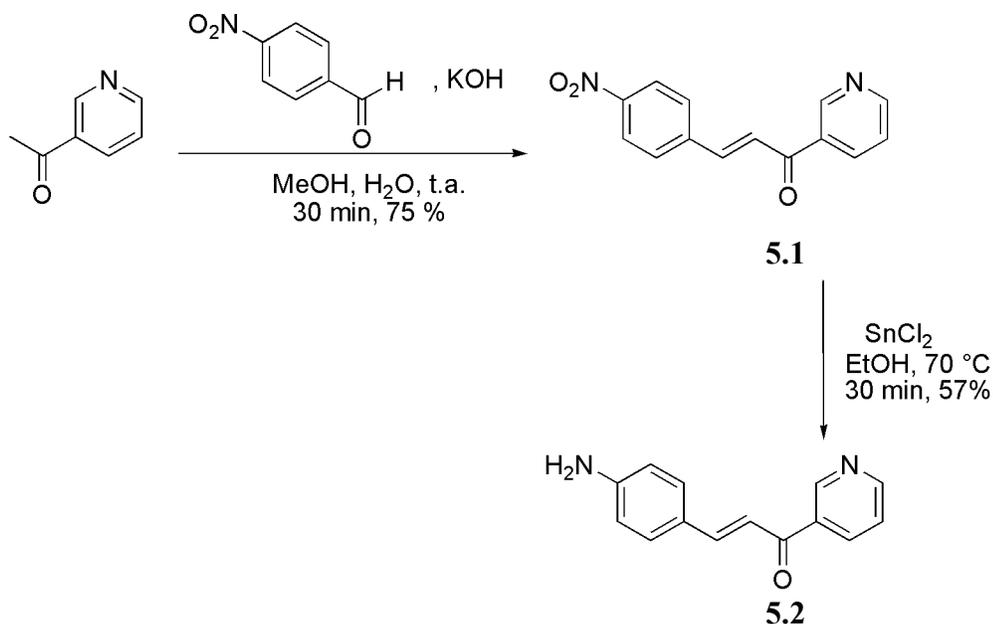
La stratégie utilisée, afin d'obtenir des informations structurales sur le mode de liaison des inhibiteurs compétitifs réversibles développés au sein du groupe, a été une combinaison de l'utilisation d'un inhibiteur photoactivable, permettant l'analyse de la protéine marquée par spectrométrie de masse en tandem, avec une étude d'arrimage moléculaire, permettant la visualisation tridimensionnelle des résultats de marquage, via la schématisation du ligand au sein de l'enzyme. De plus, comme la TG2 peut adopter deux conformations extrêmement différentes l'une de l'autre, une migration sur gel natif du complexe enzyme-photomarqueur a aussi été menée en parallèle.

### 5.2.1. Synthèse et utilisation d'un inhibiteur photoactivable

Un ancien membre du groupe, le Dr. Christophe Pardin, est celui qui a été mis en charge de la synthèse et de l'élaboration de la stratégie à utiliser pour le greffage par photoactivation de l'inhibiteur à l'enzyme.

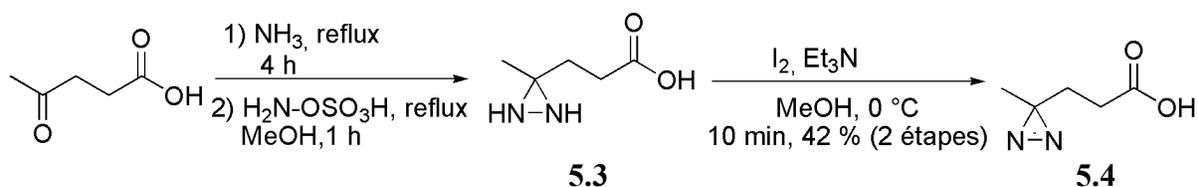
Afin de construire un inhibiteur photoactivable, la molécule **5.1** a été choisie comme structure de départ, puisqu'elle est facilement accessible en synthèse, via une condensation aldolique en milieu basique, et puisque son potentiel d'inhibition est l'un des meilleurs obtenus au sein du groupe, avec une valeur d' $IC_{50}$  de  $21 \mu M$ <sup>116</sup>.

De plus, comme le montre la Figure 5.2, il est possible de réduire le groupement nitro de cette structure en fonction amine, permettant, par la suite, de tout simplement greffer une chaîne aliphatique contenant la fonction diazirine désirée.



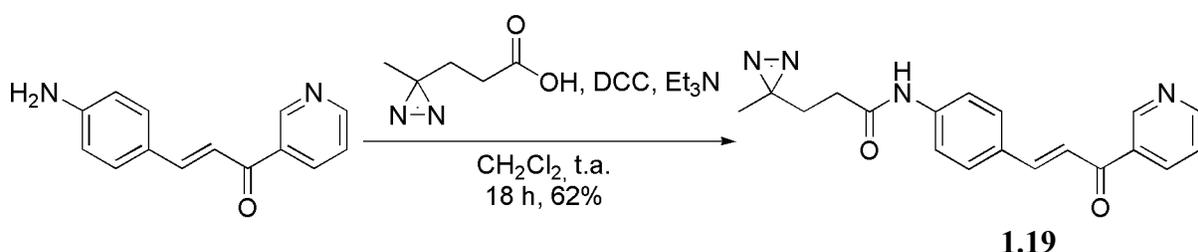
**Figure 5.2 Préparation d'un inhibiteur réversible pour la conversion en molécule photoactivable**

La partie aliphatique contenant le groupement diazirine a, quant à elle, été préparée selon une procédure décrite par Church *et al.*<sup>131</sup>, où, dans une première étape, une cétone est convertie en diaziridine laquelle est ensuite oxydée, à l'aide d'iode en milieu basique, permettant l'obtention de la molécule **5.4** convoitée.



**Figure 5.3 Synthèse d'une diazirine aliphatique**

Comme cette diazirine possède aussi au sein de sa structure une fonction acide carboxylique, celle-ci peut facilement être couplée à la fonction amine de la molécule **5.2**, comme le montre la Figure 5.4. Ceci permet donc l'obtention de l'inhibiteur **1.19**, possédant une très bonne affinité pour la gpITG2, avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 28 μM<sup>119</sup>.



**Figure 5.4 Réaction de couplage permettant l'obtention d'un inhibiteur photoactivable**

Fait intéressant à noter, un groupement acétyle a aussi été préalablement greffé à la fonction amine de la molécule **5.2**, et l'inhibiteur ainsi créé a été testé envers la gpITG2, permettant d'obtenir une valeur d'IC<sub>50</sub>, elle aussi, de 28 μM<sup>116</sup>. Ceci laisse donc présager que la fonction diazirine n'a pas d'influence sur la manière dont l'inhibiteur interagit avec l'enzyme, permettant de croire que les résultats qui seront ultérieurement obtenus seront le reflet du mode de liaison réel de cette classe d'inhibiteur.

Par la suite, l'inhibiteur a été incubé, à une concentration de 150 μM, avec la gpITG2 pendant 30 minutes à 37 °C, avant que le complexe enzyme-inhibiteur ainsi formé soit irradié pendant quatre minutes à l'aide de lampes UV d'une longueur d'onde de 350 nm<sup>119,120</sup>.

Afin de confirmer le marquage, la solution irradiée a été filtrée à l'aide d'un filtre possédant un seuil de 30 kDa, et l'activité de l'enzyme ainsi recueillie a été évaluée. En comparant le résultat obtenu avec celui de la gpITG2 traitée dans les mêmes conditions en absence d'inhibiteur, il fut possible d'obtenir une activité enzymatique inférieure pour l'échantillon irradié en présence de l'inhibiteur photoactivable, et cette baisse d'activité enzymatique a été liée à une inhibition devenue irréversible via l'irradiation<sup>119</sup>. De plus, cet

échantillon a été analysé par spectrométrie de masse de la protéine entière (ESI-MS), confirmant l'incorporation de l'inhibiteur de manière covalente à l'enzyme<sup>119</sup>.

### 5.2.2. Identification des résidus marqués et modélisation moléculaire

Ayant en main la preuve de l'incorporation de l'inhibiteur à l'enzyme, l'échantillon a été, par la suite, analysé par deux collaborateurs, le Dr. Éric Bonneil et le Pr. Pierre Thibault, via spectrométrie de masse en tandem, afin de déterminer le ou les résidus précis où l'incorporation a eu lieu. Les résultats obtenus sont brièvement exposés ci-dessous.

Dans un premier temps, l'échantillon marqué, ainsi que la gpITG2, ont été soumis à une digestion trypsique afin d'obtenir de plus petits fragments de l'enzyme. Ces fragments ont par la suite été séparés et analysés par LC-MS/MS afin de chercher des différences, dans les patrons d'éluion et de fragmentation, entre la gpITG2 marquée et l'échantillon non-marqué.

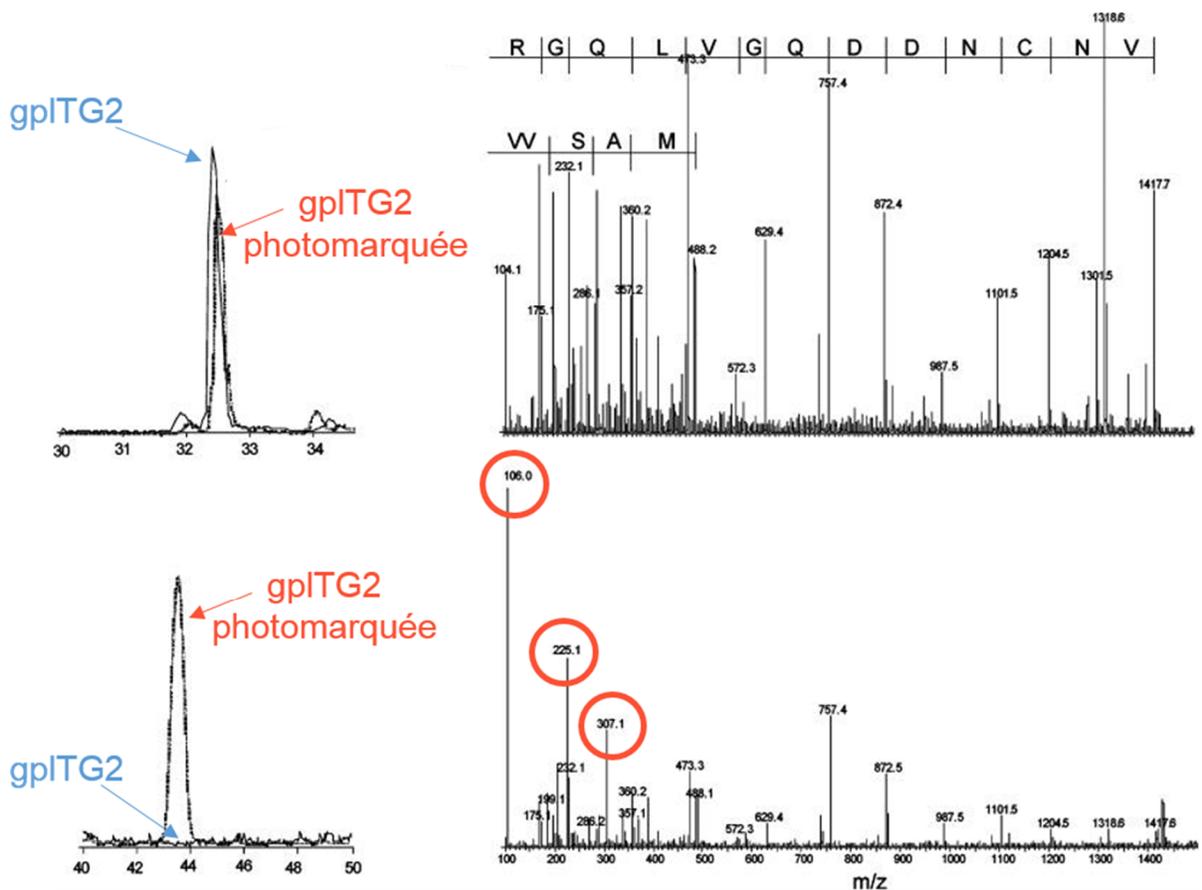
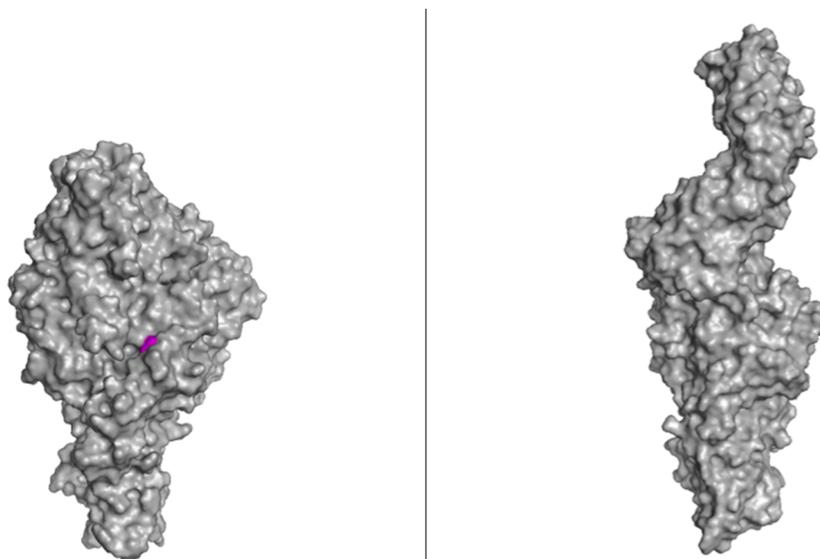


Figure 5.5 Analyse LC-MS/MS permettant l'identification du site de marquage par l'inhibiteur photoactif<sup>119</sup>

Comme le montre la Figure 5.5, un peptide, éluant à environ 32,5 minutes, est présent dans les deux types d'échantillon. Par contre, un autre fragment, éluant plutôt autour de 43,5 minutes est présent seulement dans l'échantillon marqué.

L'analyse du patron de fragmentation de chacun de ces deux peptides a permis de conclure qu'il s'agissait de la même séquence ( $V_{223}VSAMVNCNDDQGVLQGR_{240}$ ), mais que le peptide éluant à 43,5 minutes présente des ions supplémentaires, notamment à des valeurs de  $m/z$  équivalant à 307,1 et 225,1, pouvant être attribués à une fragmentation de l'inhibiteur, et un ion, très abondant, à 106,0, masse correspondant à la formule empirique  $C_3H_7NOS$ , pouvant être obtenu d'un réarrangement de la seule cystéine présente dans ce peptide, suite à une modification préalable de ce résidu par l'inhibiteur photoactivable<sup>119</sup>.

La cystéine 230 a donc formellement été identifiée comme étant le seul acide aminé à avoir réagi avec la molécule **1.19** lors de l'expérience de photomarquage, et, avec ce résultat en main, des études de modélisation moléculaire ont été entreprises afin de déterminer et schématiser comment la fonction diazirine de l'inhibiteur a pu se retrouver près de ce résidu au sein de la protéine.

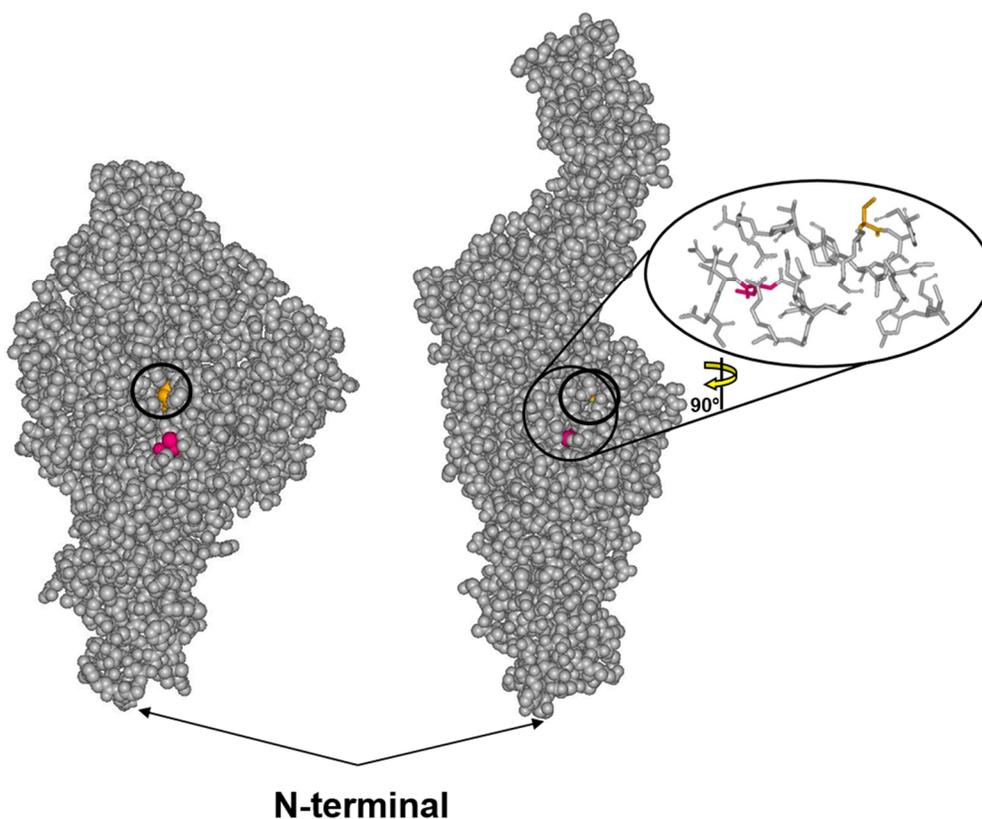


**Figure 5.6** Accessibilité au solvant de la cystéine 230 (rose) pour les deux conformères de la gpITG2

Dans un premier temps, en utilisant les deux modèles d'homologie<sup>119,146</sup> présentés au Chapitre 2, nous nous sommes intéressés à visualiser la localisation de cet acide aminé dans la structure tertiaire de la protéine, et ce, pour les deux conformères. En effet, il est supposé

que, afin d'avoir la possibilité d'être marquée, la cystéine 230 doit se retrouver en surface de l'enzyme, afin d'être accessible pour l'inhibiteur.

En regardant la Figure 5.6, où une surface, représentant l'accessibilité du solvant pour la protéine, a été générée pour les deux conformères, il est possible de constater que la cystéine marquée est bel et bien accessible à la surface de la forme fermée, ce qui n'est pas le cas pour la forme ouverte.



**Légende :** *cystéine catalytique (C277) : orange ; site actif : cercle noir ;  
résidu marqué (C230) : rose*

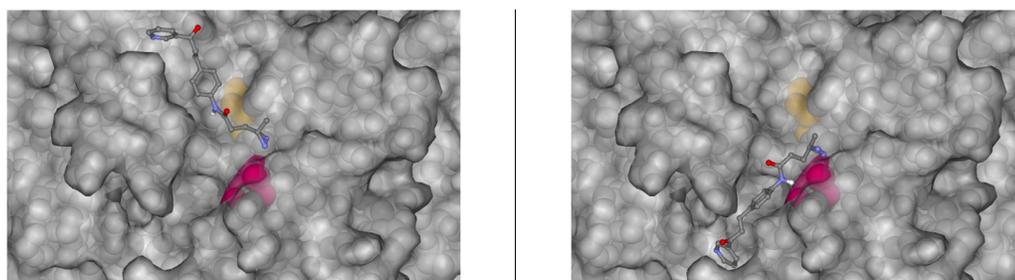
**Figure 5.7 Localisation du site actif et du résidu marqué au sein des deux conformères de la gpITG2<sup>119</sup>**

Cette représentation laisse, par conséquent, présager que la forme fermée est celle permettant de lier nos composés. De plus, en regardant la Figure 5.7, il est possible de réaliser que, dans la structure tertiaire de la forme fermée, la cystéine catalytique se retrouve très près du résidu marqué, alors que dans la forme ouverte, ces deux résidus sont pratiquement à l'opposé l'un de l'autre. Sachant que nos inhibiteurs présentent une inhibition de type compétitive vis-à-vis du substrat donneur de l'enzyme, il est difficile de croire qu'une liaison

à la forme ouverte, permettant à la fois d'expliquer le marquage de la cystéine 230 et la compétition avec le substrat donneur, soit possible.

Malgré tout, des expériences d'arrimage moléculaire ont été menées à l'aide des deux modèles d'homologie, utilisant la structure minimisée semi-empiriquement (AM1) de l'inhibiteur **1.19**. Dans les deux cas, 150 simulations ont été effectuées au total à l'aide du logiciel Autodock<sup>217</sup>, puis ont été analysées, sans toutefois procéder à une minimisation ultérieure des complexes enzyme-ligand ainsi obtenus.

Dans le cas de la forme fermée de l'enzyme, deux modes de liaison principaux ont été identifiés et sont présentés à la Figure 5.8. Les détails des expériences d'arrimage effectuées sont présentés au Chapitre 7.



**Légende :** cystéine catalytique (C277) : orange ; résidu marqué (C230) : rose

**Figure 5.8 Représentation des deux modes de liaison principaux identifiés par arrimage moléculaire sur le modèle d'homologie de la forme fermée de la gpITG2<sup>119</sup>**

Dans les deux cas illustrés, la fonction diazirine de l'inhibiteur se retrouve très près de la cystéine marquée, en accord avec les résultats obtenus par photomarquage. De plus, l'orientation de l'inhibiteur dans le sillon hydrophobe du site de liaison du substrat donneur<sup>218</sup> est concordante avec un profil d'inhibition compétitive.

Pour ce qui est de l'arrimage moléculaire effectué avec le modèle d'homologie de la forme ouverte de l'enzyme, aucun mode de liaison n'est ressorti comme plus favorisé qu'un autre, et aucun ne permet de corréler les résultats expérimentaux obtenus suite à l'expérience de marquage.

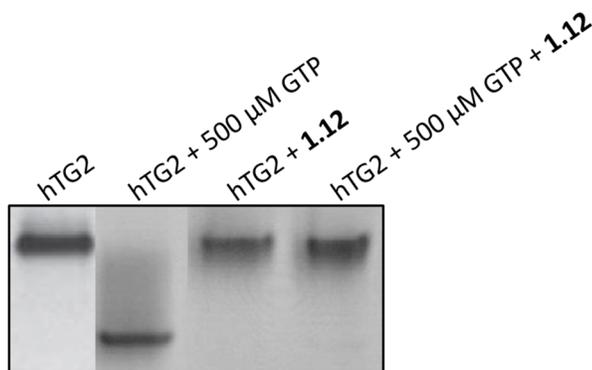
Par conséquent, la modélisation moléculaire, jumelée aux résultats d'analyse obtenus de la spectrométrie de masse en tandem, laisse présager que la forme fermée de l'enzyme soit celle liant nos composés.

Néanmoins, afin de corroborer cette hypothèse à l'aide de données expérimentales, une étude par électrophorèse sur gel, en conditions non-dénaturantes, a été entreprise.

### 5.2.3. Étude de la migration sur gel natif

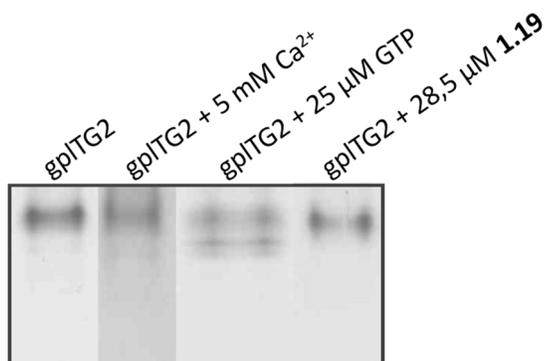
L'électrophorèse sur gel en conditions classiques, soit dénaturantes, permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. De son côté, l'électrophorèse sur gel en conditions non-dénaturantes a pour but de faire migrer une protéine de façon à ne pas altérer sa forme tridimensionnelle, ce qui fait que la migration des protéines à séparer est influencée par plusieurs facteurs dont la forme, la taille et la charge de celles-ci.

Puisque les deux conformations de la TG2 sont très différentes l'une de l'autre, elles peuvent être séparées à l'aide de cette technique<sup>51,110</sup>. Comme le montre la Figure 2.3, reproduite ci-dessous, la forme fermée de l'enzyme, soit celle favorisée en présence de GTP<sup>37</sup>, migre plus facilement sur gel natif que la forme ouverte, qui elle est favorisée en présence de l'inhibiteur irréversible **1.12** présenté antérieurement<sup>51</sup>.



**Figure 2.3 Migration sur gel natif de différents conformères de la TG2<sup>51,110</sup>**

Les résultats obtenus par notre groupe de recherche sont présentés à la Figure 5.9. Il est possible de voir que, sans l'ajout de ligand, la gpITG2 obtenue par notre méthode d'expression et de purification<sup>135</sup> mène à la formation d'une bande intense, ayant une faible mobilité sur gel natif. Cette bande correspond aussi à la forme d'enzyme présente dans l'échantillon incubée en présence de calcium, tandis que l'utilisation d'une concentration non-saturante de GTP mène à la résolution de deux bandes distinctes, correspondant aux deux formes de l'enzyme. Finalement, l'incubation de la gpITG2 avec l'inhibiteur photoactivable **1.19** a plutôt mené à l'obtention d'une seule bande, de faible mobilité.



**Figure 5.9 Étude conformationnelle par gel natif de la gpITG2<sup>119</sup>**

Cette étude laisse donc présumer que la forme ouverte de l'enzyme semble favorisée en présence de nos inhibiteurs, ce qui ne concorde pas avec les résultats préalablement obtenus via la modélisation moléculaire.

Néanmoins, plusieurs facteurs peuvent expliquer l'obtention de conclusions divergentes. D'un côté, la fiabilité du modèle d'homologie de la forme ouverte reste discutable. En effet, celui-ci est basé sur la seule structure cristalline de cette forme connue à ce jour, ce qui réduit la qualité du modèle généré. Ceci laisse donc présager un biais au niveau des résultats de modélisation moléculaire. D'un autre côté, les protéines, dont la mobilité sur gel natif a été évaluée, ont dû migrer pendant de longues heures, en raison de la température, ce qui a pu provoquer une dissociation du complexe enzyme-inhibiteur lors de la migration. De plus, il n'est pas à exclure que l'inhibiteur lie une forme intermédiaire de l'enzyme, ce qui serait difficile à voir par gel natif, compte tenu de la migration similaire obtenues pour les deux conformères dans les conditions que nous avons utilisées

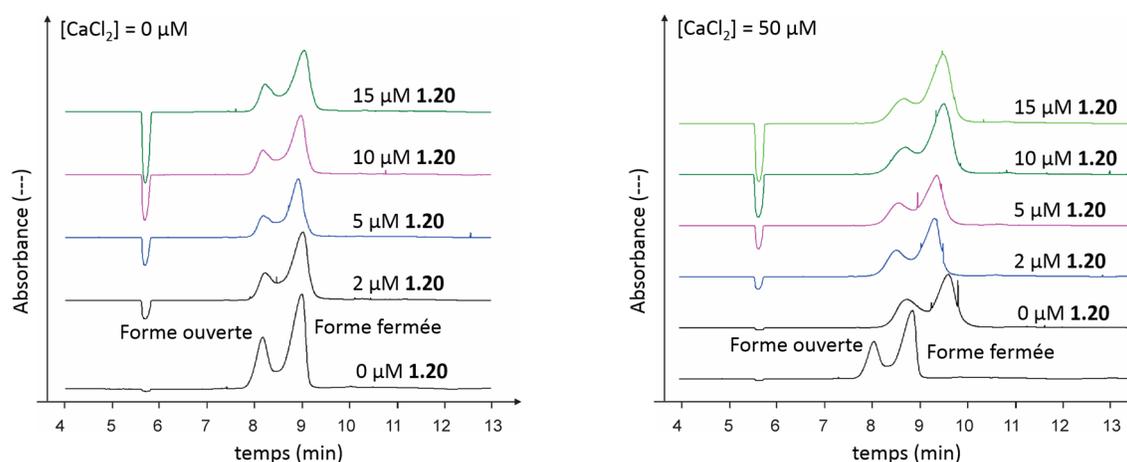
Reste qu'un fait demeure, la cystéine 230 a bel et bien été marquée par notre composé, mais, malheureusement, il reste toujours difficile, à ce moment-ci, d'identifier un site de liaison clair de cette classe de molécules au sein de la protéine.

Malgré tout, l'électrophorèse non-dénaturante semble prometteuse pour la séparation des deux conformères de la TG2, bien que la migration sur gel semble beaucoup trop longue pour en faire une méthode à utiliser à long terme. Pour cette raison, le groupe a plutôt opté pour le développement d'une méthode de séparation par électrophorèse capillaire<sup>219</sup>, en collaboration avec le groupe de Maxim V. Berezovski de l'Université d'Ottawa.

#### 5.2.4. Résultats préliminaires obtenus par électrophorèse capillaire

Dans un premier temps, une méthode permettant de séparer les deux conformères de la hTG2 a été développée<sup>219</sup>. Dans ce cas, l'équilibre conformationnel a été modulé via l'utilisation de fortes concentrations de calcium et de GDP, démontrant, par le fait même, la présence d'un équilibre lent entre les deux conformations de l'enzyme.

Le succès obtenu via l'utilisation de cette technique a donc mené le groupe à continuer les analyses par électrophorèse capillaire, cette fois, en modulant l'équilibre conformationnel à l'aide de la molécule **1.20**. Bien qu'il s'agisse encore de résultats préliminaires, ceux-ci semblent confirmer l'hypothèse que nos inhibiteurs lient préférentiellement, mais non de manière exclusive, la forme fermée de l'enzyme, l'équilibre conformationnel étant déplacé vers cette forme en présence d'inhibiteur, comme le montre la Figure 5.10.



**Figure 5.10 Séparation par électrophorèse capillaire des conformères de la hTG2**

De plus, les résultats obtenus par électrophorèse capillaire seraient en accord avec ceux obtenus lors de l'étude sur l'influence de la présence d'inhibiteur pour la liaison du calcium. En effet, il est possible de faire la supposition que la forme ouverte de l'enzyme représente la forme liée au calcium, puisqu'il s'agit d'une conformation active<sup>51</sup>, tandis que la forme fermée représente plutôt l'enzyme libre.

Comme il a été préalablement déterminé que l'inhibiteur peut s'associer aux deux types d'enzyme, mais liant de manière plus forte l'enzyme libre, la présence d'un équilibre conformationnel lent entre les deux formes de la protéine mènera à l'observation d'une

dépendance en temps de l'inhibition, due à la différence d'affinité envers les deux conformations.

Comme la technique d'électrophorèse capillaire utilisée permet aussi la détermination de constantes de vitesse<sup>219</sup>, il est possible d'obtenir la constante de vitesse pour le passage de la forme ouverte à la forme fermée de la hTG2.

Fait intéressant, les résultats préliminaires semblent confirmer l'existence d'un équilibre conformationnel lent entre les deux formes de la hTG2 qui serait modulable par la présence de nos inhibiteurs, venant enfin expliquer la raison de la dépendance en temps observée pour l'inhibition. Néanmoins, il reste encore du travail à réaliser avant de pouvoir confirmer totalement cette hypothèse, mais le mystère semble se dissiper au niveau de la dépendance en temps de l'inhibition ainsi que du mode de liaison de nos molécules à l'enzyme.

### **5.3. Identification structurale du mode de liaison du substrat accepteur**

Bien qu'aucune conclusion définitive n'ait pu être tirée de l'étude de photomarquage précédemment effectuée à l'aide de l'inhibiteur réversible **1.19**, il fut possible de démontrer que cette technique permet bel et bien l'identification de résidus précis, marqués par un groupement photoactivable. C'est donc pourquoi notre groupe s'est intéressé à déterminer le site de liaison du substrat accepteur de la TG2, encore inconnu à ce jour, en utilisant une technique similaire.

Les causes rattachées à l'insuccès précédent étant plutôt liées au fait qu'un des modèles d'homologie de l'enzyme utilisé possède une fiabilité réduite, et au fait que le conformère liant préférentiellement les inhibiteurs réversibles conçus dans le groupe n'est pas connu, celles-ci pourront être évitées dans une étude du mode de liaison du substrat accepteur.

En effet, comme une méthode d'expression et de purification de la hTG2 a été précédemment développée<sup>134</sup>, ce sujet étant traité au Chapitre 2, il sera possible d'utiliser une structure cristalline<sup>51</sup>, et donc plus fiable qu'un modèle d'homologie, afin d'effectuer les études de modélisation moléculaire. De plus, comme la seule structure cristalline de la forme

ouverte<sup>51</sup> a été obtenue via la cristallisation de la hTG2 en présence d'un inhibiteur irréversible, celle-ci semble tout à fait appropriée pour les études envisagées, puisqu'elle est en quelque sorte un mime de la forme acyl-enzyme, soit justement celle permettant la liaison du substrat accepteur<sup>49</sup>.

### **5.3.1. Développement d'un photomarqueur biotinylé**

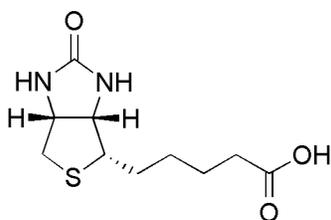
La technique de photomarquage utilisée, bien que fonctionnelle, n'est pas efficace à 100 %. En effet, il a été déterminé qu'autour de seulement 15 % de l'échantillon envoyé pour l'analyse LC-MS/MS a démontré une incorporation du marqueur, et ce 15 % inclus aussi le marquage non-spécifique de l'enzyme. Bien que ce pourcentage ne soit pas hors du commun pour ce type de méthode<sup>220</sup>, il en résulte une analyse plutôt difficile suite à la digestion enzymatique de l'échantillon, puisque ce dernier contient une panoplie de peptides non-marqués, qu'il faut distinguer des peptides marqués. Il s'agit donc d'un travail long et laborieux.

C'est pourquoi nous avons voulu intégrer, au design de notre substrat accepteur photoactivable, une biotine, permettant, à la suite de la digestion enzymatique, d'aller à la « pêche » aux fragments marqués<sup>133,221</sup>. En effet, la biotine possède une excellente affinité pour deux protéines, l'avidine et la streptavidine, avec une constante de dissociation ( $K_d$ ) de l'ordre de  $10^{-14}$ - $10^{-15}$  M<sup>222-224</sup>. Cette propriété amène la possibilité d'utiliser l'une de ces protéines, greffée à un support solide, afin de purifier le produit de digestion obtenu, en retenant seulement les peptides marqués. L'analyse subséquente, par LC-MS/MS, des peptides ainsi récupérés sera donc focalisée uniquement sur la distinction entre le marquage spécifique et le non-spécifique.

La biotine sera greffée à une séquence peptide de bonne affinité, agissant comme substrat accepteur, développée par le groupe de Messersmith<sup>130</sup>, et postérieurement utilisée au sein du groupe<sup>225</sup>. Cette séquence est composée de trois acides aminés (FKG), où une lysine centrale agit comme substrat accepteur de la TG2. Comme l'affinité générale des substrats accepteurs est moindre que celle des substrats donneurs, de l'ordre du millimolaire<sup>50</sup>, l'utilisation d'une séquence peptidique conférant un maximum d'affinité va permettre

d'utiliser une concentration raisonnable de substrat photoactivable lors de l'étape d'irradiation, et de limiter ainsi le marquage non-spécifique.

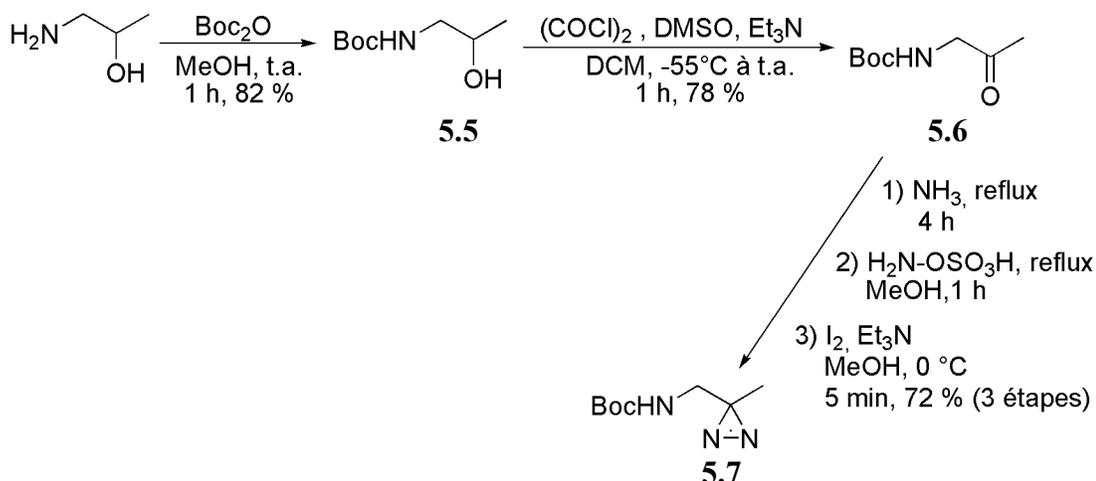
À la vue de la structure de la biotine présentée à la Figure 5.11, il coule de source que cette molécule soit greffée à la partie N-terminale du peptide, puisqu'une fonction acide carboxylique y est présente.



**Figure 5.11 Structure de la biotine**

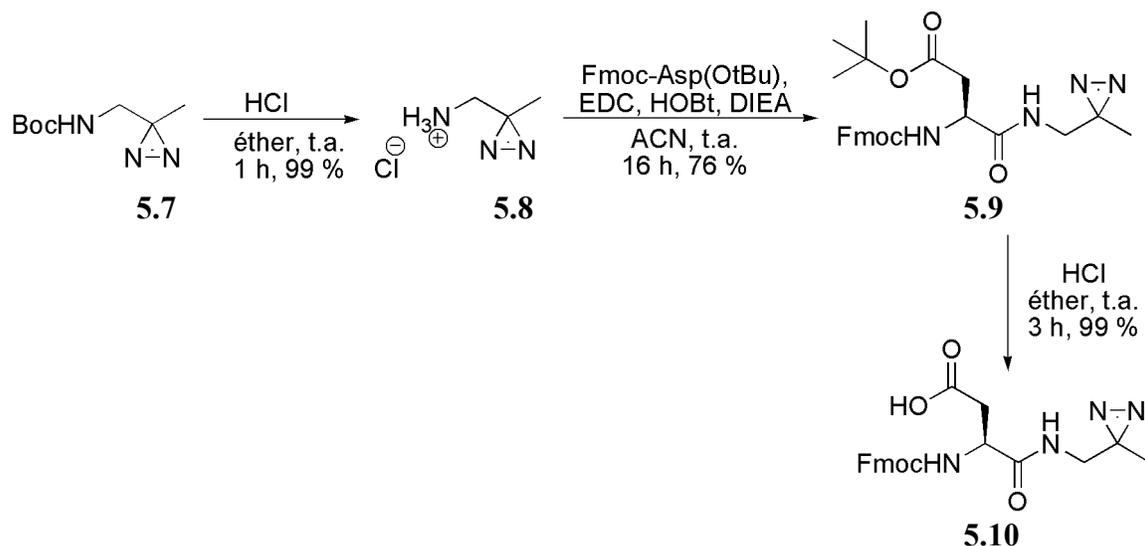
Ceci laisse donc la partie C-terminale pour y greffer un fragment photoactivable. Par contre, comme la trypsine est généralement employée comme enzyme de digestion en vue de l'analyse par LC-MS/MS<sup>226</sup>, le fait de placer le groupement photoactivable à cet endroit réduit à néant la possibilité d'utiliser la biotine comme moyen de purification des fragments marqués. En effet, la trypsine est connue pour sa capacité à scinder les chaînes d'acides aminés en C-terminal de la lysine. Dans ce cas, suite à la digestion, il ne restera que la glycine et la partie photoactivable greffées de manière covalente à la TG2. C'est donc pourquoi qu'il a été choisi d'insérer, entre la biotine et la phénylalanine, un acide aspartique, dont la chaîne latérale servira de point d'attache au peptide et où l'acide carboxylique de la chaîne principale permettra la liaison d'un fragment photoactivable contenant une fonction amine.

Le fragment photoactivable **5.7** a été synthétisé selon une méthode développée par Walter *et al.*<sup>132</sup>, illustrée à la Figure 5.12. Dans un premier temps l'amine du 1-amino-propan-2-ol a été protégée afin de pouvoir oxyder, dans les conditions de Swern, la fonction alcool. Par la suite, la cétone ainsi créée a été convertie en diaziridine, avant d'être oxydée par l'iode en milieu basique afin de générer la diazirine convoitée.



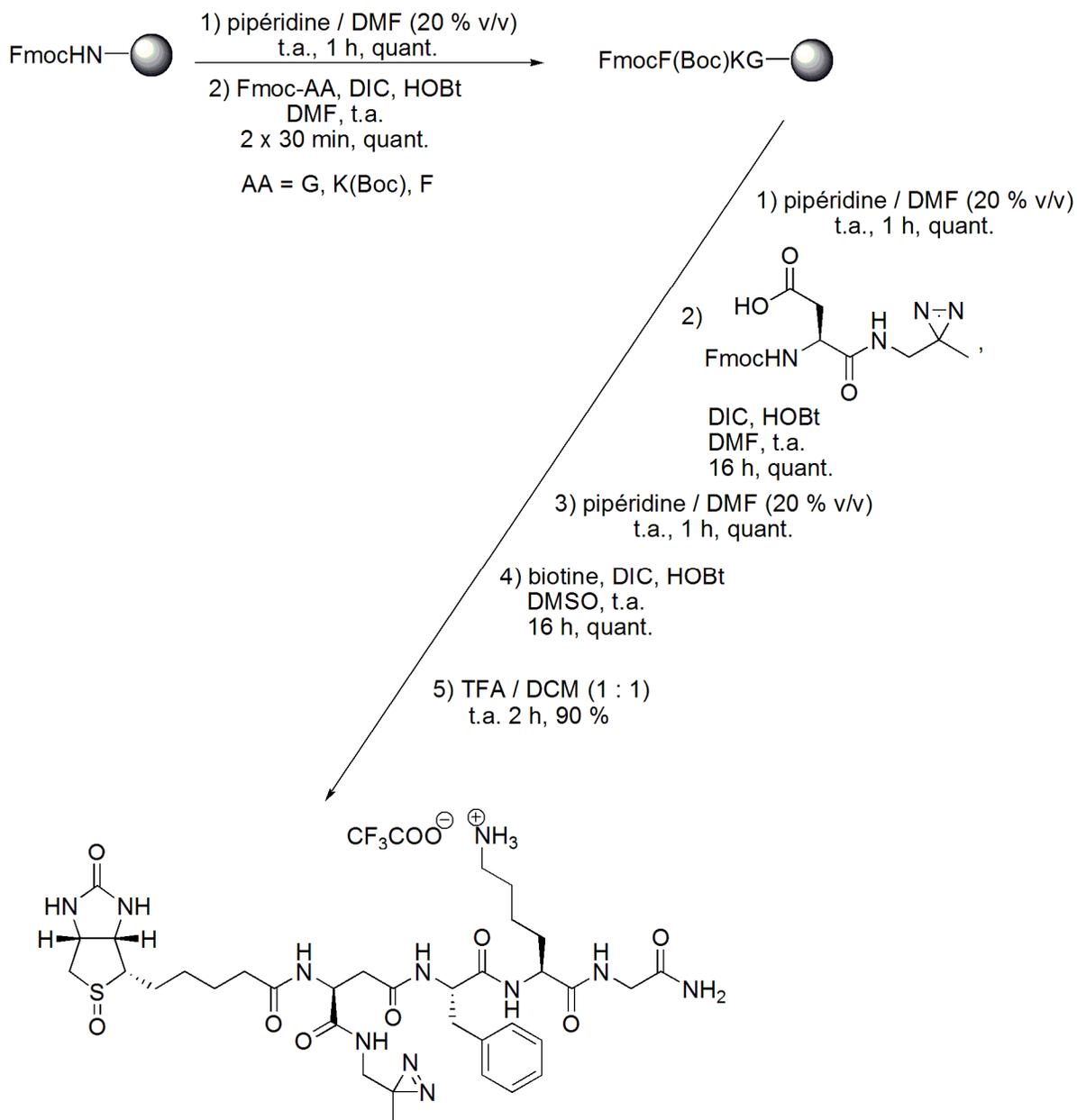
**Figure 5.12 Préparation d'un fragment photoactivable à partir du 1-amino-propan-2-ol<sup>132</sup>**

Suite à la déprotection de la fonction amine, effectuée en milieu acide, la molécule **5.8** a été couplée à un dérivé d'acide aspartique, permettant l'utilisation ultérieure du composé **5.10** en synthèse sur phase solide.



**Figure 5.13 Couplage d'un groupement photoactivable à un dérivé d'acide aspartique utilisable en synthèse sur phase solide**

En parallèle, la séquence peptidique a été préparée via synthèse sur phase solide, à l'aide d'une résine de type « *Rink amide MBHA* ». Ce type de résine donne accès à la formation, après clivage, d'une fonction amide en C-terminal du peptide, tout en permettant d'employer<sup>179</sup> une stratégie Fmoc lors de la synthèse. Celle-ci est illustrée à la Figure 5.14.



### 5.11

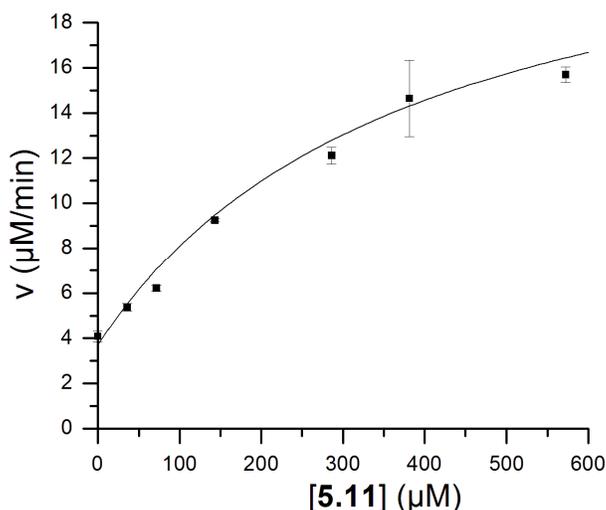
**Figure 5.14 Synthèse d'un substrat accepteur photoactif**

Il est possible de réaliser, en regardant la molécule **5.11**, que la biotine présente dans la molécule finale a été oxydée. Bien que ne sachant pas exactement à quelle étape de la synthèse cette réaction indésirable a eu lieu, soupçonnant une certaine influence de la présence du DMSO comme solvant lors du couplage de la biotine au peptide, ce genre d'oxydation fortuite, via synthèse sur support solide, a déjà été rapporté précédemment<sup>227</sup>. Néanmoins, comme la structure de la biotine nous importe peu dans le design de la molécule, et que

l'affinité de la biotine oxydée envers l'avidine et la streptavidine n'est pas largement affectée<sup>228</sup>, le composé **5.11** a été conservé et caractérisé cinétiquement.

Afin de calculer la constante d'affinité de ce substrat envers la hTG2, sa concentration a été variée en utilisant une concentration fixe et saturante du substrat donneur AL5. L'accélération de la vitesse de la réaction enzymatique obtenue en présence de substrat accepteur, par rapport à la simple vitesse d'hydrolyse enzymatique du AL5 catalysée par la hTG2, est donc pleinement attribuable à l'affinité du substrat accepteur évalué.

Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 5.15, où une concentration de 435  $\mu\text{M}$  de AL5 a été utilisées, soit l'équivalent d'un peu plus de 30 fois la valeur du  $K_M$  mesurée pour cette molécule<sup>134</sup>.



**Figure 5.15** Courbe de Michaelis-Menten obtenue pour le substrat accepteur photoactivable ( $[\text{AL5}] = 435 \mu\text{M}$ )

La valeur de  $K_M^{\text{app}}$  ainsi mesurée pour la molécule **5.11** est donc de  $0,4 \pm 0,2 \text{ mM}$ , tandis que la valeur de  $V_{\text{max}}$  est plutôt de  $21 \pm 4 \mu\text{M} / \text{min}$ . Les grandes incertitudes au niveau des valeurs obtenues sont surtout dues au fait qu'il ne fut pas possible d'obtenir des valeurs de vitesse à des concentrations saturantes de substrat, puisqu'une inhibition par le produit a été constatée lors de la prise des mesures en utilisant de hautes concentrations de substrat accepteur photoactivable.

Malgré tout, une valeur de  $K_M$  se situant dans le bas millimolaire est tout à fait respectable pour un substrat accepteur. En guise de comparaison, le *N*-acétyl-L-lysine méthyl

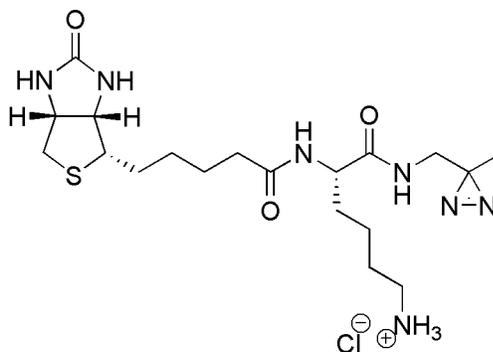
ester possède un  $K_M^{app}$  d'une valeur de 2,8 mM<sup>50</sup>, et la séquence de haute affinité Fmoc-GG-FKG-NH<sub>2</sub>, une valeur de 0,11 μM<sup>225</sup>.

### 5.3.2. Optimisation des conditions d'irradiation

Ayant en main la molécule **5.11**, nous nous sommes aussi attardés à l'optimisation des conditions d'irradiation suite aux résultats obtenus précédemment avec l'inhibiteur réversible photoactivable.

Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à la cinétique de disparition de la fonction diazirine lorsqu'irradiée à l'aide du four UV utilisé pour les expériences de marquage protéique.

Cette étude a été réalisée à l'aide du composé test **5.12**, soit une lysine à laquelle a été greffée, en N-terminal, une biotine, et, en C-terminal, le fragment photoactivable **5.8**, tel que présenté à la Figure 5.16. Cette molécule n'a pas été utilisée dans les essais de marquage de la hTG2 pour cause d'une trop faible affinité envers l'enzyme ( $K_M^{app} \sim 9$  mM), ce qui aurait provoqué trop de marquage non-spécifique.



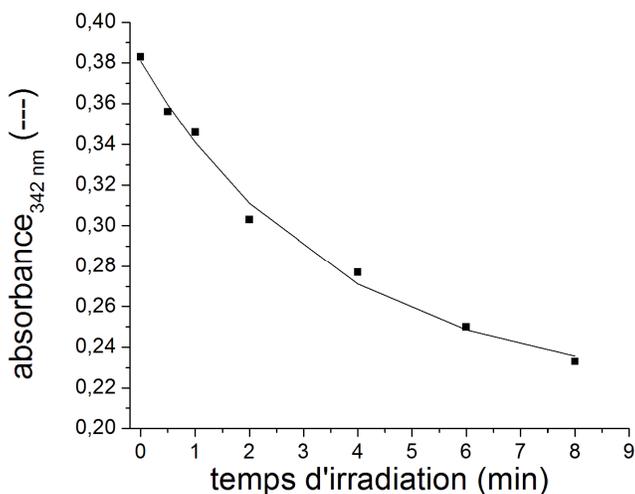
**5.12**

**Figure 5.16 Structure du composé test utilisé pour l'étude cinétique de la réaction de disparition de la fonction diazirine sous l'effet des rayons UV**

Sachant que le maximum d'absorption de la fonction diazirine se situe autour de 350 nm<sup>120</sup>, un spectre d'absorbance du composé test a été effectué afin de déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale de la fonction diazirine dans ce composé spécifique. Ce maximum d'absorption a été trouvé à 342 nm.

Par la suite, l'absorbance, à cette longueur d'onde, a été mesurée pour différents échantillons préparés dans les mêmes conditions, pour lesquels seul le temps d'irradiation dans le four UV a été varié. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 5.17.

Le temps de demi-vie calculé pour cette cinétique de disparition d'ordre 1 a été de 2,4 minutes. Ceci signifie donc que, dans le cas de l'inhibiteur réversible, le temps d'irradiation utilisé, soit de quatre minutes, ne représente même pas deux fois la demi-vie du groupement photoactivable.



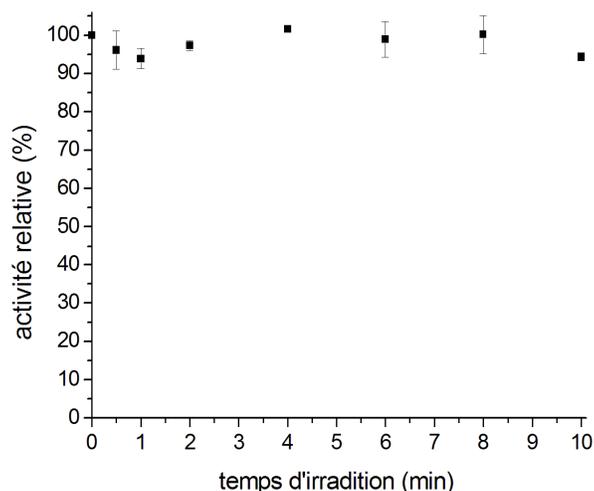
**Figure 5.17 Cinétique de disparition de la fonction diazirine du composé 5.12**

Pour cette raison, il a été envisagé d'augmenter le temps d'irradiation lors de l'expérience de photomarquage. Néanmoins, nous avons voulu nous assurer que l'activité enzymatique de la TG2 ne serait pas réduite lors d'une longue exposition aux rayons UV, et, dans cette optique, l'activité enzymatique de la hTG2 a été mesurée après différents temps d'exposition.

Comme le montre la Figure 5.18, l'activité enzymatique de la hTG2 n'est pas affectée par l'exposition aux rayons UV, et ce, même après dix minutes d'irradiation. Ce temps d'exposition correspond à un peu plus de quatre fois le temps de demi-vie de la fonction diazirine mesuré précédemment, nous assurant ainsi une réactivité globale de plus de 90 % pour notre substrat accepteur photoactivable.

En augmentant la quantité globale de diazirine ayant réagi, il y a statistiquement plus de chances d'obtenir de l'enzyme marquée, et, par conséquent, ceci aura des répercussions sur

la quantité de marquage spécifique provoqué. L'augmentation du temps d'exposition des échantillons à la lumière UV a donc le potentiel de faciliter la détection des peptides lors de l'analyse par spectrométrie de masse en tandem, en augmentant la quantité globale de peptides marqués obtenue.



**Figure 5.18** Activité enzymatique de la hTG2 après différents temps d'exposition aux rayons UV

### 5.3.3. Validation de la stratégie de photomarquage

Ayant en main le substrat accepteur photoactivable et ayant déterminé qu'un temps d'exposition de dix minutes à la lumière du four UV qui sera utilisé n'affecte pas l'activité enzymatique de la hTG2, l'expérience de marquage a été lancée.

**Tableau 5.1** Composition des échantillons préparés pour l'expérience de photomarquage utilisant un substrat accepteur photoactivable

Numéro d'échantillon	Présence du substrat photoactivable 5.11	Autre ligand ajouté
1	X	---
2	X	Fmoc-SarGK(Acryl)LPF-OH
3	√	Fmoc-SarGK(Acryl)LPF-OH
4	√	---
5	X	Ac-PNPQLPF-OH
6	√	Ac-PNPQLPF-OH
7	√	AL5

Pour cela, sept échantillons ont été préparés, comme le montre le Tableau 5.1. Les échantillons 1, 2 et 5, qui ne contiennent pas la molécule photoactivable, serviront de contrôles, tandis que l'échantillon 4, contenant que le substrat accepteur photoactivable, permettra de juger de la quantité de marquage non-spécifique obtenu. En effet, comme le substrat accepteur ne peut lier l'enzyme en absence de substrat donneur, peu de peptides marqués devraient être obtenus de cet échantillon, et ils devraient provenir essentiellement d'un marquage en surface de l'enzyme.

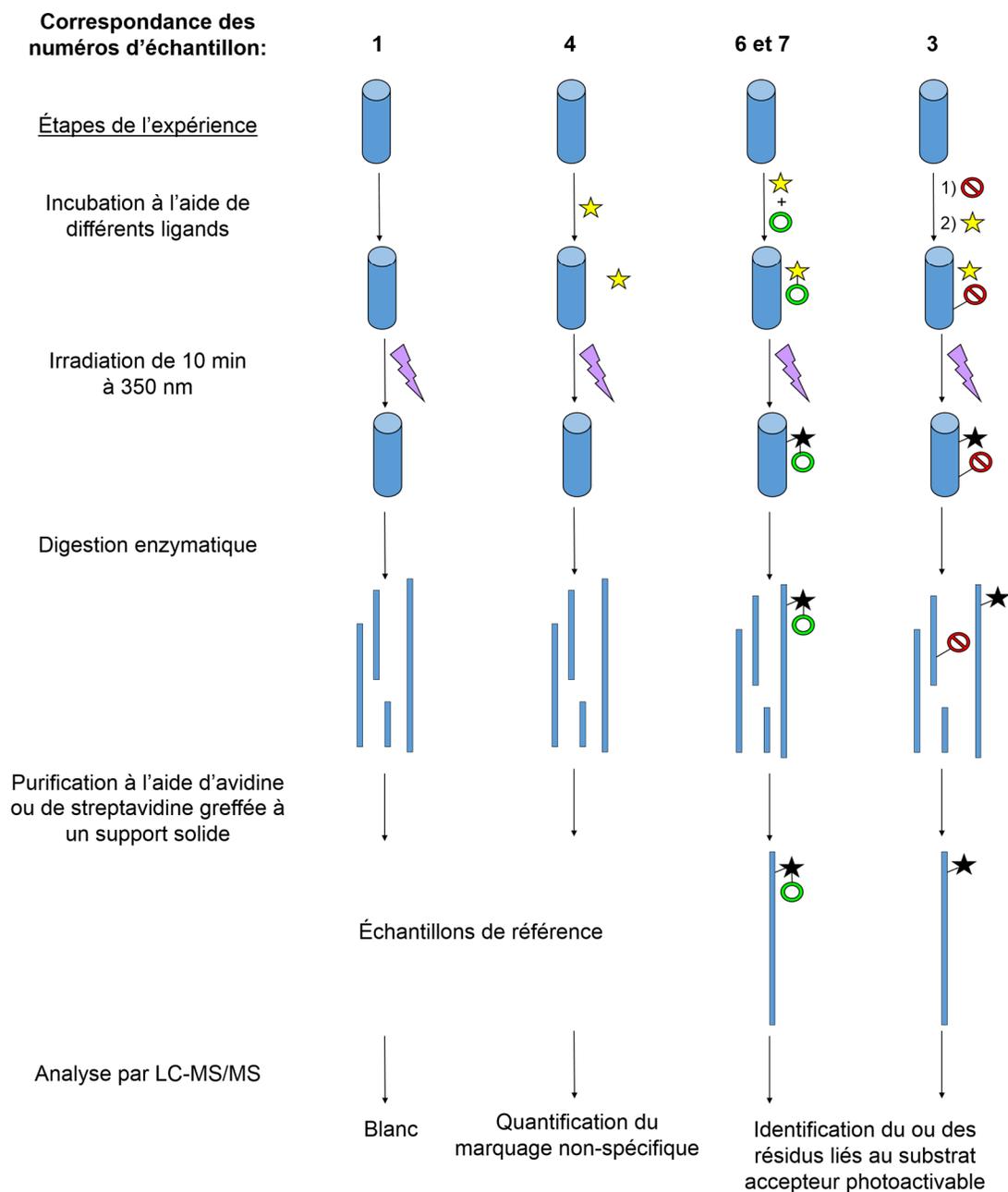
Dans le cas de l'échantillon 3, un inhibiteur irréversible, préalablement synthétisé et évalué au sein du groupe<sup>229</sup>, est utilisé afin de jouer le rôle d'un mime de l'intermédiaire acyl-enzyme. En effet, ce type d'inhibiteur est basé sur la structure du substrat donneur et réagit de manière covalente avec la cystéine catalytique de la TG2. Par conséquent, l'enzyme, coincée dans cette position, devrait permettre la liaison du substrat accepteur.

Finalement, les échantillons 6 et 7 renferment, en plus du substrat accepteur photoactivable, un substrat donneur de l'enzyme. La présence du substrat donneur assure la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme capable de lier la molécule **5.11**. Aussi, dans le meilleur des cas, ces échantillons pourraient mener au greffage du produit de la réaction enzymatique à la hTG2 pendant l'expérience de marquage. En effet, il a déjà été mentionné précédemment qu'à haute concentration de substrat accepteur photoactivable, en présence de AL5, une inhibition par le produit peut être observée. Ceci laisse présager qu'en utilisant de hautes concentrations de substrats, tout en laissant incuber quelques minutes les échantillons avant l'irradiation, il serait possible de lier le produit, issu de la réaction enzymatique, de manière covalente à l'enzyme.

Un schéma de la stratégie globale envisagée est présenté à la Figure 5.19, située à la page suivante.

Les échantillons contenant l'inhibiteur irréversible (1,65 mM), soit les numéros 2 et 3, ont préalablement été incubés pendant 30 minutes à 25 °C, correspondant à plus de 20 fois le temps de demi-réaction selon les paramètres cinétiques de la molécule ( $K_I = 26 \mu\text{M}$  (gpITG2),  $k_{\text{inact}} = 0,53 \text{ min}^{-1}$ )<sup>229</sup>, afin de permettre l'inactivation totale de l'enzyme. Par la suite, la

molécule **5.11** a été ajoutée (1,95 mM,  $\sim 5 K_M^{app}$ ) avant de procéder, immédiatement après l'ajout, à l'irradiation.



### Légende

- ★ = Substrat accepteur photoactif
- = Substrat donneur (Ac-PNPQLPF-OH ou AL5)
- ★ = Substrat accepteur photoactif après irradiation
- ⓧ = Inhibiteur irréversible (Fmoc-SarGK(Acryl)LPF-OH)

**Figure 5.19 Stratégie envisagée pour l'identification du site de liaison du substrat accepteur par photomarquage**

Pour ce qui est des autres échantillons, une pré-incubation de cinq minutes a été effectuée. Dans le cas du substrat donneur AL5, une concentration saturante de 435  $\mu\text{M}$  a été employée, soit une concentration équivalente à environ 31 fois la valeur de  $K_M$  mesurée<sup>134</sup>, tandis que, pour le substrat peptidique Ac-PNPQLPF-OH, une concentration de 29,3  $\mu\text{M}$  a été utilisée, correspondant à environ 2,6 fois la valeur de  $K_M$  obtenue<sup>134</sup>. La faible concentration employée pour le substrat peptidique est due à la moins grande solubilité du composé dans les conditions adoptées pour l'expérience de marquage.

Une fois l'irradiation complétée, une inactivation immédiate de l'enzyme a été effectuée via l'ajout de HCl 1 M, provoquant ainsi l'abaissement du pH à une valeur en bas de 6, où la TG2 est inactive.

Finalement, ces échantillons ont été soumis à une analyse LC-MS (ESI-MS) de la protéine entière afin de vérifier si une incorporation du marqueur peut être observée à cette étape de la manipulation. Les résultats obtenus sont résumés au Tableau 5.2.

**Tableau 5.2 Analyse des résultats obtenus par spectrométrie de masse de la protéine entière**

Numéro d'échantillon	Masse majoritaire observée pour la protéine (kDa)	Différence de masse avec la hTG2 (Da)	Correspondance de la masse ajoutée <sup>a</sup>
1	77,67	---	---
2	78,57	900	1 inhibiteur
3	80,08	2410	1 inhibiteur + 2 marqueurs
4	77,69	20	---
5	77,67	0	---
6	79,22	1550	2 marqueurs ou 1 produit
7	78,74	1070	1 produit

<sup>a</sup>Masses molaires de référence (g / mol) : marqueur **5.11** (forme neutre, sans diazirine) = 746, Fmoc-SarGK(Acryl)LPF-OH = 908, Ac-PNPQLPF-OH = 854, AL5 (sans *p*-nitro) = 322, produit issu de la réaction enzymatique avec Ac-PNPQLPF-OH (sans diazirine) = 1582, produit issu de la réaction enzymatique avec AL5 (sans diazirine) = 1065

Selon ces données, il est possible de constater que la stratégie de marquage employée semble très bien fonctionner. En effet, l'échantillon 2 a permis d'observer l'ajout de l'inhibiteur irréversible sur la totalité de l'enzyme, tandis que l'échantillon 3, présente, en plus

de l'addition de l'inhibiteur, une incorporation d'environ 2 molécules de marqueur par enzyme, probablement due, en partie, à du marquage non-spécifique.

De son côté, l'échantillon 4, bien que plus hétérogène que les échantillons 1 et 5, démontre que le marquage non-spécifique est plutôt marginal, puisque, dans l'ensemble, la masse de la hTG2 non-modifiée est observée.

Finalement, les échantillons 6 et 7 semblent très prometteurs. En effet, dans le cas de l'échantillon contenant le AL5 ainsi que le substrat accepteur photoactivable, la masse ajoutée correspond à l'addition d'une molécule ayant un poids qui correspond au produit de la réaction enzymatique liant les deux substrats. Dans le cas de l'Ac-PNPQLPF-OH, l'augmentation de masse observée pourrait correspondre soit à l'incorporation de deux molécules de marqueur, ou encore à l'incorporation d'une molécule de produit de réaction; la résolution de l'appareil n'est pas suffisante afin de tirer une conclusion hors de tout doute raisonnable. Néanmoins, le résultat obtenu avec AL5 laisse présager l'incorporation du produit de la réaction enzymatique.

Par la suite, afin de procéder à la digestion trypsique et à la purification des fragments marqués en utilisant l'avidine ou la streptavidine greffée à un support solide, un changement de tampon fut nécessaire. En effet, les échantillons irradiés contiennent une très grande concentration de marqueur biotinylé excédentaire, ce qui nécessiterait l'utilisation d'une beaucoup trop grande quantité d'avidine ou de streptavidine afin de récupérer l'entièreté des molécules contenant une biotine. Afin de combiner à la fois l'élimination du marqueur excédentaire et le changement de tampon, une série de concentration sur filtre ayant un seuil de 30 kDa, a été effectuée à l'aide d'une centrifugeuse. Malheureusement, l'enzyme semble être restée prisonnière du filtre, puisqu'elle n'a pu être retrouvée ni dans le filtrat, ni dans le surnageant.

#### **5.3.4. Tâches restant à accomplir**

Comme il a été prouvé que la stratégie envisagée semble porter fruit, mais que la molécule **5.11** a été complètement consommée pour l'expérience de marquage décrite préalablement, il a été choisi de passer le flambeau à un autre membre du groupe pour terminer l'analyse, qui est actuellement toujours en cours.

Néanmoins, différentes autres méthodes d'échange de tampon permettant l'élimination du substrat biotinylé excédentaire sont à envisager, comme la dialyse ou encore une colonne chromatographique d'exclusion de taille. D'un autre côté, la taille des échantillons étant petite (0,180 mg d'enzyme), et la concentration finale étant importante pour l'analyse par spectrométrie de masse en tandem, ces deux facteurs présentent un certain défi dans le choix et l'accessibilité du matériel convoité, tout comme dans l'exécution même de la méthode choisie.

## 5.4. Conclusion

L'utilisation du photomarquage en guise de technique de greffage covalent d'un ligand se liant, à la base, de manière réversible à une protéine, est une technique relativement simple à exécuter et est fonctionnelle.

Par contre, l'analyse par spectrométrie de masse en tandem, permettant d'identifier spécifiquement le ou les résidus marqués, représente un défi afin de trouver les peptides modifiés, et, surtout, afin de distinguer le marquage spécifique du non-spécifique. De ce côté, l'utilisation d'une technique de purification préalable à l'analyse reste le meilleur moyen de contourner ces problèmes.

Il a été possible de constater que, même lorsque les résidus marqués sont spécifiquement déterminés, comme dans le cas de l'inhibiteur réversible photoactivable, où la cystéine 230 a été formellement identifiée, la détermination d'un site de liaison précis, par modélisation moléculaire, n'est pas garantie à 100 %. En effet, dans le cas de la gpITG2 utilisée pour cette étude, le fait de ne pas connaître le conformère de l'enzyme liant préférentiellement cette classe d'inhibiteurs a mené à l'obtention de résultats contradictoires entre la modélisation moléculaire, une technique qui ne repose pas sur des faits réels, et l'étude conformationnelle par gel natif, permettant d'obtenir des données expérimentales réelles.

Néanmoins, l'étude précédemment décrite, ayant pour but de déterminer le site de liaison des inhibiteurs réversibles conçus dans le groupe, ne fut pas menée vainement, puisqu'elle a permis d'identifier un résidu marqué, et le travail récent effectué dans le groupe, par électrophorèse capillaire, semble enfin pouvoir expliquer les résultats recueillis, en

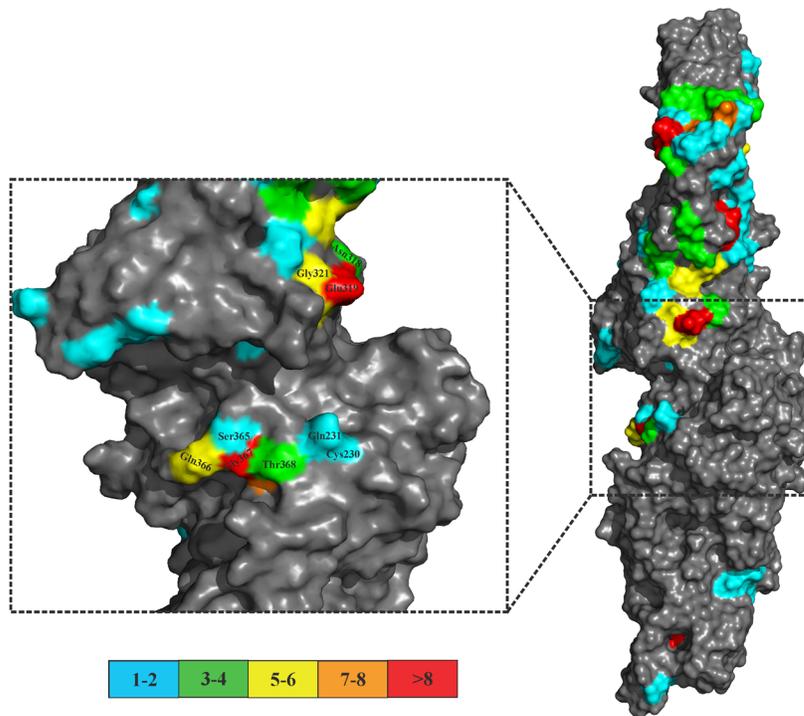
donnant raison à la modélisation moléculaire et en discréditant l'étude conformationnelle par gel natif. Nous semblons donc sur la bonne voie afin de déterminer, une fois pour toute, le mode de liaison de cette classe d'inhibiteur.

De son côté, la détermination du site de liaison du substrat accepteur est toujours en cours, mais semble plus que prometteuse, vu les résultats obtenus suite à l'analyse de la masse de la protéine entière après irradiation. En effet, il a été trouvé que l'enzyme désactivée par un inhibiteur irréversible a permis d'incorporer deux molécules de marqueur, et que la combinaison de l'utilisation d'un substrat donneur avec le substrat accepteur photoactivable **5.11** semble mener au greffage du produit issu de la réaction enzymatique liant les deux substrats.

Le Dr. Christopher Clouthier ayant repris les rênes du projet au sein du groupe, des résultats d'analyses récentes, effectuées par spectrométrie de masse en tandem sur des échantillons irradiés, obtenus grâce à nos collaborateurs à l'Institut de recherche en immunologie et oncologie (IRO), le Pr. Pierre Thibault et le Dr. Éric Bonneil, ont permis d'identifier deux régions de la hTG2 marquées préférentiellement, comme le montre la Figure 5.20. Ces résidus ont été identifiés suite à une digestion enzymatique de la hTG2 irradiée en présence du substrat accepteur photoactivable, après purification des peptides marqués à l'aide de streptavidine, permettant d'éliminer totalement les faux positifs, tel qu'envisagé dans la méthode décrite à la Figure 5.19.

Ces analyses ont permis d'identifier une première région, se situant près du site actif de l'enzyme, indiquant vraisemblablement le site de liaison du substrat accepteur lors de la réaction enzymatique.

Pour ce qui est de la seconde région identifiée, une hypothèse peut être formulée pour expliquer ce marquage qui semble non-aléatoire. En effet, la partie C-terminale de l'enzyme contient plusieurs résidus glutamines, qui pourraient agir en guise de substrat donneur de l'enzyme, expliquant l'auto-réticulation possible de la TG2 lorsqu'elle est mise en contact avec du calcium sur de longues périodes<sup>142</sup>. La hTG2 aurait donc pu utiliser ces glutamines en guise de substrat donneur afin d'y greffer, spécifiquement, le substrat accepteur photoactivable, ce qui pourrait expliquer le résultat obtenu.



**Figure 5.20 Identification des résidus modifiés et fréquence de marquage observée via spectrométrie de masse en tandem suite au marquage de la hTG2 à l'aide d'un substrat accepteur photoactivable**

Malgré tout, il reste encore du chemin à faire avant d'être en mesure d'identifier un mode de liaison clair pour le substrat accepteur et des études par arrimage moléculaire sont en cours afin d'y parvenir le plus rapidement possible, maintenant qu'il a été démontré que la technique utilisée, soit l'utilisation d'un substrat photoactivable biotinylé permettant la purification des peptides obtenus suite à une digestion enzymatique, est un franc succès.

## Chapitre 6 : Conclusion

La transglutaminase tissulaire est une enzyme remplie de surprises qui pourra occuper le temps de nombreux scientifiques pendant encore de nombreuses années.

Le projet de recherche présenté dans le cadre de cette thèse a permis d'exposer une toute nouvelle méthode d'expression et de purification de la hTG2 qui se révèle être, à ce jour, la seule méthode permettant l'obtention d'une enzyme libre, grâce à l'introduction d'un site de reconnaissance pour un clivage enzymatique à la PSP, permettant, en une seule étape de purification, d'obtenir environ 3 mg de protéine par litre de culture.

La TG2 étant soupçonnée de jouer un rôle dans plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington ou d'Alzheimer, mais aussi dans la formation de cataractes ou encore dans le développement de la maladie céliaque, elle représente une cible pharmacologique plus qu'intéressante. Dans cette optique, le fait de pouvoir mener des études directement avec l'homologue humain de cette protéine représente un avantage indéniable, puisque ceci diminue les risques de biais des résultats obtenus, en plus d'offrir la possibilité de travailler avec une enzyme structurellement bien caractérisée.

Les études menées sur les inhibiteurs réversibles développés au sein du groupe ont permis de faire grandement évoluer notre compréhension du mécanisme d'action de ces molécules. En effet, il a été démontré que la présence du calcium, un métal nécessaire pour l'activité enzymatique de la TG2, influence le pouvoir inhibitoire de la classe des trans-cinnamoyles. Avec un  $K_i$  de  $0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$  pour l'enzyme libre (gpITG2) et un  $K_i'$  de  $4,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$  pour la forme liée au calcium, une relation de non-compétitivité mixte a été démontrée entre le composé **1.20** et le métal.

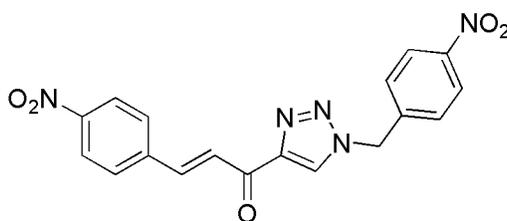


Figure 6.1 Structure de l'inhibiteur réversible **1.20**

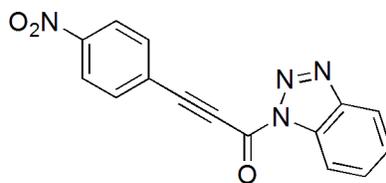
Ceci signifie donc que la présence du calcium n'est pas essentielle pour permettre à l'enzyme de lier l'inhibiteur, mais que ce dernier possède une meilleure affinité pour l'enzyme libre.

Les études permettant de déterminer le site de liaison de cette classe de molécules n'ont pas mené aux résultats escomptés, la modélisation moléculaire et l'étude conformationnelle par gel natif ayant conduit à des résultats contradictoires quant à l'identification du conformère de l'enzyme étant le plus susceptible de lier nos molécules. Par contre, une certitude demeure, soit celle que notre inhibiteur photoactivable a bel et bien réagi avec la cystéine 230.

Néanmoins, des études plus récentes effectuées par électrophorèse capillaire tendent à démontrer que la forme fermée de l'enzyme semble être favorisée en présence de nos inhibiteurs, et que la dépendance en temps de l'inhibition observée, non-attribuable à une inhibition à liaison lente, ni à une inhibition irréversible, semble être liée à un changement conformationnel lent de l'enzyme.

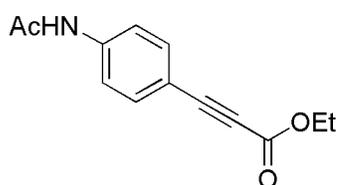
En supposant que la forme ouverte, et donc active, est la forme liée au calcium, et que la forme fermée représente plutôt l'enzyme libre, cette découverte vient appuyer les résultats obtenus de l'étude du profil cinétique existant entre le calcium et l'inhibiteur **1.20**. En effet, sachant qu'un équilibre conformationnel lent existe chez l'enzyme<sup>219</sup>, si nos molécules lient plus fortement l'enzyme libre que l'enzyme liée au calcium, ceci se traduirait, dans les faits, par l'observation d'une dépendance en temps de l'inhibition.

De plus, la susceptibilité démontrée à une attaque nucléophile par les thiols des inhibiteurs précédemment développés au sein du groupe pouvant nuire à l'utilisation en milieu biologique de cette famille de molécules, il a été démontré qu'un squelette ynone, en remplacement du squelette trans-cinnamoyle, semble être une alternative prometteuse, puisque la molécule **3.30**, avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de  $2,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , est environ cinq fois plus puissante que son homologue trans-cinnamoyle, et représente un des meilleurs inhibiteurs développés dans le groupe à ce jour.



**Figure 6.2 Structure de la molécule 3.30**

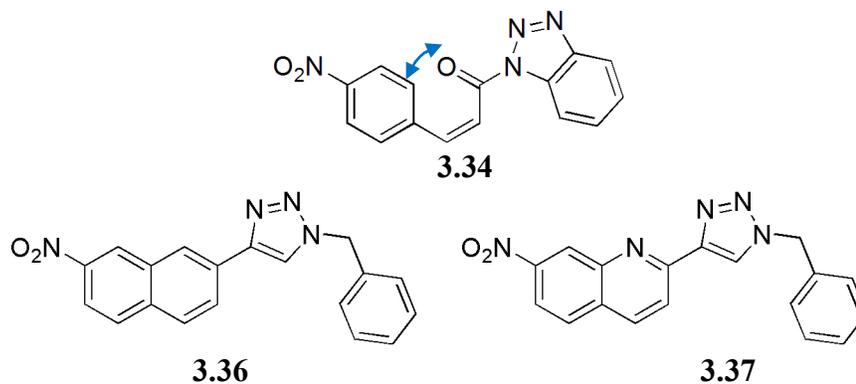
Néanmoins, sa résistance à l'attaque nucléophile des thiols n'a toujours pas été démontrée, et la synthèse d'une molécule comme celle présentée à la Figure 3.28, reproduite ci-dessous, pourrait favoriser l'ionisation du composé et permettre de vérifier, une fois pour toute, cette spécificité.



**3.35**

**Figure 3.28 Structure d'une ynone permettant l'évaluation potentielle, par LC-MS, de la susceptibilité à l'attaque des thiols de la nouvelle classe d'inhibiteurs réversibles identifiée**

D'un autre côté, l'excellent pouvoir inhibiteur obtenu pour la molécule **3.34**, soit un composé de type *Z*-cinnamoyle, avec une valeur d' $IC_{50}$  de  $2,1 \pm 0,1 \mu M$ , démontre l'importance de la géométrie de nos inhibiteurs afin d'optimiser les interactions avec la TG2, et ouvre la porte au développement de nouveaux squelettes qui pourrait permettre à la fois d'améliorer les interactions avec l'enzyme, mais aussi de diminuer la susceptibilité à l'attaque nucléophile des thiols.

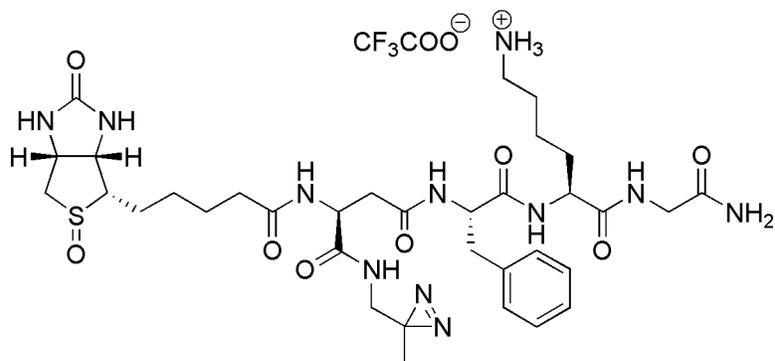


**Figure 3.29 Proposition de structures de type naphthalène ou quinoline permettant de mimer le cinnamoyle *Z***

En effet, la proximité structurale avec des cycles comme le naphthalène ou la quinoline est frappante, comme montré à la Figure 3.29, reproduite à la page précédente, et la vérification du potentiel inhibitoire de molécules comme les structures 3.36 et 3.37 pourrait amener encore plus d'informations sur le mode de liaison de nos molécules à l'enzyme.

Finalement, dans un tout autre ordre d'idée, la démonstration du bon fonctionnement de la stratégie de photomarquage, utilisée ultérieurement avec un inhibiteur réversible photoactivable, a permis le développement d'une nouvelle génération de molécules, basée sur le substrat accepteur de l'enzyme. Cette génération arbore aussi, au sein de sa structure, une biotine, afin de permettre une simplification de l'analyse par spectrométrie de masse en tandem, en permettant la purification du mélange peptidique obtenu après la digestion enzymatique, via l'isolation des peptides auxquels la molécule d'intérêt s'est greffée.

Ce projet n'est pas encore arrivé à terme, mais les résultats récents obtenus par spectrométrie de masse en tandem vont enfin permettre l'identification d'un site de liaison de la molécule 5.11, permettant, à l'aide d'études par arrimage moléculaire, la suggestion d'un mode de liaison pour cette classe de substrat.



**Figure 6.3 Structure du substrat accepteur photoactivable 5.11**

Cette précieuse découverte pourrait mener, dans un avenir assez proche, au développement de nouvelles classes de substrats ou d'inhibiteurs, basées sur le squelette du substrat accepteur, plutôt que celui du substrat donneur, comme c'est le cas à l'heure actuelle, ouvrant la porte, par exemple, à des études plus approfondies du mécanisme complexe de la hTG2, et, par conséquent, à une meilleure compréhension de son mode de fonctionnement *in vitro* et *in vivo*, pouvant mener, ultérieurement, à l'émergence de médicaments potentiels, qui, on ne sait jamais, pourrait permettre de traiter, voire même de guérir, dans quelques décennies,

des maladies comme l'Alzheimer, le Parkinson ou encore la maladie cœliaque, qui sont des fléaux contemporains.

## Chapitre 7 : Partie expérimentale

### 7.1. Partie expérimentale du Chapitre 2

Tous les réactifs qui ont été utilisés sont de la plus haute pureté disponible et les produits chimiques et solvants utilisés proviennent des compagnies *Sigma-Aldrich Corporation* et *VWR International*.

Les enzymes de restriction ainsi que la ligase utilisées proviennent des compagnies *New England Biolabs* et *MBI Fermentas*, tandis que les oligonucléotides synthétiques ont été commandés chez *AlphaDNA*. De son côté, la protéase *PreScission<sup>MC</sup>* (PSP) a été obtenue de la compagnie *GE Healthcare Life Sciences*, tandis que l'albumine de sérum bovin (BSA) provient de *Pierce Protein Biology*.

Toutes les solutions aqueuses ont été préparées à l'aide d'eau purifiée à l'aide du système *BioCell* de Millipore, le séquençage d'ADN a été effectué à l'IRIC sur un appareil de type *3730 DNA Analyser* de la compagnie *Applied Biosystems*, tandis que les essais cinétiques ont été conduits sur un spectrophotomètre UV-vis de type *Cary 100 BIO*.

Finalement, le substrat donneur AL5<sup>50</sup>, le peptide Ac-PNPQLPF-OH<sup>66</sup>, ainsi que les molécules **1.11**<sup>62</sup>, **1.20**<sup>116</sup> et **1.21**<sup>116</sup>, ont été préparés dans notre laboratoire, en suivant des procédures antérieurement publiées.

#### 7.1.1. Construction du modèle d'homologie de la forme ouverte de la gplTG2

Le modèle d'homologie de la forme ouverte de la gplTG2 a été construit en utilisant les coordonnées PDB de l'unique structure cristalline de ce conformère, correspondant à l'homologue humain de la TG2 (code PDB 2Q3Z, octobre 2007, 2,00 Å)<sup>51</sup>, comme gabarit. Cette structure de base a préalablement été nettoyée, via la suppression des molécules d'eau et des ions cristallisés, du ligand, ainsi que des monomères supplémentaires.

Par la suite, un alignement des séquences a été effectué en utilisant les paramètres par défaut de *ClustalW*<sup>230</sup> et cinq modèles de base ont été générés à l'aide de *Modeler 9v2*, en se

servant des paramètres par défaut pour les conformations des boucles, via l'usage des coordonnées PDB de la structure cristalline préalablement identifiée.

Ces modèles ont été minimisés énergétiquement via 1000 itérations utilisant l'algorithme de la plus forte pente (« *steepest descent* »), suivies d'une utilisation d'un gradient conjugué, jusqu'à convergence de  $0,001 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ , le tout dans un champ de force de type « consistance de valence » (« *CVFF* ») où une constante diélectrique dépendante de la distance de 80 a été utilisée afin de mimer l'environnement hydrophile de la protéine dans l'eau. Ces minimisations ont été effectuées grâce au module *Discover* du logiciel *InsightII*, tandis que la qualité des modèles ainsi obtenus a été évaluée à l'aide de *Molprobit*<sup>149</sup> et de *ProsaII*<sup>151</sup>.

### 7.1.2. Construction du plasmide GST-PSP-hTG

7.1.2.1. Construction d'un insert de 2000 pb incluant le gène codant pour le site de reconnaissance nécessaire pour un clivage à la PSP

Le gène codant pour le site de reconnaissance nécessaire pour un clivage par la protéase PreScission<sup>MC</sup> (PSP) a été introduit dans le plasmide de départ pG-TG<sup>137</sup>, gracieusement fourni par le Pr. Lai du département de médecine de l'Université de Caroline du Sud, via mutagénèse dirigée utilisant une technique d'amplification par chevauchement (*Site Overlap Extension*)<sup>158</sup>.

Pour ce faire, le plasmide pG-TG a été utilisé comme gabarit, tandis que quatre amorces différentes ont été utilisées :

- RC-insertPSP-R (CCATGGCCAGTGGACCCTGGAACAGAACTTCCAGCAG ATCCGATTTTGGAGGATGGT),
- RC-insertPSP-F (ACCATCCTCCAAAATCGGATCTGCTGGAAGTTCCAGG GTCCACTGGCCATGG),
- hTG-PSP-R (CTCCACAGCATCTCTTAGTGGA),
- hTG-PSP-F (ATCAAACAGGATTTTCGCCTGCT).

Toutes les PCR qui seront décrites ci-dessous ont été préparées de la même manière, en utilisant un ratio des polymérase Vent et Taq de 1 U : 5 U, ainsi que 4 mM de MgSO<sub>4</sub>, à des températures d'appariement variables, qui seront ultérieurement précisées.

Dans un premier temps, un fragment de 300 pb a été généré en utilisant les amorces RC-insertPSP-F et hTG-PSP-R, tandis qu'un fragment de 1700 pb a été généré à l'aide des amorces RC-insertPSP-R et hTG-PSP-F. Pour ces PCR, un gradient de températures d'appariement allant de 50 à 65 °C a été utilisé.

Le poids moléculaire des fragments a été évalué via un gel d'agarose 1 %, type de gel utilisé pour toutes les analyses, où la migration a été effectuée jusqu'à ce que le colorant atteigne environ les  $\frac{3}{4}$  du gel.

Par la suite, une purification des échantillons a été réalisée à l'aide de l'ensemble « *PCR Cleanup* » de la compagnie *Qiagen*, puis les deux fragments ainsi générés ont été combinés, dans un ratio de 1 : 5 µL entre l'échantillon contenant le fragment de 300 pb et celui contenant le fragment de 1700 pb, en utilisant, cette fois, un gradient de température allant de 50 à 60 °C.

Une analyse sur gel d'agarose a permis de confirmer la présence de l'insert désiré contenant environ 2000 pb.

L'isolation de cet insert a été effectuée via une migration du produit PCR sur un gel d'agarose, suivie d'une extraction de gel par centrifugation, effectuée à l'aide de l'ensemble « *Freeze 'N Squeeze* »<sup>MC</sup> de la compagnie *Bio-Rad*.

#### 7.1.2.2. Assemblage du plasmide pGST-PSP-hTG

L'insert de 2000 pb, dont la confection a été précédemment décrite, a été digéré, de manière successive, à l'aide des enzymes de restrictions *NcoI* et *NarI*.

Dans un premier temps, l'insert a été soumis, pendant 1 h 30 à 37 °C, à une digestion utilisant l'enzyme *NcoI*, puis, celle-ci a été inactivée via un chauffage à 65 °C effectué pendant 30 min. Suite à une période de refroidissement à 4 °C, l'enzyme de restriction *NarI* a été ajouté au mélange, puis l'échantillon a été incubé 1 h à 37 °C. Le produit de cette double digestion a

par la suite été purifié par extraction par centrifugation d'un gel d'agarose, comme décrit précédemment. Finalement, une précipitation au butanol a été effectuée.

Pour ce qui est du plasmide pG-TG, une triple digestion consécutive a été effectuée. Dans un premier temps, le plasmide a été soumis pendant 1 h 30 à 37 °C, à une digestion utilisant l'enzyme *NcoI*, puis, celle-ci a été inactivée via un chauffage à 65 °C effectué pendant 30 min. Suite à une période de refroidissement à 4 °C, l'enzyme de restriction *NarI* a été ajouté au mélange, puis l'échantillon a été incubé 5 h à 37 °C, en prenant soin de faire des ajouts, l'enzyme *NarI*, toutes les 30 min. Le produit de cette double digestion a par la suite été soumis à une précipitation au butanol, avant qu'une dernière digestion, utilisant l'enzyme de restriction *SwaI* à 25 °C durant une période de 2 h, soit effectuée. Finalement, le produit de cette triple digestion a été purifié par extraction par centrifugation d'un gel d'agarose, comme décrit précédemment, puis soumis à une précipitation au butanol.

Dans un dernier temps, une ligation de l'insert et du plasmide digérés a été effectuée à 16 °C en utilisant un ratio molaire de 1 : 5 entre l'insert et le plasmide. Le produit ainsi obtenu a été utilisé afin de transformer des cellules de *E. coli* DH5 $\alpha$  chimio-compétentes. Ces cellules ont été soumises à une sélection effectuée à l'aide du gène de résistance à l'ampicilline contenu dans le vecteur d'intérêt.

Par la suite, dix colonies ont été prélevées, puis ont été mises en culture, de manière indépendante, afin d'en extraire le plasmide, via l'utilisation de l'ensemble de « *Miniprep* »<sup>MC</sup> de la compagnie *Qiagen*.

Le choix du plasmide à retenir a été effectué via une analyse du patron de digestion de chacun des échantillons soumis à l'action simultanée des enzymes de restrictions *HindIII* et *SacII*, pendant 1 h à 37 °C, ainsi que suite au séquençage intégral de l'ADN du fragment inséré entre les sites de reconnaissance de *NarI* et *NcoI*.

Le plasmide retenu a par la suite été utilisé afin de transformer des cellules de *E. coli* BL21(DE3) chimio-compétentes, afin d'être subséquemment utilisé pour l'expression de la hTG2 liée à la GST et possédant un site de clivage à la PSP.

### **7.1.3. Protocole optimisé d'expression recombinante de la protéine fusion GST-hTG2**

Un aliquote des cellules *E. coli* BL21(DE3) contenant le plasmide d'expression pGST-PSP-hTG a été prélevé directement du stock congelé afin d'ensemencer 5 mL de TB contenant 100 µg/mL. Cette solution de pré-culture a été agitée à 37 °C et à 240 rpm pendant 16 h.

Cette suspension est par la suite utilisée afin d'inoculer 1 L de TB, qui est par la suite incubé à 37 °C avec une agitation de 240 rpm jusqu'à ce que la densité optique mesurée à 600 nm atteigne environ 0,6, soit environ 2 h 45.

À cette étape, l'IPTG est normalement ajouté. Par contre, il a été déterminé qu'un résultat optimal est obtenu en absence de ce composé. Par conséquent, une fois la densité optique visée atteinte, la culture a tout simplement été transférée, pour 20 h supplémentaires, à 28 °C avec une agitation de 240 rpm.

Les cellules ont été récupérées via une centrifugation effectuée à l'aide d'une force de 2000 g pendant 30 min à 4 °C et le culot a ensuite été remis en suspension dans 24 mL de tampon de lyse (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP et 15 % glycérol, pH 8,0).

La lyse cellulaire a été effectuée à l'aide d'un homogénéisateur cellulaire (« *Cell Disrupter* » de la compagnie Constant Systems), à l'aide d'une pression de 27 kpsi. Durant le processus de lyse, l'appareil a été lavé à l'aide de 10 mL de tampon de lyse afin de récupérer la totalité de la préparation.

Finalement, le lysat ainsi obtenu a été centrifugé pendant 1 h sous une force de 44 000 g à 4 °C, et le surnageant obtenu a été passé à travers un filtre possédant des pores de 0,22 µM.

### **7.1.4. Protocole optimisé pour la purification de la hTG2**

Toutes les étapes qui seront décrites ci-dessous ont été effectuées entre 0 et 4 °C. La résine utilisée pour la purification, soit 1 mL de « *gluthathione Sepharose 4B* » de la compagnie *GE Helthacare*, a été, dans un premier temps, équilibrée à l'aide du tampon de lyse. Par la suite, cette suspension a été ajoutée au filtrat de lyse précédemment obtenu, et ce mélange a été agité sur un agitateur rotatif à 100 rpm pendant 2 h. Par la suite, celui-ci a été

versé dans une colonne de 1 × 10 cm pour filtration par gravité de type *Econo-Column*<sup>MC</sup> de la compagnie *Bio-Rad*.

La résine a ensuite été lavée successivement à l'aide de 10 mL de tampon de lyse additionné de 0,5 % de Triton X-100, de 10 mL de tampon de lyse puis avec 10 mL de tampon d'entreposage (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA et 1 mM TCEP, pH 7,2).

Finalement, le clivage sur colonne a été réalisé à l'aide de 1 mL d'une solution 0,375 mg/mL de PSP ajouté à la résine, qui a été incubée en présence de la protéase pendant 18 h. L'élution de la hTG2 a, par la suite, été effectuée à l'aide de 3 mL de tampon d'entreposage.

L'activité et la concentration de la hTG2 ainsi récupérée ont été évaluées à l'aide des tests décrits dans les sections suivantes, et, une fois effectués, du glycérol a été ajouté à la solution d'élution obtenue, pour une concentration finale de 10 %. Cette solution a ensuite été divisée en portions contenant 0,1 U d'enzyme chacune, qui ont ensuite été congelées rapidement via l'utilisation de glace sèche et entreposées à -80 °C.

#### **7.1.5. Test de concentration de la hTG2**

La concentration de l'ensemble des protéines contenues dans la solution d'élution a été évaluée à l'aide du test développé par *Bio-Rad*, basé sur la méthode de Bradford, en utilisant la BSA comme protéine de référence afin de construire, à chaque fois que le test a été réalisé, une courbe d'étalonnage (concentrations utilisées entre 1,5 et 10,0 µg/mL).

Le colorant a été incubé en présence des protéines pendant 20 min avant que l'absorbance à 595 nm ne soit mesurée. Un triplicata a été effectué pour l'évaluation de la concentration de la solution contenant la hTG2, où 10 µL de la solution d'élution ont été utilisés pour chaque essai. L'absorbance de ces solutions a été comparée à la courbe d'étalonnage afin d'en déterminer la concentration précise.

### 7.1.6. Test d'activité pour la hTG2, basé sur la méthode AL5

L'activité de la hTG2 a été évaluée à l'aide d'un test colorimétrique suivi en continu en utilisant le AL5 (molécule 2.4) comme substrat, test basé sur une méthode précédemment développée dans le groupe<sup>50</sup>.

Pour ce test, un triplicata, où chaque échantillon contient 925  $\mu\text{L}$  du tampon d'analyse (0,1 M MOPS, 50  $\mu\text{M}$  EDTA, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,0), 25  $\mu\text{L}$  d'une solution 17,4 mM de AL5 dans le DMF, ainsi que 50  $\mu\text{L}$  de la solution d'éluion a été préparé, et l'absorbance a été mesurée en continue à 405 nm pendant 10 min à 25 °C. De plus, un blanc, n'incluant pas l'enzyme et remplacée par la même quantité d'eau, a été effectué en parallèle.

L'activité de l'enzyme a été calculée en définissant une unité d'activité enzymatique (U) comme étant la quantité de TG2 nécessaire afin de catalyser la formation de 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrophénolate par minute.

Finalement, l'activité spécifique a été rapportée en terme d'unités par milligramme (U/mg) de protéine.

### 7.1.7. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la hTG2

La séparation des protéines sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) a été effectuée, selon la procédure de Laemmli, à l'aide de mini-gels (86  $\times$  68 mm) contenant 10 % d'acrylamide à pH 8,8 ainsi que de gels de compression (« *stacking gel* ») contenant 4 % d'acrylamide à pH 6,8, tous deux incluant 2,7 % d'agent de réticulation, sur un appareil de type « *Mini-PROTEAN Tetra Cell<sup>MC</sup>* » de la compagnie *Bio-Rad*.

L'échantillon de protéine (15  $\mu\text{L}$ ) a, quant à lui, été mélangé avec 5  $\mu\text{L}$  du tampon de chargement (50 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, SDS 2 % p/v, bleu de bromophénol 0,1 % p/v et glycérol 10 % v/v, pH 6,8) et le tout a été mis à bouillir pendant 5 min avant de charger le gel.

La révélation des protéines a été effectuée à l'aide du bleu de Coomassie 250 R, puis les gels ont été séchés pour conservation. L'échelle de poids moléculaire à large spectre de la compagnie *Bio-Rad* a été utilisée en guise de référence.

### 7.1.8. Caractérisation cinétique de la hTG2

Les essais cinétiques ont été conduits de la même façon que le test d'activité, utilisant la méthode AL5, précédemment décrit.

Dans chacun des cas, à l'exception du CaCl<sub>2</sub>, une solution mère de la molécule d'intérêt a été préparée via une dissolution dans le DMF, et une concentration finale de 5 % de ce solvant organique se retrouve dans les solutions finales. De plus, pour tous les essais, des échantillons de 1 mL ont été préparés et contiennent 2,5 mU de hTG2. Un triplicata a été effectué pour chacun des essais, et, dans tous les cas, un blanc, sans enzyme, a aussi été évalué en parallèle des échantillons d'intérêt. Aussi, dans le cas des cinétiques de compétition, un échantillon ne contenant pas la molécule évaluée a aussi été préparé, servant de point de référence pour la vitesse de la réaction d'hydrolyse enzymatique du AL5, non-inhibée.

Pour la détermination de la valeur de K<sub>M</sub> pour la molécule de AL5, des concentrations de ce substrat variant entre 13,5 et 432 μM ont été utilisées.

Dans le cas du calcium, la valeur de K<sub>d</sub> a été calculée en retirant le CaCl<sub>2</sub> du tampon normalement utilisé, puis en variant sa concentration, entre de 0,1 à 3 mM. Dans ce cas, une concentration fixe de 55 μM de AL5 a été utilisée pour tous les essais.

De son côté, la valeur de K<sub>M</sub><sup>app</sup>, pour le peptide Ac-PNPQLPF-OH, a été évaluée via une expérience de compétition avec le substrat donneur AL5, précédemment décrite et utilisée par le groupe<sup>66,167</sup>. La concentration du AL5 a été variée entre 30 et 400 μM, tandis que celles utilisées pour le peptide se situent entre 9,8 et 75 μM.

Le même type d'expérience de compétition a été utilisé afin de calculer les constantes d'inhibition, K<sub>i</sub>, des molécules **1.20** et **1.21**. Dans leur cas, des concentrations allant de 2,5 à 10 μM pour la molécule **1.20**, de 25 à 100 μM pour la molécule **1.21** et de 30 à 400 μM pour le AL5, ont été utilisées.

Finalement, pour l'inhibiteur irréversible **1.11**, les valeurs pour la constante d'inhibition et la constante de vitesse d'inactivité, K<sub>I</sub> et k<sub>inact</sub>, ont été déterminées via une analyse de la perte d'activité dépendante du temps<sup>96,168</sup>, précédemment utilisée dans le

groupe<sup>62</sup>, en utilisant des concentrations d'inhibiteur variant entre 9 et 101  $\mu\text{M}$  et une concentration de AL5 fixe de 60  $\mu\text{M}$ . Le suivi de la réaction a été effectué pendant 30 min.

## 7.2. Partie expérimentale du Chapitre 3

Tous les réactifs qui ont été utilisés sont de la plus haute pureté disponible et les produits chimiques et solvants utilisés proviennent des compagnies *Sigma-Aldrich Corporation* et *VWR International*.

Les solvants anhydres employés ont été séchés à l'aide du système *GlassContour System Column* de la compagnie *Pure Process Technology*, tandis que toutes les solutions aqueuses ont été préparées à l'aide d'eau purifiée à l'aide du système *BioCell* de Millipore.

Les molécules **1.21**<sup>116</sup> et **3.4**<sup>117</sup> ont été obtenues en suivant des procédures préalablement décrites par notre groupe, tandis que les molécules **3.1**<sup>172</sup>, **3.7**<sup>174</sup> et **3.22**<sup>184</sup> ont été synthétisées via des méthodes, suivies tel quel, développées et publiées par différents groupes de recherche.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et du carbone ont été enregistrés à l'aide des spectromètres *Bruker AMX400* et *AMX300*.

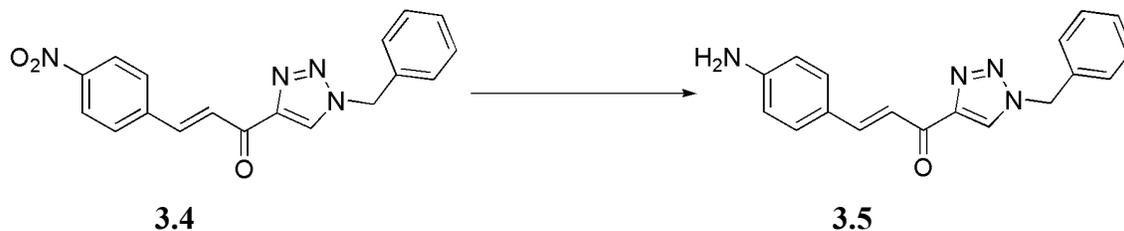
Les spectres de masse haute résolution (SMHR) et les analyses de pureté ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre LC-TOF, tandis que les cinétiques LC-MS ont été menées sur un appareil LC-MSD (Quadrupole), tous deux de la compagnie *Agilent Technologies*. Ces appareils sont situés au Centre régional de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal.

Les essais cinétiques pour la TG2 ont été menés sur un spectrophotomètre UV-vis de type *Cary 100 BIO* en utilisant le substrat donneur AL5<sup>50</sup>, préparé dans notre laboratoire en suivant une procédures antérieurement publiées.

Les points de fusion (non-corrigés) ont été déterminés à l'aide d'un appareil *EZ-Melt* de la compagnie *SRS*, tandis que les analyses infrarouges ont été menées sur un spectrophotomètre *Spectrun One* de la compagnie *Perkin Elmer*.

### 7.2.1. Synthèse

#### (*E*)-3-(4-aminophényl)-1-(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)prop-2-én-1-one (3.5)



Dans un ballon de 10 mL, mis sous azote, ont été ajoutés le composé de départ **3.4** (45 mg, 0,135 mmol), le  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,152 g, 0,675 mmol) ainsi que 1 mL d'éthanol absolu. Le mélange réactionnel a par la suite été chauffé à 70 °C pendant 90 min avant d'être refroidi. Ensuite, 5 mL d'eau glacée ont été ajoutés au mélange qui a subséquemment été neutralisé à l'aide d'une solution de 5 % de  $\text{NaHCO}_3$ . Le produit a été extrait de la phase aqueuse en utilisant  $3 \times 5$  mL d'acétate d'éthyle. La phase organique ainsi récupérée a été lavée avec  $3 \times 5$  mL d'une solution saturée de  $\text{NaCl}$ , avant d'être séchée à l'aide de  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit a été purifié grâce à une chromatographie sur gel de silice (70 : 30 acétate d'éthyle / hexane) permettant l'obtention d'un solide orangé, dans un rendement de 45 %.

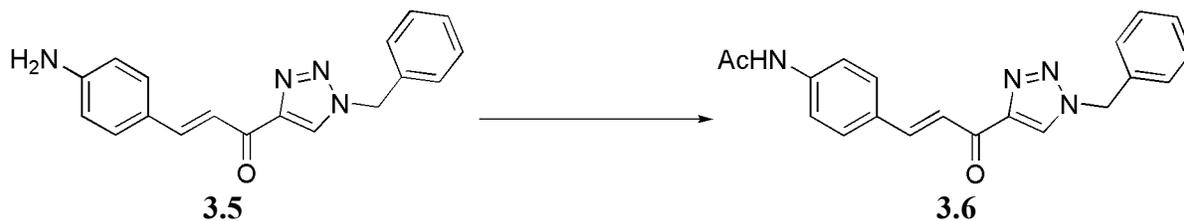
**p.f.** : 135 à 137 °C (déc.).

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 8,06 (s, 1 H), 7,90 (d, 1 H,  $J = 11,9$  Hz), 7,74 (d, 1 H,  $J = 11,8$  Hz), 7,52 (d, 2 H,  $J = 6,4$  Hz), 7,39 (m, 3 H), 7,29 (m, 2 H), 6,67 (d, 2 H,  $J = 6,4$  Hz), 5,58 (s, 2 H), 4,09 (sl, 2 H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 182,81, 149,28, 149,11, 145,19, 133,64, 130,83, 129,15, 128,95, 128,18, 125,97, 124,83, 117,77, 114,64, 54,31.

**SMHR (ESI)** calculé pour  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) : 327,12163, mesuré 327,12193.

***N*-4-((*E*)-3-(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-3-oxoprop-1-ényl)phényl)acétamide (3.6)**



Dans un ballon de 5 mL ont été ajoutés l'amine de départ **3.5** (11 mg, 0,036 mmol), 600  $\mu$ L de DMF ainsi que 400  $\mu$ L d'anhydride acétique. Le mélange réactionnel a par la suite été agité pendant 3 h. Subséquemment, le mélange a été neutralisé à l'aide d'une solution de NaOH 1 M, et le précipité ainsi obtenu a été filtré puis dissous dans l'acétone afin de procéder à une précipitation via l'utilisation d'hexane. Après filtration, un solide jaune vif a été récupéré, dans un rendement de 92 %.

**p.f.** : 216 à 218 °C (déc.).

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 9,43 (s, 1 H), 8,18 (m, 6 H), 7,81 (m, 5 H), 6,13 (s, 2 H), 2,05 (s, 3 H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 181,17, 168,33, 149,52, 149,27, 142,99, 141,49, 135,05, 129,31, 128,40, 128,34, 127,91, 127,88, 127,59, 118,49, 52,73, 24,5.

**SMHR (ESI)** calculé pour  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) : 369,13220, mesuré 369,13267.

#### 4-(azidométhyl)benzoate de méthyle (3.7a)



Dans un ballon de 25 mL ont été ajoutés l'azoture de sodium (0,390 g, 6,0 mmol) ainsi que 1 mL d'eau distillée. Cette solution a été agitée jusqu'à dissolution complète de l'azoture de sodium, puis a été placée sur glace. Une fois refroidie, 1 mL de dichlorométhane a été ajouté, suivi de l'anhydride triflique (0,50 mL, 3,0 mmol). Ce mélange a été agité sur glace pendant 2 h avant que la phase organique ne soit séparée de la phase aqueuse. Une extraction de la phase aqueuse a par la suite été effectuée à l'aide de  $2 \times 1$  mL de dichlorométhane, puis la phase organique ainsi récupérée a été lavée avec  $2 \times 1$  mL de solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ . Cette solution contenant l'azoture de triflate a ensuite été ajoutée à un ballon de 25 mL contenant le sel de départ **3.7** (0,201 g, 1,0 mmol), du  $\text{NaHCO}_3$  (0,168 g, 2,0 mmol), du  $\text{CuSO}_4$  (3,2 mg, 0,02 mmol), ainsi que 2 mL d'eau distillée et du méthanol, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Ce mélange a été agité pendant 16 h, puis le dichlorométhane et le méthanol ont été évaporés sous pression réduite. Après ajout de 10 mL d'acétate d'éthyle, la phase organique a été lavée à l'aide de  $2 \times 2$  mL d'eau distillée et  $1 \times 2$  mL d'une solution saturée de  $\text{NaCl}$ , avant d'être séchée à l'aide de  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Un liquide incolore et transparent a ainsi été obtenu, dans un rendement de 96 %.

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 8,05 (d, 2 H,  $J = 8,3$  Hz), 7,39 (d, 2 H,  $J = 8,2$  Hz), 4,41 (s, 2 H), 3,92 (s, 3 H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 167,63, 141,32, 130,95, 130,79, 128,78, 55,07, 53,09.

### Acide 4-(azidométhyl)benzoïque (3.8a)



Dans un ballon de 25 mL ont été ajoutés l'azoture de sodium (0,390 g, 6,0 mmol) ainsi que 1 mL d'eau distillée. Cette solution a été agitée jusqu'à dissolution complète de l'azoture de sodium, puis a été placée sur glace. Une fois refroidie, 1 mL de dichlorométhane a été ajouté, suivi de l'anhydride triflique (0,50 mL, 3,0 mmol). Ce mélange a été agité sur glace pendant 2 h avant que la phase organique ne soit séparée de la phase aqueuse. Une extraction de la phase aqueuse a par la suite été effectuée à l'aide de  $2 \times 1$  mL de dichlorométhane, puis la phase organique ainsi récupérée a été lavée avec  $2 \times 1$  mL de solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ . Cette solution contenant l'azoture de triflate a ensuite été ajoutée à un ballon de 25 mL contenant l'amine de départ **3.8** (0,151 g, 1,0 mmol), du  $\text{NaHCO}_3$  (0,084 g, 1,0 mmol), du  $\text{CuSO}_4$  (3,2 mg, 0,02 mmol), ainsi que 2 mL d'eau distillée et du méthanol, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Ce mélange a été agité pendant 16 h, puis le dichlorométhane et le méthanol ont été évaporés sous pression réduite. Après ajout de 10 mL d'acétate d'éthyle, la phase organique a été lavée à l'aide de  $2 \times 2$  mL d'eau distillée et  $1 \times 2$  mL d'une solution saturée de  $\text{NaCl}$ , avant d'être séchée à l'aide de  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Un solide blanc a ainsi été obtenu, dans un rendement de 96 %.

**p.f.** : 164 à 166 °C (déc.).

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  (ppm) : 8,04 (d, 2 H,  $J = 8,3$  Hz), 7,45 (d, 2 H,  $J = 8,4$  Hz), 4,45 (s, 2 H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  (ppm) : 168,87, 141,82, 130,63, 128,62, 122,86, 54,45.

#### 4-(azidométhyl)benzènesulfonamide (3.9a)



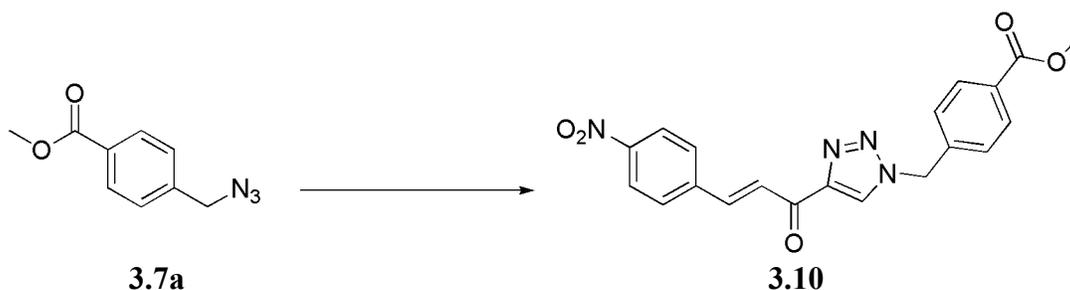
Dans un ballon de 25 mL ont ajoutés l'azoture de sodium (0,390 g, 6,0 mmol) ainsi que 1 mL d'eau distillée. Cette solution a été agitée jusqu'à dissolution complète de l'azoture de sodium, puis a été placée sur glace. Une fois refroidie, 1 mL de dichlorométhane a été ajouté, suivi de l'anhydride triflique (0,50 mL, 3,0 mmol). Ce mélange a été agité sur glace pendant 2 h avant que la phase organique ne soit séparée de la phase aqueuse. Une extraction de la phase aqueuse a par la suite été effectuée à l'aide de  $2 \times 1$  mL de dichlorométhane, puis la phase organique ainsi récupérée a été lavée avec  $2 \times 1$  mL de solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ . Cette solution contenant l'azoture de triflate a ensuite été ajoutée à un ballon de 25 mL contenant l'amine de départ **3.9** (0,223 g, 1,0 mmol), du  $\text{NaHCO}_3$  (0,168 g, 2,0 mmol), du  $\text{CuSO}_4$  (3,2 mg, 0,02 mmol), ainsi que 2 mL d'eau distillée et du méthanol, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Ce mélange a été agité pendant 16 h, puis le dichlorométhane et le méthanol ont été évaporés sous pression réduite. Après ajout de 10 mL de  $\text{NaOH}$  0,25 M, la phase aqueuse a été lavée à l'aide de  $3 \times 2$  mL d'éther diéthylique, puis a été acidifiée à l'aide de  $\text{HCl}$  6 M, jusqu'à  $\text{pH} \sim 1$ . Une extraction de la phase aqueuse a par la suite été effectuée avec  $3 \times 3$  mL d'acétate d'éthyle, avant d'être séchée à l'aide de  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Un solide blanc a ainsi été obtenu, dans un rendement de 93 %.

**p.f.** : 90 à 92 °C.

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  (ppm) : 7,65 (dd, 2 H,  $J = 8,5$  Hz, 1,9 Hz), 7,21 (dd, 2 H,  $J = 8,6$ , 2,0 Hz), 4,18 (s, 2 H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  (ppm) : 144,23, 141,62, 130,07, 128,16, 56,44.

**4-((4-((E)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)méthyl)benzoate de méthyle (3.10)**



Dans un ballon de 10 mL ont été ajoutés l'azoture de départ **3.7a** (95,5 mg, 0,50 mmol), l'ynone **3.1** (100 mg, 0,49 mmol), le CuSO<sub>4</sub> (1,2 mg, 0,005 mmol), 50 µL d'une solution aqueuse 1 M d'ascorbate de sodium ainsi que 2,4 mL de *tert*-butanol et 2,4 mL d'eau distillée. Le mélange réactionnel a ensuite été agité à 75 °C pendant 16 h, puis, après refroidissement, 40 mL d'eau distillée y ont été ajoutés. Une extraction utilisant 3 × 20 mL d'acétate d'éthyle a par la suite été effectuée, puis la phase organique ainsi obtenue a été lavée à l'aide de 1 × 15 mL d'une solution saturée de NaCl, séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie sur gel de silice (50 : 50 acétate d'éthyle / hexane) a permis d'obtenir un solide orangé, dans un rendement de 12 %.

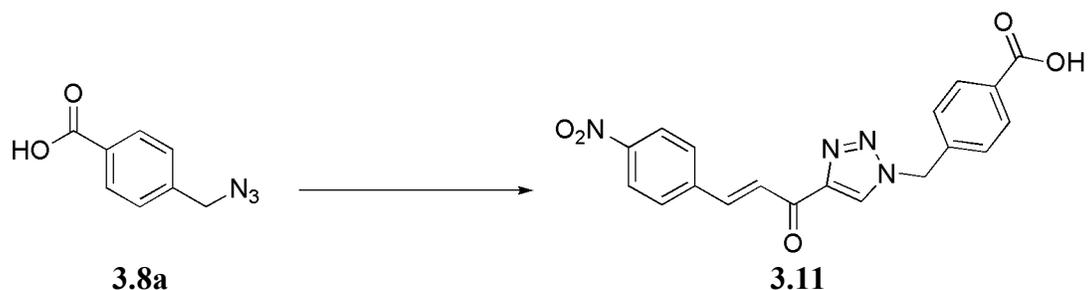
**p.f.** : 189 à 191 °C (déc.).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)** δ (ppm) : 9,13 (s, 1 H), 8,29 (d, 2 H, *J* = 8,6 Hz), 8,11 (d, 2 H, *J* = 8,7 Hz), 7,97 (m, 4 H), 7,48 (d, 2 H, *J* = 8,1 Hz), 5,84 (s, 2 H), 3,85 (s, 3 H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)** δ (ppm) : 182,50, 166,85, 149,27, 148,27, 141,90, 141,77, 141,61, 130,86, 130,74, 130,55, 130,25, 129,26, 127,40, 125,09, 53,81, 53,27.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) : 415,10129, mesuré 415,09984.

**Acide 4-((4-((E)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)méthyl)benzoïque (3.11)**



Dans un ballon de 10 mL ont été ajoutés l'azoture de départ **3.8a** (88,6 mg, 0,50 mmol), l'ynone **3.1** (100 mg, 0,49 mmol), le CuSO<sub>4</sub> (1,2 mg, 0,005 mmol), 50 µL d'une solution aqueuse 1 M d'ascorbate de sodium ainsi que 2,4 mL de *tert*-butanol et 2,4 mL d'eau distillée. Le mélange réactionnel a ensuite été agité à 75 °C pendant 16 h, puis, après refroidissement, 40 mL d'eau distillée y ont été ajoutés. Une extraction utilisant 3 × 20 mL d'acétate d'éthyle a par la suite été effectuée, puis la phase organique ainsi obtenue a été lavée à l'aide de 1 × 15 mL d'une solution saturée de NaCl, séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie sur gel de silice (54 : 45 : 1 acétate d'éthyle / hexane / acide acétique) a permis d'obtenir un solide orangé, dans un rendement de 11 %.

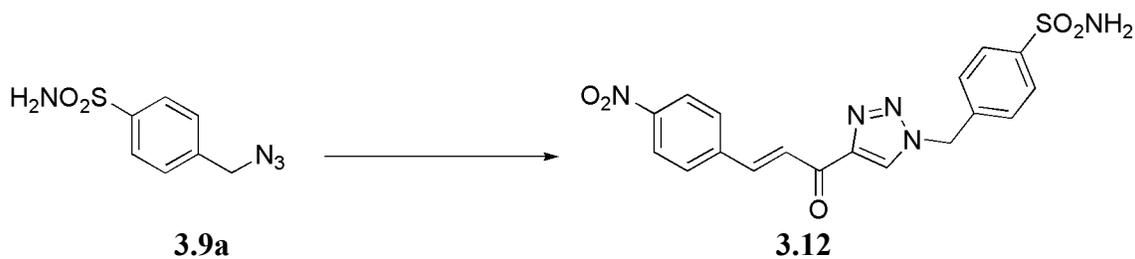
**p.f.** : 208 à 210 °C (déc.).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)** δ (ppm) : 9,13 (s, 1 H), 8,29 (d, 2 H, *J* = 8,6 Hz), 8,11 (d, 2 H, *J* = 8,7 Hz), 7,97 (m, 4 H), 7,48 (d, 2 H, *J* = 8,1 Hz), 5,84 (s, 2 H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)** δ (ppm) : 182,49, 167,94, 149,25, 148,26, 141,88, 141,77, 141,07, 130,97, 130,87, 130,55, 130,21, 129,10, 127,40, 125,09, 53,87.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) : 401,08564, mesuré 401,08608.

**4-((4-((E)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)méthyl)benzènesulfonamide (3.12)**



Dans un ballon de 10 mL ont été ajoutés l'azoture de départ **3.9a** (106 mg, 0,50 mmol), le CuSO<sub>4</sub> (1,2 mg, 0,005 mmol), 50 µL d'une solution aqueuse 1 M d'ascorbate de sodium ainsi que 0,6 mL de *tert*-butanol et 0,6 mL d'eau distillée. Ce mélange a été chauffé à 75 °C, puis une suspension de l'ynone **3.1** (100 mg, 0,49 mmol,) dans 10 mL d'un mélange 50 : 50 *tert*-butanol / eau, y a été ajouté, goutte-à-goutte, sur une période de 45 min. Après l'ajout, le mélange réactionnel a été agité à 75 °C pendant 16 h. Après refroidissement, 140 mL d'eau distillée ont été ajoutés à la solution, et une extraction utilisant 3 × 20 mL d'acétate d'éthyle a été effectuée. Ensuite, la phase organique récupérée a été lavée avec 1 × 20 mL d'une solution saturée de NaCl, séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut a par la suite été dissous dans un minimum d'acétate d'éthyle, et une précipitation à l'aide d'hexane a permis d'obtenir un solide brun rouille, dans un rendement de 72 %.

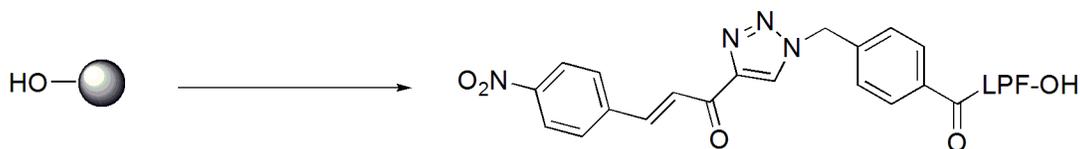
**p.f.** : 154 à 156 °C (déc.).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>6</sub>-acétone)** δ (ppm) : 8,83 (s, 1 H), 8,34 (d, 2 H, *J* = 8,9 Hz), 8,12 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 8,08 (d, 1 H, *J* = 16,1 Hz), 7,97 (d, 1 H, *J* = 16,1 Hz), 7,93 (d, 2 H, *J* = 8,4 Hz), 7,61 (d, 2 H, *J* = 8,5 Hz), 6,72 (s, 2 H), 5,91 (s, 2 H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)** δ (ppm) : 187,66, 155,06, 154,01, 147,90, 147,73, 146,14, 137,25, 136,84, 136,20, 135,58, 133,42, 133,27, 131,16, 60,74.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S ([M+H]<sup>+</sup>) : 414,08667, mesuré 414,08644.

***N*-4-((4-((*E*)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)méthyl)benzoyl)-L-leucinyl-L-prolinyl-L-phénylalanine (3.13)**



Dans un premier temps, la résine de Wang (302 mg, 0,253 mmol) a été agitée en présence de Fmoc-Phe (491 mg, 1,27 mmol), de DIC (196  $\mu$ L, 1,27 mmol), de DMAP (3,1 mg 0,0253 mmol) et de 1,5 mL de DMF pendant 16 h. Après des lavages consécutifs utilisant  $3 \times 7$  mL de DMF,  $3 \times 7$  mL de DCM et  $3 \times 7$  mL d'éther diéthylique, la résine a été séchée à l'aide d'éther diéthylique et un taux d'incorporation de 44 % a été déterminé, de manière spectroscopique, en utilisant une mesure de l'absorbance à 301 nm du complexe formé entre la pipéridine et le dibenzofulvalène lors de la réaction de déprotection du Fmoc effectuée sur un échantillon de la résine

Par la suite, les fonctions hydroxyles n'ayant pas réagi ont été protégées à l'aide d'un groupement acétyle, via l'agitation de la résine en présence de 3 mL d'une solution d'anhydride acétique 40 % (v / v) dans la pyridine pendant 2 h.

Après filtration et des lavages à l'aide de  $3 \times 8$  mL de DMF,  $3 \times 8$  mL de DCM et  $3 \times 8$  mL d'éther diéthylique, la résine a été mélangée avec 3 mL d'une solution de pipéridine 20 % (v / v) dans le DMF pendant 1 h, afin de procéder à la déprotection du groupement Fmoc, en préparation au greffage de l'acide aminé subséquent. Suite à la filtration et aux lavages, utilisant  $3 \times 8$  mL de DMF,  $3 \times 8$  mL de DCM et  $3 \times 8$  mL d'éther diéthylique, un test de Kaiser positif a permis de s'assurer, qualitativement, que la déprotection s'est bel et bien effectuée.

Ensuite, chaque acide aminé (0,28 mmol) protégé à l'aide d'un Fmoc a été couplé à la partie C-terminale de l'acide aminé exigé dans la séquence, et préalablement greffé à la résine et déprotégé, via l'utilisation de HOBt (38 mg, 0,28 mmol) et de DIC (43  $\mu$ L, 0,28 mmol) dans 1,5 mL de DMF. Après agitation de la résine pendant  $2 \times 30$  min pour chacun des acides aminés, suivie, à chaque fois, de lavages successifs utilisant  $3 \times 8$  mL de DMF,  $3 \times 8$  mL de

DCM et  $3 \times 8\text{ mL}$  d'éther diéthylique, un test de Kaiser négatif a permis de s'assurer, qualitativement, que le couplage a été effectué jusqu'à complétion.

De son côté, la formation de l'azoture sur résine a été effectuée en utilisant du  $\text{CuSO}_4$  (1,1 mg, 0,04 mmol) et du  $\text{NaHCO}_3$  (16,8 mg, 0,20 mmol) dissous dans 0,2 mL d'eau distillée, puis cette solution a été ajoutée à la résine préalablement mise en présence de 0,5 mL de DMF, de 1,2 mL de dichlorométhane et d'azoture de triflate (0,33 mmol). Ce mélange a été agité pendant 16 h, puis, après avoir effectué la filtration et les lavages précédemment décrits, un test de Kaiser négatif jumelé à l'obtention d'une bande infrarouge à  $2100\text{ cm}^{-1}$  (pastille de KBr utilisant quelques billes de résine) a permis de s'assurer de la présence de l'azoture sur la résine.

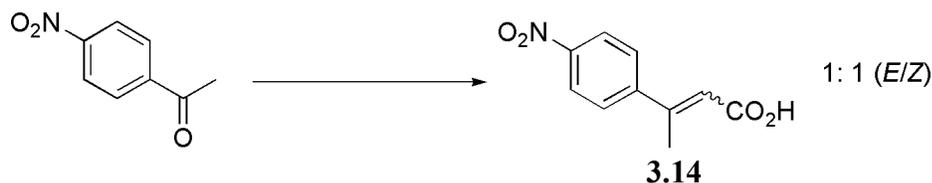
Pour ce qui est de la cycloaddition, l'ynone **3.1** (56 mg, 0,28 mmol) a été dissoute dans 1,5 mL de DMF, puis cette solution a été ajoutée à la résine, tout comme 25  $\mu\text{L}$  d'une solution 1 M d'ascorbate de sodium et le  $\text{CuSO}_4$  (1,1 mg, 0,04 mmol), préalablement dissous dans 25  $\mu\text{L}$  d'eau distillée. Ce mélange a été agité pendant 16 h à  $70\text{ }^\circ\text{C}$  avant qu'une filtration et les lavages habituels soient réalisés. Dans ce cas, la disparition totale de la bande infrarouge à  $2100\text{ cm}^{-1}$  a permis de s'assurer de la réalisation complète de la réaction.

Finalement, la libération du produit de la résine a été effectuée en ajoutant 2,5 mL d'acide trifluoroacétique ainsi que 2,5 mL de dichlorométhane à la résine, qui a par la suite été agitée pendant 2h. Suite à la filtration et au lavage de la résine à l'aide de  $3 \times 8\text{ mL}$  de dichlorométhane, le mélange a été évaporé à sec, sous pression réduite. Après dissolution du produit brut dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'acétone permettant une solubilisation complète, une précipitation à l'éther diéthylique a été effectuée. Ceci a permis d'obtenir, après filtration, un solide blanc, dans un rendement global de 84 %, basé sur le taux d'incorporation initial du premier acide aminé. Aucune purification subséquente n'a été effectuée.

**SMHR (ESI)** calculé pour  $\text{C}_{39}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_8$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) : 758,29088, mesuré 758,29278.

**Pureté** : 88,6 % évaluée par LC-MS en utilisant l'aire sous la courbe du spectre de masse obtenu après une séparation utilisant une colonne Gemini et un gradient continu, sur 8 min, allant de 40 % à 80 % d'acétonitrile dans l'eau additionnée de 0,1 % d'acide formique.

### Acide $\beta$ -méthyl-*p*-nitrocinnamique (3.14)



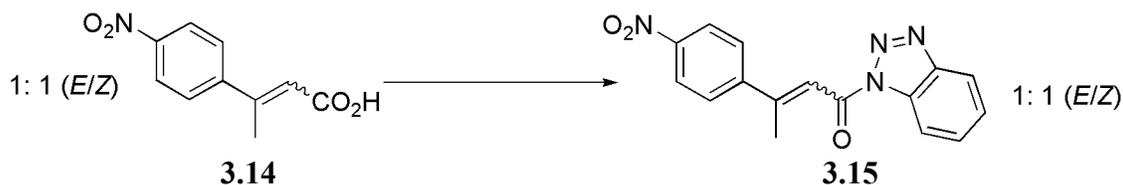
Dans un ballon de 50 mL, mis sous N<sub>2</sub>, ont été placés l'hydrure de sodium (0,247 g, 10,3 mmol) ainsi que 4 mL de THF anhydre. Par la suite, le triéthylphosphonoacétate (0,882 mL, 4,4 mmol) a été ajouté goutte-à-goutte sur une période de 45 min, avant qu'une solution du 4-nitroacétophénone (4,96 g, 30,0 mmol) dans 5 mL de THF anhydre ne soit introduite dans le mélange réactionnel, lequel a subséquemment été chauffé à reflux pendant 16 h. Suite au refroidissement, 30 mL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés à la solution, et un lavage avec 3 × 10 mL d'une solution saturée de NaCl a été effectué. La phase organique ainsi obtenue a été séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut obtenu a immédiatement été dissous dans 6 mL de méthanol et une solution de carbonate de potassium (0,870 g, 6,3 mmol) dans 3 mL d'eau distillée, y a été ajoutée. Ce mélange a été porté à reflux pendant 4 h avant que le méthanol ne soit évaporé sous pression réduite. Par la suite, 10 mL d'une solution de NaOH 1 M ont été introduits dans le mélange et un lavage de la phase aqueuse a été effectué à l'aide de 3 × 8 mL d'acétate d'éthyle. Après acidification de la phase aqueuse jusqu'à pH ~1, via l'utilisation d'une solution de HCl 1 M, une extraction employant 3 × 8 mL d'acétate d'éthyle a été réalisée, suite à quoi la phase organique ainsi recueillie a été séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut récupéré a par la suite été dissous dans l'acétate d'éthyle et une précipitation dans l'hexane a été effectuée, permettant d'obtenir un solide blanc cassé, dans un rendement global de 9 %.

**p.f.** : 168 à 170 °C.

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) : 11,65 (sl, 2 H), 8,27 (d, 4 H,  $J = 8,8$  Hz), 7,65 (d, 4 H,  $J = 8,9$  Hz), 6,23 (s, 2 H), 2,63 (s, 6 H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) : 171,44, 171,15, 155,42, 147,88, 147,78, 126,99, 123,49, 118,90, 20,45, 17,98.

**(E/Z)- $\beta$ -méthyl-*p*-nitrocinnamoylbenzotriazolamide (3.15)**



Dans un ballon de 25 mL ont été dissous, dans 10 mL de dichlorométhane additionné d'une goutte de DMF, l'acide carboxylique **3.14** (150 mg, 0,72 mmol) ainsi que le chlorure d'oxalyle (0,13 mL, 1,44 mmol). Cette solution a été agitée à reflux pendant 2 h, puis une évaporation à sec, sous pression réduite, a été effectuée. Le produit brut obtenu a été trituré dans l'hexane, filtré, et a été utilisé tel quel par la suite, où, dans une première étape, ont été dissous, dans un ballon de 25 mL placé sous N<sub>2</sub>, le benzotriazole (95 mg, 0,80 mmol), le DMAP (18 mg, 0,15 mmol) et la triéthylamine (0,2 mL, 1,43 mmol) dans 5 mL de THF anhydre. Ensuite, le produit brut obtenu a été dissous, dans un second ballon de 25 mL placé sous N<sub>2</sub>, dans 10 mL de THF anhydre, puis, la solution contenant le benzotriazole y a été introduite. Ce mélange réactionnel a été agité pendant 16 h, avant que 100 mL d'acétate d'éthyle y soient ajoutés. La phase organique a successivement été lavée à l'aide de 3  $\times$  20 mL d'une solution 1 M de HCl, de 3  $\times$  20 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium et de 1  $\times$  20 mL d'une solution saturée de NaCl. Par la suite, elle a été séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut ainsi obtenu a subséquemment été trituré dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'acétonitrile, avant d'être filtré, permettant d'obtenir un solide jaune, dans un rendement global de 42 %.

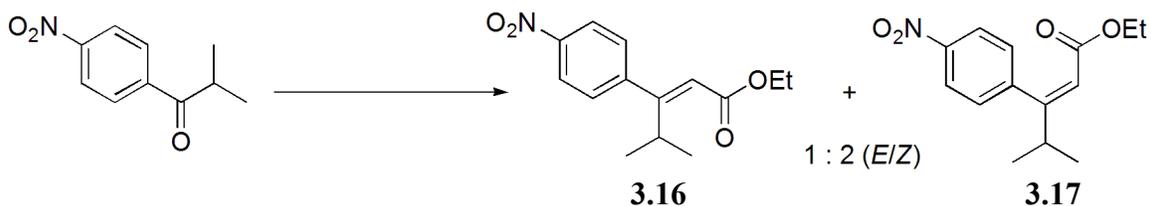
**p.f.** : 199 à 201 °C.

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 8,36 (m, 6 H), 8,28 (d, 2 H,  $J = 8,4$  Hz), 8,02 (d, 4 H,  $J = 8,6$  Hz), 7,82 (t, 2 H,  $J = 7,7$  Hz), 7,76 (s, 2 H), 7,65 (t, 2 H,  $J = 7,6$  Hz), 2,78 (s, 6 H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 162,85, 157,57, 148,13, 147,39, 145,63, 130,93, 130,84, 128,17, 126,64, 124,03, 120,20, 117,83, 114,37, 18,70, 18,61.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) : 331,08122, mesuré 331,08016.

**(E/Z)- $\beta$ -isopropyl-*p*-nitrocinnamoate d'éthyle (3.16 et 3.17)**



Dans un ballon de 50 mL, mis sous N<sub>2</sub>, ont été placés l'hydrure de sodium (0,617 g, 25,7 mmol) ainsi que 10 mL de THF anhydre. Par la suite, le triéthylphosphonoacétate (4,48 mL, 22,3 mmol) a été ajouté goutte-à-goutte sur une période de 45 min, avant qu'une solution du 2-méthyl-1-(4-nitrophényl)propan-1-one (4,4 g, 22,8 mmol) dans 12 mL de THF anhydre ne soit introduite dans le mélange réactionnel, lequel a subséquemment été chauffé à reflux pendant 16 h. Suite au refroidissement, 75 mL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés à la solution, et un lavage avec 3 × 25 mL d'une solution saturée de NaCl a été effectué. La phase organique ainsi obtenue a été séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie sur gel de silice (95 : 5 hexane / acétate d'éthyle) a permis l'obtention du composé **3.16** de manière pure, tandis que le composé **3.17** était toujours contaminé par la cétone de départ. Néanmoins, il fut utilisé tel quel dans la prochaine étape de synthèse. Un solide brunâtre a été récupéré pour le composé **3.16**, tandis qu'une huile jaunâtre a été isolée pour le composé **3.17**, le tout dans un rendement global de 67 %.

Pour le composé **3.16**

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) : 8,23 (dt, 2 H,  $J = 8,9, 2,3$  Hz), 7,39 (dt, 2 H,  $J = 8,9, 2,3$  Hz), 5,72 (s, 1 H), 4,24 (q, 2 H,  $J = 7,1$  Hz), 4,16 (sept, 1 H,  $J = 7,0$  Hz), 1,33 (t, 3 H,  $J = 7,1$  Hz), 1,10 (d, 6 H,  $J = 7,0$  Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) : 165,95, 164,70, 147,76, 147,73, 129,12, 123,54, 120,21, 60,66, 29,81, 21,66, 14,64.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) : 286,10498, mesuré 286,10521.

Pour le composé 3.17

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) :** 8,34 (d, 1,2 H,  $J = 8,9$  Hz, cétone), 8,25 (dt, 2 H,  $J = 8,8, 2,0$  Hz, ester), 8,12 (d, 1,2 H,  $J = 8,9$  Hz, cétone), 7,28 (dt, 2 H,  $J = 8,7, 2,0$  Hz, ester), 5,96 (s, 1 H, ester), 4,00 (q, 2 H,  $J = 6,9$  Hz, ester), 3,56 (sept, 0,6 H,  $J = 7,0$  Hz, cétone), 2,67 (sept, 1 H,  $J = 7,1$  Hz, ester), 1,27 (t, 3 H,  $J = 6,9$  Hz, ester) 1,12 (m, 9,6 H, cétone et ester).

### Acide (*E*)- $\beta$ -isopropyl-*p*-nitrocinnamique (3.18)



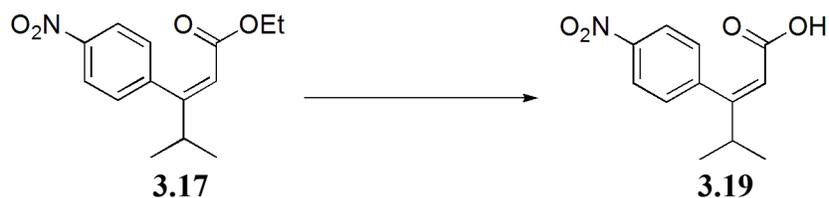
Dans un ballon de 50 mL a été dissous l'ester **3.16** (1,35 g, 5,1 mmol) dans 15 mL de méthanol. D'un autre côté, une solution de carbonate de potassium (1,16 g, 8,2 mmol) dans 4 mL d'eau distillée a été préparée, puis ajoutée, goutte-à-goutte, à la solution d'ester. Une fois l'addition terminée, le mélange a été chauffé à reflux pendant 4 h avant que le méthanol ne soit évaporé sous pression réduite. Ensuite, 30 mL d'eau distillée ont été ajoutés au mélange et un lavage de la phase aqueuse à l'aide de  $3 \times 10$  mL de dichlorométhane a été effectué. Après acidification, jusqu'à l'obtention d'un pH  $\sim 1$  en utilisant une solution aqueuse de 1 M de HCl, une extraction à l'aide de  $3 \times 10$  mL d'acétate d'éthyle a été effectuée. La phase organique ainsi récupérée a été séchée via l'utilisation de  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, puis évaporée sous pression réduite, permettant l'obtention d'un solide blanc, dans un rendement de 65 %.

**p.f.** : 186 à 188 °C.

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 8,24 (d, 2 H,  $J = 8,7$  Hz), 7,39 (d, 2 H,  $J = 8,7$  Hz), 5,76 (s, 1 H), 4,18 (sept, 1 H,  $J = 7,1$  Hz), 1,10 (d, 6 H,  $J = 7,2$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 171,00, 167,52, 147,46, 146,91, 128,59, 123,20, 118,96, 29,56, 21,23.

### Acide (*Z*)- $\beta$ -isopropyl-*p*-nitrocinnamique (3.19)



Dans un ballon de 50 mL a été dissous l'ester **3.17** (2,59 g, 9,8 mmol) dans 15 mL de méthanol. D'un autre côté, une solution de carbonate de potassium (2,22 g, 16,1 mmol) dans 7 mL d'eau distillée a été préparée, puis ajoutée, goutte-à-goutte, à la solution d'ester. Une fois l'addition terminée, le mélange a été chauffé à reflux pendant 4 h avant que le méthanol ne soit évaporé sous pression réduite. Ensuite, 25 mL d'eau distillée ont été ajoutés au mélange et un lavage de la phase aqueuse à l'aide de  $3 \times 10$  mL d'acétate d'éthyle a été effectué. Après acidification, jusqu'à l'obtention d'un pH  $\sim 1$  en utilisant une solution aqueuse de 1 M de HCl, une extraction à l'aide de  $3 \times 10$  mL d'acétate d'éthyle a été effectuée. La phase organique ainsi récupérée a été séchée via l'utilisation de  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, puis évaporée sous pression réduite, permettant l'obtention d'un solide orangé, dans un rendement de 69 %.

**p.f.** : 132 à 134 °C.

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 8,20 (d, 2 H,  $J = 8,7$  Hz), 7,24 (d, 2 H,  $J = 8,7$  Hz), 5,91 (s, 1 H), 2,66 (sept, 1 H,  $J = 6,8$  Hz), 1,09 (d, 6 H,  $J = 6,8$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 171,27, 166,76, 148,07, 147,52, 128,99, 123,93, 116,93, 38,27, 21,70.

**(E)- $\beta$ -isopropyl-*p*-nitrocinnamoylbenzotriazolamide (3.20)**



Dans un ballon de 25 mL ont été dissous, dans 15 mL de dichlorométhane additionné d'une goutte de DMF, l'acide carboxylique **3.18** (300 mg, 1,28 mmol) ainsi que le chlorure d'oxalyle (0,22 mL, 1,44 mmol). Cette solution a été agitée à reflux pendant 2 h, puis une évaporation à sec, sous pression réduite, a été effectuée. Le produit brut obtenu a été trituré dans l'hexane, filtré, et a été utilisé tel quel par la suite, où, dans une première étape, ont été dissous, dans un ballon de 50 mL placé sous  $\text{N}_2$ , le benzotriazole (167 mg, 1,40 mmol), le DMAP (31 mg, 0,25 mmol) et la triéthylamine (0,36 mL, 2,55 mmol) dans 10 mL de THF anhydre. Ensuite, le produit brut obtenu a été dissous, dans un second ballon de 50 mL placé sous  $\text{N}_2$ , dans 20 mL de THF anhydre, puis, la solution contenant le benzotriazole y a été introduite. Ce mélange réactionnel a été agité pendant 16 h, avant que 150 mL de dichlorométhane y soient ajoutés. La phase organique a successivement été lavée à l'aide de  $3 \times 20$  mL d'une solution 1 M de HCl, de  $3 \times 20$  mL d'une solution saturée de carbonate de sodium et de  $1 \times 20$  mL d'une solution saturée de NaCl. Par la suite, elle a été séchée à l'aide de  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut ainsi obtenu a subséquemment été trituré dans un mélange de dichlorométhane et d'acétonitrile, avant d'être filtré, permettant d'obtenir un solide de couleur crème, dans un rendement global de 71 %.

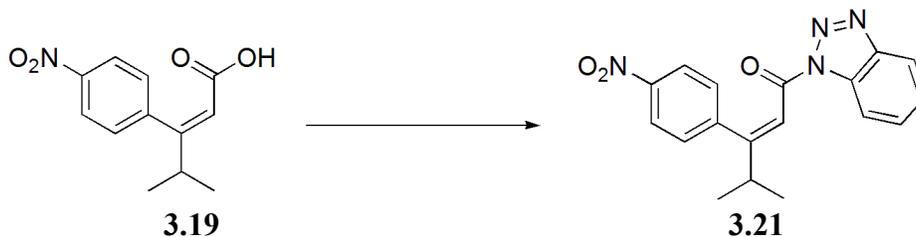
**p.f.** : 131 à 133 °C.

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 8,34 (m, 3 H), 8,27 (d, 1 H,  $J = 8,3$  Hz), 7,81 (t, 1 H,  $J = 7,7$  Hz), 7,70 (d, 2 H,  $J = 8,8$  Hz), 7,65 (t, 1 H,  $J = 8,2$  Hz), 7,23 (s, 1 H), 4,15 (sept, 1 H,  $J = 7,0$  Hz), 1,18 (d, 6 H,  $J = 7,0$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 169,84, 163,47, 148,62, 147,74, 146,80, 132,12, 130,27, 127,90, 124,74, 121,43, 119,46, 115,57, 31,34, 22,27.

**SMHR (ESI)** calculé pour  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) : 359,11146, mesuré 359,11006.

**(Z)- $\beta$ -isopropyl-*p*-nitrocinnamoylbenzotriazolamide (3.21)**



Le composé **3.21** a été préparé en utilisant les mêmes quantités et le même protocole que ce qui est présenté pour la préparation de la molécule **3.20**. Dans ce cas, un solide de couleur rouille a été obtenu, dans un rendement de 62 %.

**p.f.** : 160 à 162 °C.

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 8,26 (m, 3 H), 8,06 (d, 1 H,  $J = 8,2$  Hz), 7,69 (t, 1 H,  $J = 7,5$  Hz), 7,59 (m, 3 H), 7,46 (s, 1 H), 2,95 (sept, 1 H,  $J = 6,8$  Hz), 1,16 (d, 6 H,  $J = 6,8$  Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 169,02, 163,08, 147,78, 146,36, 142,86, 131,53, 129,57, 127,38, 124,06, 120,92, 116,04, 115,07, 38,06, 21,51.

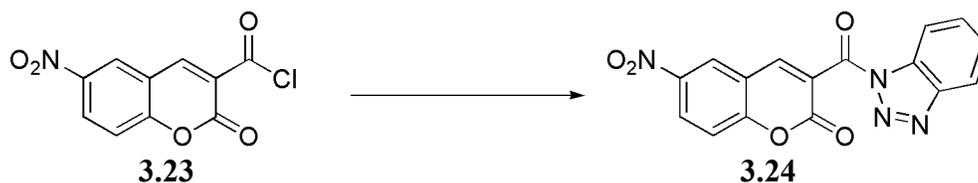
**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) : 359,11146, mesuré 359,10996.

**Chlorure de 6-nitro-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyle (3.23)**



Dans un ballon de 25 mL ont été ajoutés le dérivé de coumarine **3.22** (600 mg, 2,55 mmol) ainsi que 10 mL de chlorure de thionyle. Le mélange réactionnel a été agité à reflux pendant 3 h, puis a été évaporé à sec, sous pression réduite. Le produit obtenu a été trituré dans l'hexane puis filtré, permettant l'obtention d'un solide jaunâtre, dans un rendement de 97 %. Le produit a été utilisé tel quel, sans purification ou caractérisation plus approfondies.

### 6-nitro-2-oxo-2H-chromène-3-benzotriazolamide (3.24)



Dans un ballon de 25 mL placé sous  $N_2$ , ont été ajoutés le chlorure d'acyle **3.23** (300 mg, 1,18 mmol), le benzotriazole (155 mg, 1,30 mmol) ainsi que 10 mL de dichlorométhane anhydre et la triéthylamine (0,49 mL, 3,54 mmol). Le mélange réactionnel a été agité pendant 16 h avant que 30 mL de dichlorométhane y soient ajoutés. Une série de lavages ont été effectuées à l'aide de  $3 \times 15$  mL d'une solution saturée de carbonate de sodium,  $3 \times 15$  mL d'une solution 1 M de HCl ainsi que  $1 \times 15$  mL d'une solution saturée de NaCl, avant que la phase organique ne soit séchée via l'utilisation de  $MgSO_4$ , filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut ainsi obtenu a finalement été trituré à l'hexane et le surnageant a été retiré, délicatement, à la pipette Pasteur, avant que le produit ne soit séché pendant 16 h sous vide, permettant d'obtenir un solide beige, avec un rendement de 6 %.

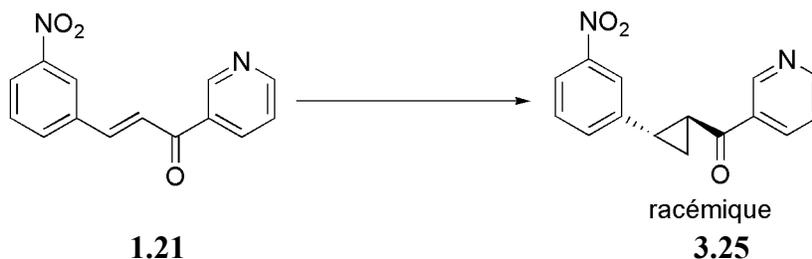
**p.f.** : 213 à 215 °C (déc.).

**RMN  $^1H$  (300 MHz,  $d_6$ -DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 8,96 (m, 2 H), 8,59 (dd, 1 H,  $J = 9,2, 2,8$  Hz), 8,33 (d, 2 H,  $J = 9,1$  Hz), 7,89 (t, 1 H,  $J = 8,1$  Hz), 7,80 (d, 1 H,  $J = 9,2$  Hz), 7,69 (t, 1 H,  $J = 8,3$  Hz).

**RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $d_6$ -DMSO)**  $\delta$  (ppm) : 163,32, 158,92, 157,74, 148,06, 146,80, 145,37, 132,77, 131,79, 130,03, 128,54, 127,33, 124,11, 121,71, 119,60, 119,31, 115,10.

**SMHR (ESI)** calculé pour  $C_{16}H_8N_4O_5$  ( $[M+Na]^+$ ) : 359,03869, mesuré 359,03741.

**trans-2-(3-nitrophényl)cyclopropyl(pyridin-3-yl)méthanone (3.25)**



Dans un ballon, placé sous N<sub>2</sub>, ont été ajoutés l'iodure de triméthylsulfonium (322 mg, 1,46 mmol), l'hydrure de sodium (35 mg, 1,46 mmol) ainsi que 5 mL de DMSO. Ce mélange a été agité pendant 1 h avant qu'y soit ajoutée une solution de l'azachalcone **1.21** (300 mg, 1,18 mmol) préalablement dissous dans 5 mL de DMSO. Une fois l'addition complétée, le mélange réactionnel a été agité à 50 °C pendant 1 h. Après le refroidissement, 30 mL d'eau ainsi que 5 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium ont été ajoutés à la solution et une extraction, utilisant 3 × 15 mL de dichlorométhane a été effectuée. La phase organique ainsi récupérée a par la suite été lavée avec 3 × 10 mL d'eau distillée avant d'être séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie sur gel de silice (50 : 50 toluène / acétate d'éthyle) a permis l'obtention d'un solide blanc cassé, dans un rendement de 52 %.

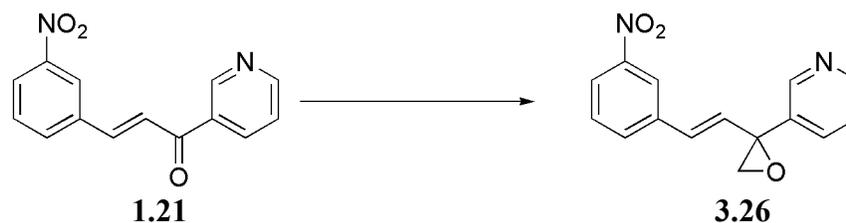
**p.f.** : 127 à 129 °C.

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) : 9,25 (d, 1 H, *J* = 1,4 Hz), 8,82 (dd, 1 H, *J* = 4,7, 1,5 Hz), 8,28 (dt, 1 H, *J* = 8,0, 1,9 Hz), 8,12 (dt, 1 H, *J* = 7,9, 1,3 Hz), 8,02 (s, 1 H), 7,50 (m, 3 H), 2,97 (m, 1 H), 2,89 (m, 1 H), 2,04 (m, 1 H), 1,71 (m, 1 H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)** δ (ppm) : 197,02, 154,08, 149,99, 148,96, 142,61, 135,84, 133,28, 132,95, 130,02, 124,10, 122,28, 121,10, 29,85, 29,46, 20,24.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) : 269,09207, mesuré 269,09277.

### 3-(2-(3-nitrostyryl)oxiran-2-yl)pyridine (3.26)



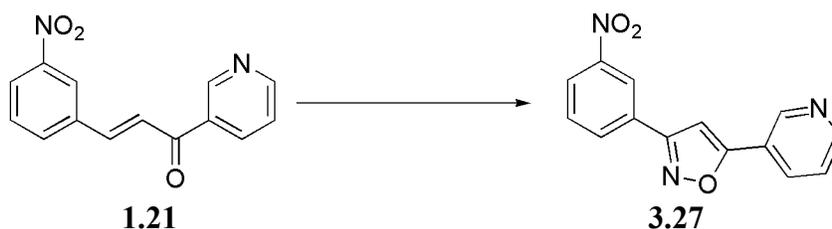
Dans un ballon, placé sous N<sub>2</sub>, ont été ajoutés l'iodure de triméthylsulfonium (221 mg, 1,10 mmol), l'hydrure de sodium (24 mg, 1,00 mmol) ainsi que 7 mL de DMSO. Ce mélange a été agité pendant 1 h avant qu'y soit ajoutée une solution de l'azachalcone **1.21** (254 mg, 1,00 mmol) préalablement dissous dans 7 mL de DMSO. Une fois l'addition complétée, le mélange réactionnel a été agité pendant 1 h supplémentaire, puis 35 mL d'eau ainsi que 5 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium ont été ajoutés à la solution. Une extraction, utilisant 3 × 15 mL de dichlorométhane a été effectuée, et, par la suite, la phase organique ainsi récupérée a été lavée avec 3 × 10 mL d'eau distillée avant d'être séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie sur gel de silice (70 : 30 dichlorométhane / acétate d'éthyle) a permis l'obtention d'une huile orangée, dans un rendement de 58 %.

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) : 8,74 (s, 1 H), 8,62 (d, 1 H, *J* = 3,6 Hz), 8,21 (s, 1 H), 8,10 (d, 1 H, *J* = 8,2 Hz), 7,79 (d, 1 H, *J* = 7,9 Hz), 7,65 (d, 1 H, *J* = 7,7 Hz), 7,49 (t, 1 H, *J* = 7,9 Hz), 7,36 (dd, 1 H, *J* = 7,7, 4,9 Hz), 6,60 (d, 1 H, *J* = 16,0 Hz), 6,52 (d, 1 H, *J* = 16,0 Hz), 3,27 (d, 1 H, *J* = 5,4 Hz), 3,17 (d, 1 H, *J* = 5,4 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) : 149,98, 149,13, 148,96, 137,94, 135,21, 133,79, 132,87, 132,36, 131,60, 130,07, 123,81, 123,20, 121,52, 58,89, 57,51.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) : 269,09207, mesuré 269,09269.

### 3-(3-(3-nitrophényl)isoxazol-5-yl)pyridine (3.27)



Dans un ballon de 25 mL ont été ajoutés le *N*-hydroxy-4-toluènesulfonamide (281 mg, 1,50 mmol) ainsi que 1,2 mL de méthanol et 0,2 mL d'eau distillée. Par la suite, du carbonate de potassium (222 mg, 1,6 mmol) a été ajouté à la solution, tandis, qu'en parallèle, une solution de l'azachalcone **1.21** (50,8 mg, 0,20 mmol) dans 0,6 mL de méthanol et 1 mL de DMF a été préparée. Celle-ci a été ajoutée à la solution basique de *N*-hydroxy-4-toluènesulfonamide, puis le mélange réactionnel a été chauffé à 40 °C pendant 24 h. À ce moment, une deuxième portion de carbonate de potassium (111 mg, 0,80 mmol) a été ajoutée au mélange, qui a ensuite été chauffé à 60 °C pour 10 h supplémentaires. Après refroidissement, 40 mL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés afin de procéder au lavage de la phase organique à l'aide de 3 × 10 mL d'eau distillée et de 1 × 10 mL d'une solution saturée de NaCl. À ce stade, la phase organique a été séchée en utilisant du MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Finalement, une précipitation dans l'hexane a été effectuée, permettant d'obtenir un solide orangé, dans un rendement de 41 %.

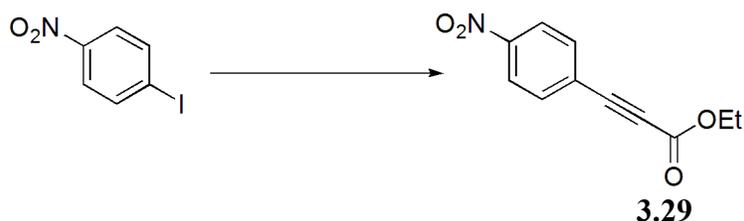
**p.f.** : 152 à 154 °C.

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) : 8,83 (s, 1 H), 8,64 (d, 1 H, *J* = 4,2 Hz), 8,19 (s, 1 H), 8,11 (d, 1 H, *J* = 8,1 Hz), 7,75 (d, 1 H, *J* = 7,8 Hz), 7,61 (d, 1 H, *J* = 7,6 Hz), 7,44 (t, 1 H, *J* = 7,9 Hz), 7,34 (dd, 1 H, *J* = 7,7, 4,5 Hz), 6,45 (s, 1 H).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)** δ (ppm) : 168,43, 163,62, 153,01, 149,79, 148,66, 141,58, 134,78, 133,21, 132,89, 130,02, 123,96, 121,24, 119,35, 96,33.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) : 268,07167, mesuré 268,07154.

### 3-(4-nitrophényl)propylolate d'éthyle (3.29)



Dans un ballon de 25 mL, placé sous N<sub>2</sub>, ont été ajoutés le 1-iodo-4-nitrobenzène (623 mg, 2,50 mmol), le propylolate d'éthyle (1,02 mL, 10,0 mmol) ainsi que 10 mL de THF anhydre et préalablement dégazé. Par la suite, le chlorure de bis(triphénylphosphine)palladium (II) (35 mg, 0,05 mmol), l'iodure de cuivre (I) (19 mg, 0,10 mmol) ainsi que le carbonate de potassium (691 mg, 5,00 mmol) ont été introduits dans le mélange. Ce dernier a par la suite été chauffé à reflux pendant 5 h, en prenant soin de rajouter les quantités mentionnées précédemment du complexe de palladium et d'iodure de cuivre, toutes les 2 h. Une fois la période de chauffage terminée, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le produit brut ainsi obtenu a été dilué dans 40 mL d'éther diéthylique. La phase organique a par la suite été lavée en utilisant 3 × 10 mL d'eau distillée, avant d'être séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie sur gel de silice (50 : 50 dichlorométhane / hexane) a permis l'obtention d'un solide de couleur crème, dans un rendement de 44 %.

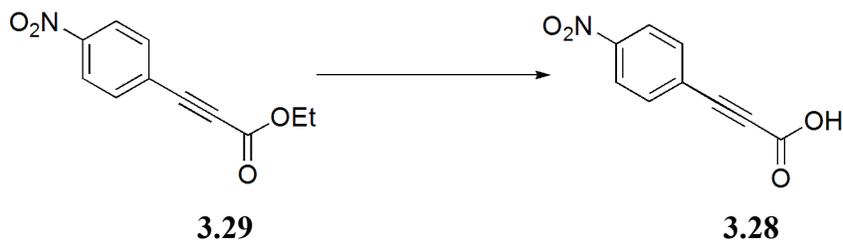
**p.f.** : 124 à 126 °C.

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) : 8,27 (dt, 2 H, *J* = 8,9, 2,0 Hz), 7,77 (dt, 2 H, *J* = 8,9, 2,0 Hz), 4,35 (q, 2 H, *J* = 7,1 Hz), 1,39 (t, 3 H, *J* = 7,1 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) : 153,71, 148,89, 134,09, 126,73, 124,16, 84,63, 83,12, 63,01, 14,45.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) : 220,06043, mesuré 220,06012.

### Acide 3-(4-nitrophényl)propynoïque (3.28)



Dans un ballon de 25 mL a été dissous l'ester **3.29** (239 mg, 1,09 mmol) dans 5 mL d'acétone. À cette solution a été ajouté 1 mL d'eau distillée, puis l'hydroxyde de lithium (52 mg, 2,17 mmol) avant que le mélange réactionnel ne soit agité pendant 16 h. Par la suite, 20 mL d'eau distillée ainsi que 5 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium y ont été ajoutés, et la phase aqueuse a été lavée à l'aide de  $3 \times 7$  mL de dichlorométhane. Une acidification de la phase aqueuse a ensuite été effectuée, jusqu'à un pH  $\sim 1$ , en utilisant une solution 1 M de HCl, suite à quoi une extraction a été réalisée à l'aide de  $3 \times 10$  mL d'acétate d'éthyle. La phase organique ainsi récupérée a subséquemment été avée avec  $1 \times 10$  mL d'une solution saturée de NaCl avant d'être séchée via l'utilisation de  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Un solide de couleur crème a ainsi été récupéré, dans un rendement de 90 %.

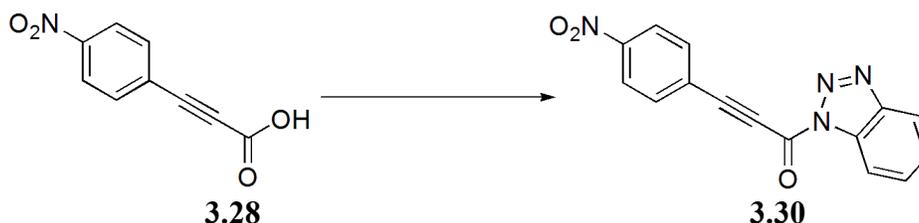
**p.f.** : 165 à 167 °C (déc.).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 8,21 (dt, 2 H,  $J = 9,0, 2,1$  Hz), 7,71 (dt, 2 H,  $J = 9,0, 2,1$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 154,79, 148,98, 133,85, 126,56, 123,88, 84,31, 82,30.

**SMHR (ESI)** calculé pour  $\text{C}_9\text{H}_5\text{NO}_4$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) : 192,02913, mesuré 192,02870.

**1-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)-3-(4-nitrophényl)prop-2-yn-1-one (3.30)**



Dans un ballon de 10 mL, placé sous N<sub>2</sub>, ont été insérés le benzotriazole (100 mg, 0,84 mmol), le chlorure de thionyle (15,3 µL, 0,21 mmol) ainsi que 1 mL de dichlorométhane anhydre. Cette solution a été agitée 30 min à 25 °C avant que l'acide carboxylique **3.28** (40 mg, 0,21 mmol) y soit ajouté. Le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h supplémentaires, avant que le précipité formé pendant la réaction ne soit filtré et lavé à l'aide de dichlorométhane. La phase organique ainsi récupérée a ensuite été lavée en utilisant 3 × 2 mL d'une solution 2 M de NaOH et 1 × 2 mL d'une solution saturée de NaCl, avant d'être séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Un solide beige a ainsi été récupéré, dans un rendement de 51 %.

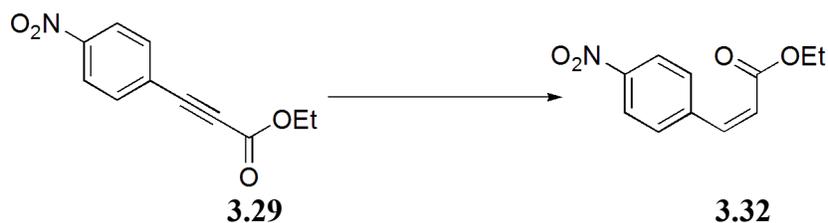
**p.f.** : 214 à 216 °C (déc.).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)** δ (ppm) : 8,38 (d, 2 H, *J* = 8,9 Hz), 8,33 (d, 1 H, *J* = 8,3 Hz), 8,25 (d, 1 H, *J* = 8,2 Hz), 8,12 (d, 2 H, *J* = 8,9 Hz), 7,86 (t, 1 H, *J* = 7,7 Hz), 7,69 (t, 1 H, *J* = 7,7 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)** δ (ppm) : 150,66, 150,09, 147,12, 135,81, 132,63, 131,72, 128,53, 125,78, 125,55, 121,68, 115,24, 92,44, 85,39.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) : 293,06692, mesuré 293,06681.

**Z-p-nitrocinnamoate d'éthyle (3.32)**



Dans un ballon de 50 mL ont été ajoutés l'ester **3.29** (54 mg, 0,25 mmol), le catalyseur de Lindlar (5 mg, 5 % p/p) ainsi que 10 mL de THF. Après avoir mis le ballon sous vide, celui-ci a été surmonté d'une baudruche emplie d'hydrogène et le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h. Par la suite, la solution a été filtrée sur célite, puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. Une purification par chromatographie sur gel de silice (50 : 50 dichlorométhane / hexane) a permis l'obtention d'une huile jaune, dans un rendement de 84 %.

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) : 8,22 (d, 2 H, *J* = 8,9 Hz), 7,69 (d, 2 H, *J* = 8,9 Hz), 7,03 (d, 1 H, *J* = 12,5 Hz), 6,15 (d, 1 H, *J* = 12,5 Hz), 4,19 (q, 2 H, *J* = 7,1 Hz), 1,26 (t, 3 H, *J* = 7,1 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) : 165,74, 147,92, 141,89, 140,99, 130,60, 123,58, 105,99, 61,16, 14,46.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) : 222,07608, mesuré 222,07700.

**Acide *Z*-*p*-nitrocinnamique (3.33)**



Dans un ballon de 5 mL a été dissous l'ester **3.32** (46 mg, 0,21 mmol) dans 1 mL d'acétone. À cette solution a été ajouté 1 mL d'eau distillée, puis l'hydroxyde de lithium (10 mg, 0,42 mmol) avant que le mélange réactionnel ne soit agité pendant 16 h. Par la suite, 10 mL d'eau distillée ainsi que 1 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium y ont été ajoutés, et la phase aqueuse a été lavée à l'aide de 3 × 3 mL de dichlorométhane. Une acidification de la phase aqueuse a ensuite été effectuée, jusqu'à un pH ~ 1, en utilisant une solution 1 M de HCl, suite à quoi une extraction a été réalisée à l'aide de 3 × 5 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique ainsi récupérée a subséquemment été lavée avec 1 × 5 mL d'une solution saturée de NaCl avant d'être séchée via l'utilisation de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Un solide blanc cassé a ainsi été récupéré, dans un rendement de 95 %.

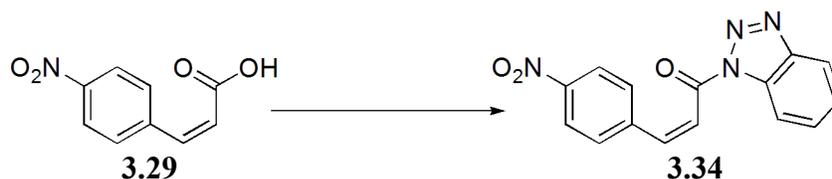
**p.f.** : 126 à 128 °C (déc.).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ (ppm) : 8,21 (d, 2 H, *J* = 8,7 Hz), 7,75 (d, 2 H, *J* = 8,7 Hz), 7,07 (d, 1 H, *J* = 12,6 Hz), 6,17 (d, 1 H, *J* = 12,6 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)** δ (ppm) : 168,17, 148,24, 143,14, 139,67, 131,60, 125,82, 124,43.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) : 192,03023, mesuré 192,02996.

### **Z-p-nitrocinnamoylbenzotriazolamide (3.34)**



Dans un ballon de 10 mL, placé sous  $\text{N}_2$ , ont été insérés le benzotriazole (76 mg, 0,64 mmol), le chlorure de thionyle ( $11,6 \mu\text{L}$ , 0,16 mmol) ainsi que 2 mL de dichlorométhane anhydre. Cette solution a été agitée 30 min à  $25^\circ\text{C}$  avant que l'acide carboxylique **3.29** (31 mg, 0,16 mmol) y soit ajouté. Le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h supplémentaires, avant que le précipité formé pendant la réaction ne soit filtré et lavé à l'aide de dichlorométhane. La phase organique ainsi récupérée a ensuite été lavée en utilisant  $3 \times 4 \text{ mL}$  d'une solution 2 M de NaOH et  $1 \times 4 \text{ mL}$  d'une solution saturée de NaCl, avant d'être séchée à l'aide de  $\text{MgSO}_4$ , filtrée puis évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie sur gel de silice (100 % dichlorométhane) a permis l'obtention d'un solide blanc cassé, dans un rendement de 72 %.

**p.f.** : 149 à  $151^\circ\text{C}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 8,30 (m, 3 H), 8,18 (d, 1 H,  $J = 8,4 \text{ Hz}$ ), 7,87 (d, 2 H,  $J = 8,4 \text{ Hz}$ ), 7,70 (m, 2 H), 7,57 (t, 1 H,  $J = 7,8 \text{ Hz}$ ), 7,48 (d, 1 H,  $J = 12,4 \text{ Hz}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 162,77, 146,69, 145,78, 141,30, 131,05, 130,97, 129,91, 126,99, 124,76, 123,87, 121,65, 120,79, 115,04.

**SMHR (ESI)** calculé pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) : 317,06451, mesuré 317,06473.

### **7.2.2. Détermination des valeurs d'IC<sub>50</sub> pour les inhibiteurs compétitifs réversibles**

Les essais cinétiques sont conduits de la même façon que le test d'activité, utilisant la méthode AL5, précédemment décrit.

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> pour les molécules évaluées ont été obtenues en préparant des échantillons de 1 mL contenant 2,5 mU de gpITG2 ou de TG2, selon le cas, une concentration fixe de 54 µM de AL5, ainsi que des concentrations en inhibiteurs variant, en général, entre 1,8 µM et la limite de solubilité du composé évalué. Les solutions mères des inhibiteurs ont été préparées dans le DMF, et une concentration finale de 5 % de ce solvant organique a été utilisée dans tous les échantillons préparés.

Un triplicata a été effectué pour chaque concentration d'inhibiteur testée. De plus, dans chacun des cas, un blanc, sans enzyme, a aussi été évalué en parallèle des échantillons d'intérêt, tout comme un échantillon ne contenant pas la molécule évaluée, servant de point de référence pour la vitesse de la réaction d'hydrolyse enzymatique du AL5, non-inhibée.

La valeur d'IC<sub>50</sub> a ensuite été obtenue en extrapolant la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse d'hydrolyse enzymatique du AL5 de 50 % par rapport à la vitesse de la même réaction, non-inhibée.

### **7.2.3. Suivi cinétique de la réaction d'addition du GSH aux inhibiteur réversibles**

La susceptibilité à l'attaque du GSH des inhibiteurs a été suivie cinétiquement à l'aide d'échantillons de 1 mL contenant, pour chaque inhibiteur évalué, 0,03 mM du composé d'intérêt, 0,2 mM de GSH dans un tampon aqueux (150 mM HEPES, pH 7,4) contenant, au final, 3 % d'acétonitrile, nécessaire pour garantir la solubilité des composés évalués.

La séparation par LC-MS a été effectuée à l'aide d'une colonne Luna C18 2,5 µm d'une longueur de 50 × 3 mm à l'aide d'un gradient continu de méthanol dans l'eau, additionnée de 0,1 % d'acide formique, allant de 50 à 90 %, sur une période de 8 min, démarré après l'utilisation pendant une minute d'une solution de 50 % méthanol dans l'eau. À la fin du gradient, une concentration de 90 % de méthanol dans l'eau a été maintenue pendant 40 s

avant qu'un retour à une concentration de 50 % de méthanol dans l'eau ne soit effectué, sur une période de 20 s.

Pour chacune des analyses, le moment de l'ajout de l'inhibiteur dans l'échantillon correspond au temps zéro, et des injections de 20  $\mu\text{L}$  ont été effectuées à différents temps d'incubation, allant de 20 s à 5 h 30.

Les aires sous la courbe des pics des spectres de masse correspondant aux masses des inhibiteurs et aux masses des inhibiteurs additionnés du GSH ont été utilisées afin de déterminer le pourcentage de conversion.

#### **7.2.4. Minimisation énergétique de l'adduit d'addition nucléophile**

La minimisation énergétique de l'adduit d'addition d'un thiol sur la molécule **1.20** a été effectuée à l'aide de la version professionnelle du logiciel *Hyperchem 7.5*. Un calcul de type mécanique moléculaire employant un champ de force AMBER a été utilisé, et une boîte d'eau de dimension  $15 \times 15 \times 30 \text{ \AA}$  a été construite autour de la molécule afin de mimer l'environnement hydrophile utilisé dans les différents essais cinétiques. Un gradient conjugué de type Polak-Ribiere a été utilisé comme algorithme de calcul, jusqu'à l'obtention d'une convergence à une valeur d'au plus  $0,01 \text{ kcal \AA}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

### **7.3. Partie expérimentale du Chapitre 4**

Tous les réactifs qui ont été utilisés sont de la plus haute pureté disponible, les produits chimiques et solvants qui ont été utilisés proviennent des compagnies *Sigma-Aldrich Corporation* et *VWR International*, tandis que toutes les solutions aqueuses ont été préparées à l'aide d'eau purifiée à l'aide du système *BioCell* de Millipore.

Les essais cinétiques pour la TG2 ont été menés sur un spectrophotomètre UV-vis de type *Cary 100 BIO* en utilisant le substrat donneur AL5<sup>50</sup> et l'inhibiteur réversible **1.20**<sup>117</sup>, préparés dans notre laboratoire en suivant des procédures antérieurement publiées.

Les essais cinétiques ont été conduits de la même façon que le test d'activité, utilisant la méthode AL5, précédemment décrit.

Une solution mère de la molécule **1.20** a été préparée via une dissolution dans le DMF, et une concentration finale de 5 % de ce solvant organique se retrouve dans toutes les solutions finales. De plus, pour tous les essais, des échantillons de 1 mL ont été préparés et contiennent 2,5 mU de gpITG2.

Chaque expérience a été effectuée en triplicata, et, à chaque fois, un blanc, sans enzyme, a aussi été évalué en parallèle des échantillons d'intérêt. De plus, un échantillon ne contenant pas d'inhibiteur a aussi été préparé, servant de point de référence pour la vitesse de la réaction d'hydrolyse enzymatique du AL5, non-inhibée.

### **7.3.1. Détermination du profil cinétique entre l'inhibiteur et le calcium**

Pour ces cinétiques, le  $\text{CaCl}_2$  a été omis du tampon normalement utilisé, et une concentration fixe de 54  $\mu\text{M}$  de AL5 a été employée.

Les concentrations de  $\text{CaCl}_2$  utilisées ont été variées entre 0,1 et 30 mM, tandis que, pour l'inhibiteur, elles se situent plutôt entre 0,8 et 4,0  $\mu\text{M}$ .

### **7.3.2. Cinétiques d'inhibition à liaison lente**

Pour la vérification d'inhibition à liaison lente, la réaction a été suivie pendant 45 min, au lieu des 10 min habituelles.

Les concentrations utilisées pour le AL5 se situent entre 10 et 400  $\mu\text{M}$ , tandis que les concentrations d'inhibiteur varient entre 0,625 et 8,00  $\mu\text{M}$ .

Les vitesses initiales ont été calculées à l'aide des pentes obtenues des graphiques d'absorbance du produit en fonction du temps pour des temps se situant entre la 1<sup>ère</sup> et la 3<sup>ième</sup> min, tandis que les vitesses stationnaires ont plutôt été calculées à l'aide des pentes obtenues entre la 35<sup>ième</sup> et la 45<sup>ième</sup> min.

Les valeurs de  $1/k_{\text{obs}}$  ont été mesurées en déterminant graphiquement la valeur de la projection, sur l'axe des abscisses, de l'intersection des droites tracées pour la détermination de vitesses initiale et stationnaire.

### 7.3.3. Cinétiques de retour à l'activité

La gplTG2 a été concentrée, par centrifugation à l'aide d'un filtre possédant un seuil de 10 kDa. Par la suite, une solution d'incubation de 35,5  $\mu$ L contenant, au total, 55,5 mU d'enzyme, 2,8 mM de  $\text{CaCl}_2$  et 5,7  $\mu$ M d'inhibiteur a été incubée à température ambiante pendant 1 h. En parallèle, un échantillon d'enzyme ne contenant pas d'inhibiteur a aussi été préparé afin d'être utilisé en guise de point comparaison, pour une vitesse de réaction non-inhibée.

Une fois la fin du temps d'incubation atteint, un volume de 1,6  $\mu$ L a été prélevé, puis l'activité de la gplTG2 a été quantifiée via un test d'activité de type AL5, précédemment décrit. Une concentration de 400  $\mu$ M de AL5 a été utilisée et les cinétiques ont été suivies sur une période de 30 min.

## 7.4. Partie expérimentale du Chapitre 5

Tous les réactifs qui ont été utilisés sont de la plus haute pureté disponible, les produits chimiques et solvants qui ont été utilisés proviennent des compagnies *Sigma-Aldrich Corporation* et *VWR International*, tandis que toutes les solutions aqueuses ont été préparées à l'aide d'eau purifiée à l'aide du système *BioCell* de Millipore.

Les essais cinétiques pour la hTG2 ont été menés sur un spectrophotomètre UV-vis de type *Cary 100 BIO* en utilisant le substrat donneur AL5<sup>50</sup>, préparé dans notre laboratoire en suivant une procédure antérieurement publiée. Le suivi cinétique de la disparition de la fonction diazirine a aussi été effectué grâce à cet appareil.

L'irradiation des échantillons, pour l'expérience de photomarquage, a été réalisée à l'aide d'un four UV de type LZC-5 de la compagnie *Luzchem* en utilisant six ampoules de 350 nm de 8 W.

La molécule **1.19**<sup>119</sup> ainsi que le peptide Ac-PNPQLPF-OH<sup>66</sup> et l'inhibiteur irréversible Fmoc-SarGK(Acryl)LPF-OH<sup>62</sup>, ont été obtenus via des procédures développées et publiées par le groupe, tandis que le diazirine **5.8**<sup>132</sup> a été synthétisé en suivant, tel quel, la procédure publiée par Walter *et al.*

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et du carbone ont été enregistrés à l'aide des spectromètres *Bruker* AMX400 et AMX300.

Les spectres de masse haute résolution (SMHR), les analyses de pureté ainsi que les spectres de masse de la protéine entière ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre LC-TOF de la compagnie *Agilent Technologies*. Ces appareils sont situés au Centre régional de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal.

Les points de fusion (non-corrigés) ont été déterminés à l'aide d'un appareil *EZ-Melt* de la compagnie SRS

#### **7.4.1. Arrimage moléculaire en utilisant les modèles d'homologie de la gpITG2 ainsi que la molécule 1.19**

Une minimisation énergétique de la géométrie moléculaire du composé **1.19**, de type semi-empirique utilisant le champ de force AM1, a été effectuée à l'aide de la version professionnelle du logiciel *Hyperchem 7.5*. Par la suite, cette structure a été utilisée, avec les modèles d'homologie de la forme ouverte et fermée de la gpITG2, pour des expériences d'arrimage moléculaire, effectuées à l'aide le logiciel *Autodock 3.0.5*.

Pour la forme fermée de l'enzyme, une boîte grillagée d'une grosseur de  $90 \times 70 \times 80$  npts où une grandeur de maille de  $0,375 \text{ \AA}$  a été utilisée. Cette boîte a été positionnée afin d'inclure, au centre de la boîte, la cystéine 230, identifiée par spectrométrie de masse comme étant l'unique résidu marqué lors de l'irradiation, ainsi que le site de liaison du substrat donneur<sup>218</sup>. Par la suite, l'algorithme génétique du logiciel *Autodock 3.0.5* a été utilisé sur une population initiale de 50, et 50 essais ont été effectués avec un nombre maximal pour l'évaluation énergétique de 250 000 et un nombre maximal de générations de 27 000. *Auto-Tors* a été utilisé afin de définir les torsions disponibles pour le ligand, et sept types de torsion différente ont, par conséquent, été obtenus. Sur les 50 conformères ainsi obtenus, 49 possédaient des énergies de liaison très similaires, correspondant à  $-6,5$ , soit 1 kcal/mol.

L'arrimage moléculaire a été répété avec une boîte grillagée plus grande, soit de  $126 \times 80 \times 126$  npts, en utilisant la même grandeur de maille et les mêmes paramètres que

décrit précédemment. Dans ce cas, 100 essais ont été effectués, et des résultats similaires ont été obtenus, venant confirmer la qualité de l'arrimage effectué.

Pour la forme ouverte, un protocole identique à celui décrit pour la boîte de grillage la plus grande a été suivi.

#### **7.4.2. Électrophorèse sur gel en conditions non-dénaturantes**

Des échantillons contenant chacun 6 µg de gpITG2 ont été préparés et ont été incubés pendant 15 min (seulement 5 min pour l'échantillon contenant que le calcium comme ligand), à 25 °C, dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl et 0,5 mM de EDTA à pH 7,5. À ce tampon a été ajouté un des éléments suivants, selon l'échantillon préparé : 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> et 25 µM de GTP ou 28,5 µM de la molécule **1.19** et 5 % de DMF.

Pour l'analyse de la gpITG2 incubée avec différents ligands, ceux-ci ont aussi été ajoutés à la solution permettant la préparation des gels de séparation et de compression, aux concentrations suivantes : 0,5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 25 µM de GTP ou 28,5 µM de la molécule **1.19** et 5 % de DMF.

Le tampon de chargement utilisé, composé de 0,5 M Tris, 20 % glycérol et de bleu de bromophénol à pH 6,8 ajusté à 4 °C, a été ajouté aux échantillons placés sur glace, dans un ratio échantillon / tampon de chargement de 3 : 1. Pour chacune des expériences effectuées, entre 6 et 8 échantillons ont été chargés sur les gels, en utilisant toujours la même solution d'incubation préalablement préparée.

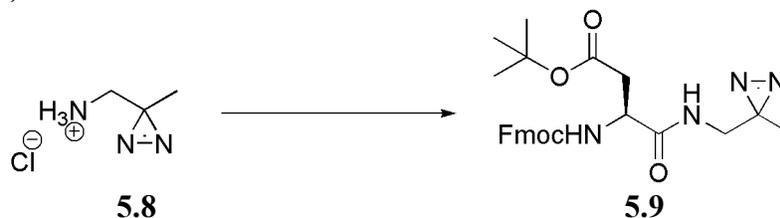
Les gels de polyacrylamide en conditions non-dénaturantes ont été effectués sur des gels de séparation de 10 % et des gels de compression de 4 %, en utilisant les tampons de Laemmli<sup>231</sup>, sans dodécylsulfate de sodium, où le pH a été ajusté à 4 °C. La séparation a été effectuée à 4°C en utilisant un voltage de 80 V pour le gel de compression (1 h) et de 100 V pour le gel de séparation (4 h 30).

La coloration des gels a été effectuée à l'aide d'une solution 0,25 % de bleu de Coomassie de type bleu brillant R-250 de la compagnie *Bio-Rad*, dans une solution aqueuse

contenant 40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique, tandis que la solution aqueuse utilisée pour la décoloration contient 25 % de méthanol et 10 % d'acide acétique.

### 7.4.3. Synthèse

#### $\beta$ -*tert*-butyl-*N*-fluorénylméthoxycarbonyl-*N'*-(3-méthyldiazirin-3-ylméthyl)-*L*-aspartamide (5.9)



Dans un ballon de 250 mL, ont été dissous l'acide  $\delta$ -*tert*-butyl-*N*- $\alpha$ -Fmoc-*L*-aspartique (2,47 g, 6,0 mmol) et la *N,N*-diisopropyléthylamine (1,05 mL, 6,1 mmol) dans 75 mL d'acétonitrile. Ensuite ont été ajoutés le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (1,15 g, 6,0 mmol) ainsi que l'hydroxybenzotriazole (0,811 g, 6,0 mmol). Ce mélange a été agité pendant 30 minutes, et, en parallèle, une solution contenant le diazirine **5.8** (0,365 g, 3,0 mmol) et de la *N,N*-diisopropyléthylamine (0,54 mL, 3,0 mmol) dans 25 mL d'acétonitrile a été préparée. Celle-ci a par la suite été ajoutée à la solution contenant le dérivé d'acide aspartique, et le mélange réactionnel a finalement été agité 16 h à l'abri de la lumière. Le solvant a ensuite été évaporé sous pression réduite, et le produit brut ainsi obtenu a été dissous dans 100 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique a subséquemment été lavée en utilisant 3  $\times$  25 mL d'une solution 0,1 M de HCl, 3  $\times$  25 mL d'une solution 1 M de NaOH et 1  $\times$  25 mL d'une solution saturée de NaCl, avant d'être séchée à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit ainsi obtenu a finalement été précipité à l'aide d'un mélange d'éther diéthylique et d'hexane, permettant de récupérer, après filtration, un solide blanc, dans un rendement de 76 %.

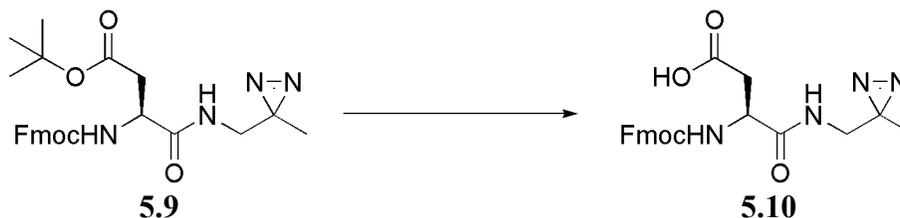
**p.f.** : 104 à 106 °C.

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) : 7,78 (d, 2 H,  $J = 7,4$  Hz), 7,59 (d, 2 H,  $J = 7,2$  Hz), 7,42 (t, 2 H,  $J = 7,4$  Hz), 7,33 (t, 2 H,  $J = 7,3$  Hz), 6,52 (sl, 1 H), 5,97 (sl, 1 H), 4,47 (m, 3 H), 4,23 (t, 1 H,  $J = 6,6$  Hz), 3,24 (m, 2 H), 2,91 (dd, 1 H,  $J = 17,1, 2,5$  Hz), 2,61 (dd, 1 H,  $J = 17,0, 6,7$  Hz), 1,47 (s, 9 H), 1,04 (s, 3 H).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) : 172,07, 171,65, 144,49, 142,17, 128,63, 127,95, 125,82, 120,90, 82,89, 68,03, 51,76, 47,99, 43,66, 38,21, 28,87, 26,13, 18,66.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) : 501,21084, mesuré 501,21234.

***N*- $\alpha$ -fluorénylméthoxycarbonyl-*N'*-(3-méthyldiazirin-3-ylméthyl)-L-aspartamide (5.10)**



Dans un ballon de 50 mL a été dissous l'ester **5.9** (628 mg, 1,31 mmol) dans 15 mL d'éther diéthylique, puis 5 mL d'une solution 12 M de HCl y ont été ajoutés. Ce mélange a été agité vigoureusement pendant 3 h, avant qu'une évaporation à sec sous pression réduite ne soit réalisée. Finalement, le produit brut obtenu a été précipité dans un mélange d'éther diéthylique et d'hexane, ce qui a mené, après filtration, à l'obtention d'un solide blanc, dans un rendement de 99 %.

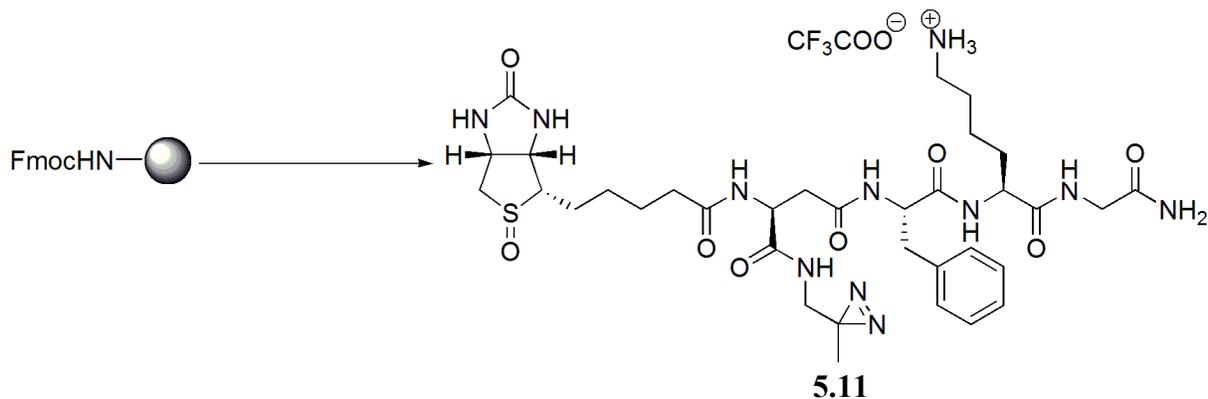
**p.f.** : 135 à 137 °C (déc.).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  (ppm) : 7,78 (d, 2 H,  $J = 7,2$  Hz), 7,63 (d, 2 H,  $J = 7,2$  Hz), 7,38 (t, 2 H,  $J = 7,4$  Hz), 7,30 (t, 2 H,  $J = 7,4$  Hz), 4,50 (t, 1 H,  $J = 6,4$  Hz), 4,37 (m, 2 H), 4,21 (t, 1 H,  $J = 6,0$  Hz), 3,14 (s, 2 H), 2,83 (dd, 1 H,  $J = 16,8, 5,0$  Hz), 2,70 (dd, 1 H,  $J = 16,4, 6,8$  Hz), 1,05 (s, 3 H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  (ppm) : 172, 51, 171,56, 144,21, 141,58, 127,81, 127,19, 125,24, 119,95, 67,13, 51,96, 50,19, 42,56, 36,12, 25,43, 16,99.

**SMHR (ESI)** calculé pour C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) : 445,14824, mesuré 445,14918.

Sel trifluoroacétate de *N*-(*S*-oxo-biotinyl)-*N'*-(3-méthyl diazirin-3-ylméthyl)-*L*-β-aspartamidyl-*L*-phénylalaninyl-*L*-lysinyglycinamide (**5.11**)



Dans un premier temps, la fonction amine de la résine « *Rink amide MBHA* » (820 mg, 0,75 mmol) a été déprotégée via une agitation pendant 1 h en présence de 6 mL d'une solution de pipéridine 20 % (v / v) dans le DMF. Après filtration et des lavages à l'aide de 3 × 10 mL de DMF, 3 × 10 mL de DCM et 3 × 10 mL d'éther diéthylique, un test de Kaiser positif a permis de s'assurer, qualitativement, que la déprotection s'est bel et bien effectuée.

Pour ce qui est du greffage des différents acides aminés protégés à l'aide d'un Fmoc, ils ont tous été effectués de la même façon, via couplage à la partie C-terminale de l'acide aminé exigé dans la séquence, et préalablement greffé à la résine et déprotégé. Ce couplage a été réalisé à l'aide de HOBt (255 mg, 1,89 mmol) et de DIC (292 μL, 1,89 mmol) dans 5 mL de DMF. Après agitation de la résine pendant 2 × 30 min pour chacun des acides aminés, suivie, à chaque reprise, de lavages successifs utilisant 3 × 10 mL de DMF, 3 × 10 mL de DCM et 3 × 10 mL d'éther diéthylique, un test de Kaiser négatif a permis de s'assurer, qualitativement, que le couplage a été effectué jusqu'à complétion.

Pour ce qui est du couplage de l'acide aminé photoactivable **5.10** (449 mg, 1,06 mmol), aussi protégé à l'aide d'un Fmoc, celui-ci a utilisé les mêmes quantités d'agents de couplage et de solvant que précédemment décrit, mais l'agitation a été effectuée pendant 16 h.

Dans le cas de la biotine (462 mg, 1,89 mmol), 5 mL de DMSO ont été utilisés comme solvant, dû à la faible solubilité de cette molécule dans le DMF. Encore une fois, le couplage a été réalisé à l'aide des mêmes quantités d'agent de couplage, et l'agitation a été effectuée pendant 16 h.

Finalement, la libération du produit de la résine a été effectuée en ajoutant 10 mL d'acide trifluoroacétique ainsi que 10 mL de DCM à la résine, qui a par la suite été agitée pendant 2 h. Suite à la filtration et au lavage de la résine à l'aide de  $3 \times 20$  mL de DCM, le mélange a été évaporé à sec, sous pression réduite. Après dissolution du produit brut dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'acétone, permettant une solubilisation complète, une précipitation à l'éther diéthylique a été effectuée. Ceci a permis d'obtenir, après filtration, un solide beige, dans un rendement global de 90 %, basé sur la capacité théorique initiale de la résine utilisée (0,92 mmol / g).

**SMHR (ESI)** calculé pour  $C_{34}H_{51}N_{11}O_8S$  ( $[M+H]^+$ ) : 774,37155, mesuré 774,37066.

**Pureté** : 91,4 % évaluée par LC-MS en utilisant l'aire sous la courbe du spectre de masse obtenu après une séparation utilisant une colonne Synergi et un gradient continu, sur 20 min, allant de 50 % à 90 % de méthanol dans l'eau additionnée de 0,1 % d'acide formique.

#### **7.4.4. Détermination du $K_M^{app}$ du substrat accepteur 5.11**

Les essais cinétiques ont été conduits de la même façon que le test d'activité, utilisant la méthode AL5, précédemment décrit.

Pour tous les essais, une solution mère de la molécule d'intérêt a été préparée via une dissolution dans le DMF, et une concentration finale de 5 % de ce solvant organique se retrouve dans les solutions finales. De plus, des échantillons de 1 mL ont été préparés et contiennent tous 2,5 mU de hTG2. Un triplicata a été effectué pour chacun des essais, et, dans chaque cas, un blanc, sans enzyme, a aussi été évalué en parallèle des échantillons d'intérêt.

Pour la détermination de la valeur de  $K_M^{app}$ , une concentration fixe de 435  $\mu M$  de AL5 a été utilisée, tandis que la concentration de la molécule **5.11** a été variée entre 35 et 575  $\mu M$ .

#### **7.4.5. Suivi cinétique de la réaction d'irradiation de la fonction diazirine**

Des solutions aqueuses, contenant 6,80 mM de la molécule **5.12** et 2,5 % de DMF, ont été préparées puis irradiées à des temps compris entre 0 et 8 min.

Par la suite, des balayages de l'absorbance entre 250 et 750 nm ont été effectués, et la valeur précise de l'absorbance à 342 nm a été relevée afin d'être portée en graphique.

#### **7.4.6. Cinétique effet irradiation hTG2**

Des échantillons de 500  $\mu\text{L}$  contenant 12,5 mg de hTG2 ont été préparés via dilution dans le tampon d'entreposage de l'enzyme (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA et 1 mM TCEP, pH 7,2), puis irradiés pour différents laps de temps, compris entre 0 et 10 min.

Par la suite, un volume de 50  $\mu\text{L}$  de la solution irradiée a été prélevé, et un test d'activité de type AL5 a été effectué, où une concentration de 54  $\mu\text{M}$  du substrat a été utilisée. Un triplicata a été réalisé pour chaque échantillon testé et, en parallèle, un échantillon contenant la hTG2 non-irradiée a aussi été évalué, afin de servir de point de comparaison pour une vitesse de réaction non-affectée par l'irradiation, tout comme un blanc, sans enzyme.

#### **7.4.7. Photomarquage de la hTG2 utilisant la molécule 5.11**

Des échantillons de 750  $\mu\text{L}$  contenant 0,180 mg de hTG2 dans un tampon composé de 180 mM de Tris-acétate et de 4,5 mM de  $\text{CaCl}_2$  à pH 7,0 ont été préparés, en ajoutant différents ligands dilués dans le DMF, pour une concentration finale de 5 % de ce solvant organique dans chacun des échantillons. Des concentrations de 1,65 mM pour l'inhibiteur irréversible Fmoc-SarGK(Acryl)LPF-OH, de 29,3  $\mu\text{M}$  pour le substrat donneur Ac-PNPQLPF-OH, de 435  $\mu\text{M}$  pour le substrat donneur AL5, ainsi que de 1,93 mM pour le substrat accepteur photoactivable **5.11**, ont été utilisées.

Pour les échantillons contenant l'inhibiteur irréversible, une incubation, en absence du substrat accepteur photoactivable, a été effectuée, pendant 30 min à 25 °C, avant que le substrat accepteur ne soit ajouté. Dans les autres cas, l'incubation a été d'une durée de cinq minutes.

Suite à la période d'incubation, chaque échantillon a été irradié, de manière indépendante, dans le four UV, pour une période de 10 min, puis 7,5  $\mu\text{L}$  d'une solution de HCl 1 M ont été ajoutés à la solution, afin d'inactiver l'enzyme. Les échantillons ont été enveloppés dans du papier d'aluminium et gardés à -20 °C jusqu'à ce que l'analyse par spectrométrie de masse de la protéine entière ne soit réalisée.

## Bibliographie

1. Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 4439.
2. Emil Fischer - Biographical. (n.d.) Repéré à [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1902/fischer-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1902/fischer-bio.html).
3. Lichtenthaler, F. W. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, **1994**, *33*, 2364.
4. Eschenmoser, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, *33*, 2363.
5. Lorand, L.; Conrad, S. M. *Mol. Cell. Biochem.*, **1984**, *58*, 9.
6. Pisano, J. J.; Finlayson, J. S.; Peyton, M. P. *Science*, **1968**, *160*, 892.
7. Folk, J. E.; Chung, S. I. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **1973**, *38*, 109.
8. Folk, J. E. *Annu. Rev. Biochem.*, **1980**, *49*, 517.
9. Iismaa, S. E.; Mearns, B. M.; Lorand, L.; Graham, R. M. *Physiol. Rev.*, **2009**, *89*, 991.
10. Lorand, L.; Graham, R. M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2003**, *4*, 140.
11. Griffin, M.; Casadio, R.; Bergamini, C. M. *Biochem. J.*, **2002**, *368*, 377.
12. Greenberg, C. S.; Birckbichler, P. J.; Rice, R. H. *FASEB J.*, **1991**, *5*, 3071.
13. Thomas, H.; Beck, K.; Adamczyk, M.; Aeschlimann, P.; Langley, M.; Oita, R. C.; Thiebach, L.; Hils, M.; Aeschlimann, D. *Amino Acids*, **2011**.
14. Phillips, M. A.; Stewart, B. E.; Qin, Q.; Chakravarty, R.; Floyd, E. E.; Jetten, A. M.; Rice, R. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1990**, *87*, 9333.
15. Steinert, P. M.; Chung, S. I.; Kim, S. Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, *221*, 101.
16. Inada, R.; Matsuki, M.; Yamada, K.; Morishima, Y.; Shen, S. C.; Kuramoto, N.; Yasuno, H.; Takahashi, K.; Miyachi, Y.; Yamanishi, K. *Am. J. Pathol.*, **2000**, *157*, 1875.
17. Thomazy, V.; Fesus, L. *Cell Tissue Res.*, **1989**, *255*, 215.
18. Spina, A. M.; Esposito, C.; Pagano, M.; Chiosi, E.; Mariniello, L.; Cozzolino, A.; Porta, R.; Illiano, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, *260*, 351.

19. Candi, E.; Oddi, S.; Paradisi, A.; Terrinoni, A.; Ranalli, M.; Teofoli, P.; Citro, G.; Scarpato, S.; Puddu, P.; Melino, G. *J. Invest. Dermatol.*, **2002**, *119*, 670.
20. Pietroni, V.; Di Giorgi, S.; Paradisi, A.; Ahvazi, B.; Candi, E.; Melino, G. *J. Invest. Dermatol.*, **2008**, *128*, 2760.
21. Aeschlimann, D.; Paulsson, M. *Thromb. Haemostasis*, **1994**, *71*, 402.
22. Azim, A. C.; Marfatia, S. M.; Korsgren, C.; Dotimas, E.; Cohen, C. M.; Chishti, A. H. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 3001.
23. Cheng, T.; Hitomi, K.; van Vlijmen-Willems, I. M. J. J.; de Jongh, G. J.; Yamamoto, K.; Nishi, K.; Watts, C.; Reinheckel, T.; Schalkwijk, J.; Zeeuwen, P. L. J. M. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 15893.
24. Kim, H. C.; Lewis, M. S.; Gorman, J. J.; Park, S. C.; Girard, J. E.; Folk, J. E.; Chung, S. I. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 21971.
25. Kalinin, A.; Marekov, L. N.; Steinert, P. M. *J. Cell Sci.*, **2001**, *114*, 3069.
26. Ahvazi, B.; Boeshans, K. M.; Rastinejad, F. *J. Struct. Biol.*, **2004**, *147*, 200.
27. Candi, E.; Paradisi, A.; Terrinoni, A.; Pietroni, V.; Oddi, S.; Cadot, B.; Jogini, V.; Meiyappan, M.; Clardy, J.; Finazzi-Agro, A.; Melino, G. *Biochem. J.*, **2004**, *381*, 313.
28. Hitomi, K.; Ikura, K.; Maki, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2000**, *64*, 657.
29. Ahvazi, B.; Boeshans, K. M.; Idler, W.; Baxa, U.; Steinert, P. M.; Rastinejad, F. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 7180.
30. Ho, K. C.; Quarmby, V. E.; French, F. S.; Wilson, E. M. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 12660.
31. Cho, S. Y.; Jeon, J. H.; Kim, C. W.; Shin, D. M.; Jang, G. Y.; Jeong, E. M.; Lee, S. E.; Song, K. Y.; Kim, I. G. *Hybridoma*, **2010**, *29*, 263.
32. Cadot, B.; Rufini, A.; Pietroni, V.; Ramadan, S.; Guerrieri, P.; Melino, G.; Candi, E. *Amino Acids*, **2004**, *26*, 405.
33. Stammaes, J.; Dorum, S.; Fleckenstein, B.; Aeschlimann, D.; Sollid, L. M. *Amino Acids*, **2010**, *39*, 1183.
34. Grenard, P.; Bates, M. K.; Aeschlimann, D. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 33066.
35. Chen, J. S. K.; Mehta, K. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **1999**, *31*, 817.
36. Peng, X. J.; Zhang, Y. H.; Zhang, H. F.; Graner, S.; Williams, J. F.; Levitt, M. L.; Lokshin, A. *FEBS Lett.*, **1999**, *446*, 35.

37. Liu, S. P.; Cerione, R. A.; Clardy, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, *99*, 2743.
38. Begg, G. E.; Holman, S. R.; Stokes, P. H.; Matthews, J. M.; Graham, R. M.; Iismaa, S. E. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 12603.
39. Hasegawa, G.; Suwa, M.; Ichikawa, Y.; Ohtsuka, T.; Kumagai, S.; Kikuchi, M.; Sato, Y.; Saito, Y. *Biochem. J.*, **2003**, *373*, 793.
40. Davies, P. J. A.; Davies, D. R.; Levitzki, A.; Maxfield, F. R.; Milhaud, P.; Willingham, M. C.; Pastan, I. H. *Nature*, **1980**, *283*, 162.
41. Levitzki, A.; Willingham, M.; Pastan, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1980**, *77*, 2706.
42. Jones, R. A.; Nicholas, B.; Mian, S.; Davies, P. J. A.; Griffin, M. *J. Cell Sci.*, **1997**, *110*, 2461.
43. Gentile, V.; Thomazy, V.; Piacentini, M.; Fesus, L.; Davies, P. J. A. *J. Cell Biol.*, **1992**, *119*, 463.
44. Telci, D.; Wang, Z.; Li, X.; Verderio, E. A. M.; Humphries, M. J.; Baccarini, M.; Basaga, H.; Griffin, M. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 20937.
45. Aeschlimann, D.; Thomazy, V. *Connect. Tissue Res.*, **2000**, *41*, 1.
46. Fesus, L.; Thomazy, V.; Falus, A. *FEBS Lett.*, **1987**, *224*, 104.
47. Piredda, L.; Amendola, A.; Colizzi, V.; Davies, P. J. A.; Farrace, M. G.; Fraziano, M.; Gentile, V.; Uray, I.; Piacentini, M.; Fesus, L. *Cell Death Differ.*, **1997**, *4*, 463.
48. Szondy, Z.; Sarang, Z.; Molnar, P.; Nemeth, T.; Piacentini, M.; Mastroberardino, P. G.; Falasca, L.; Aeschlimann, D.; Kovacs, J.; Kiss, I.; Szegezdi, E.; Lakos, G.; Rajnavolgyi, E.; Birckbichler, P. J.; Melino, G.; Fesus, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, *100*, 7812.
49. Folk, J. E. *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 3707.
50. Leblanc, A.; Gravel, C.; Labelle, J.; Keillor, J. W. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 8335.
51. Pinkas, D. M.; Strop, P.; Brunger, A. T.; Khosla, C. *PLoS Biol.*, **2007**, *5*, 2788.
52. Ichinose, A.; Bottenus, R. E.; Davie, E. W. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 13411.
53. Puszkun, E. G.; Raghuraman, V. *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 16012.
54. Ikura, K.; Tsuchiya, Y.; Sasaki, R.; Chiba, H. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *187*, 705.
55. Folk, J. E.; Finlayson, J. S. *Adv. Protein Chem.*, **1977**, *31*, 1.

56. Folk, J. E.; Chung, S. I. *Methods Enzymol.*, **1985**, *113*, 358.
57. Sato, H.; Yamada, N.; Shimba, N.; Takahara, Y. *Anal. Biochem.*, **2000**, *281*, 68.
58. Sohn, J.; Kim, T. I.; Yoon, Y. H.; Kim, J. Y.; Kim, S. Y. *J. Clin. Invest.*, **2003**, *111*, 121.
59. Piper, J. L.; Gray, G. M.; Khosla, C. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 386.
60. Case, A.; Ni, J.; Yeh, L. A.; Stein, R. L. *Anal. Biochem.*, **2005**, *338*, 237.
61. Lin, C. W.; Ting, A. Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 4542.
62. Chabot, N.; Moreau, S.; Mulani, A.; Moreau, P.; Keillor, J. W. *Chem. Biol.*, **2010**, *17*, 1143.
63. Lorand, L.; Campbell, L. K. *Anal. Biochem.*, **1971**, *44*, 207.
64. Fink, M. L.; Shao, Y. Y.; Kersh, G. J. *Anal. Biochem.*, **1992**, *201*, 270.
65. Folk, J. E.; Park, M. H.; Chung, S. I.; Schrode, J.; Lester, E. P.; Cooper, H. L. *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 3695.
66. Gnaccarini, C.; Ben-Tahar, W.; Mulani, A.; Roy, I.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Keillor, J. W. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 5258.
67. Cecil, D. L.; Terkeltaub, R. *J. Immunol.*, **2008**, *180*, 8378.
68. Borth, W.; Chang, V.; Bishop, P.; Harpel, P. C. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 18149.
69. Jensen, P. H.; Sorensen, E. S.; Petersen, T. E.; Gliemann, J.; Rasmussen, L. K. *Biochem. J.*, **1995**, *310*, 91.
70. Cooper, A. J. L.; Sheu, K. F. R.; Burke, J. R.; Onodera, O.; Strittmatter, W. J.; Roses, A. D.; Blass, J. P. *J. Neurochem.*, **1997**, *69*, 431.
71. Ho, G. J.; Gregory, E. J.; Smirnova, I. V.; Zoubine, M. N.; Festoff, B. W. *FEBS Lett.*, **1994**, *349*, 151.
72. Johnson, G. V. W.; Cox, T. M.; Lockhart, J. P.; Zinnerman, M. D.; Miller, M. L.; Powers, R. E. *Brain Res.*, **1997**, *751*, 323.
73. Igarashi, S.; Koide, R.; Shimohata, T.; Yamada, M.; Hayashi, Y.; Takano, H.; Date, H.; Oyake, M.; Sato, T.; Sato, A.; Egawa, S.; Ikeuchi, T.; Tanaka, H.; Nakano, R.; Tanaka, K.; Hozumi, I.; Inuzuka, T.; Takahashi, H.; Tsuji, S. *Nat. Genet.*, **1998**, *18*, 111.
74. Karpuj, M. V.; Becher, M. W.; Steinman, L. *Neurochem. Int.*, **2002**, *40*, 31.

75. Molberg, O.; Mcadam, S. N.; Korner, R.; Quarsten, H.; Kristiansen, C.; Madsen, L.; Fugger, L.; Scott, H.; Noren, O.; Roepstorff, P.; Lundin, K. E. A.; Sjostrom, H.; Sollid, L. M. *Nat. Med. (N. Y., NY, U. S.)*, **1998**, *4*, 974.
76. Reif, S.; Lerner, A. *Autoimmun. Rev.*, **2004**, *3*, 40.
77. Sollid, L. M. *Annu. Rev. Immunol.*, **2000**, *18*, 53.
78. Sardy, M.; Odenthal, U.; Karpati, S.; Paulsson, M.; Smyth, N. *Clin. Chem.*, **1999**, *45*, 2142.
79. Seissler, J.; Schott, M.; Boms, S.; Wohlrab, U.; Ostendorf, B.; Morgenthaler, N. G.; Scherbaum, W. A. *Diabetologia*, **1999**, *42*, 1440.
80. Kumar, S.; Mehta, K. *Amino Acids*, **2013**, *44*, 81.
81. Lentini, A.; Abbruzzese, A.; Provenzano, B.; Tabolacci, C.; Beninati, S. *Amino Acids*, **2013**, *44*, 25.
82. Barnes, R. N.; Bungay, P. J.; Elliott, B. M.; Walton, P. L.; Griffin, M. *Carcinogenesis*, **1985**, *6*, 459.
83. Hand, D.; Elliott, B. M.; Griffin, M. *Biochim. Biophys. Acta*, **1988**, *970*, 137.
84. Birckbichler, P. J.; Bonner, R. B.; Hurst, R. E.; Bane, B. L.; Pitha, J. V.; Hemstreet, G. P., 3<sup>rd</sup> *Cancer*, **2000**, *89*, 412.
85. Knight, C. R.; Rees, R. C.; Griffin, M. *Biochem. Soc. Trans.*, **1990**, *18*, 681.
86. van Groningen, J. J.; Klink, S. L.; Bloemers, H. P.; Swart, G. W. *Int. J. Cancer*, **1995**, *60*, 383.
87. Hettasch, J. M.; Bandarenko, N.; Burchette, J. L.; Lai, T. S.; Marks, J. R.; Haroon, Z. A.; Peters, K.; Dewhirst, M. W.; Iglehart, J. D.; Greenberg, C. S. *Lab. Invest.*, **1996**, *75*, 637.
88. Deyoung, L.; Ballaron, S.; Epstein, W. *J. Invest. Dermatol.*, **1984**, *82*, 275.
89. Schroeder, W. T.; Thacher, S. M.; Stewartgaletka, S.; Annarella, M.; Chema, D.; Siciliano, M. J.; Davies, P. J. A.; Tang, H. Y.; Sowa, B. A.; Duvic, M. *J. Invest. Dermatol.*, **1992**, *99*, 27.
90. Azari, P.; Rahim, I.; Clarkson, D. P. *Curr. Eye Res.*, **1981**, *1*, 463.
91. Lorand, L.; Hsu, L. K.; Siefiring, G. E., Jr.; Rafferty, N. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1981**, *78*, 1356.
92. Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, O. D.; James, K. E. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 4639.

93. Beynon, R. J.; Bond, J. S. (1989). *Proteolytic Enzymes : a Practical Approach*. Oxford, New York: IRL Press.
94. Folk, J. E.; Cole, P. W. *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 3238.
95. de Macedo, P.; Marrano, C.; Keillor, J. W. *Anal. Biochem.*, **2000**, *285*, 16.
96. Pardin, C.; Gillet, S. M. F. G.; Keillor, J. W. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 8379.
97. Castelhana, A. L.; Billedeau, R.; Pliura, D. H.; Bonaventura, B. J.; Krantz, A. *Bioorg. Chem.*, **1988**, *16*, 335.
98. Auger, M.; Mcdermott, A. E.; Robinson, V.; Castelhana, A. L.; Billedeau, R. J.; Pliura, D. H.; Krantz, A.; Griffin, R. G. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 3930.
99. Watts, R. E.; Siegel, M.; Khosla, C. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 7493.
100. Hausch, F.; Halttunen, T.; Maki, M.; Khosla, C. *Chem. Biol.*, **2003**, *10*, 225.
101. Choi, K.; Siegel, M.; Piper, J. L.; Yuan, L.; Cho, E.; Strnad, P.; Omary, B.; Rich, K. M.; Khosla, C. *Chem. Biol.*, **2005**, *12*, 469.
102. Day, N.; Keillor, J. W. *Anal. Biochem.*, **1999**, *274*, 141.
103. Marrano, C.; de Macedo, P.; Keillor, J. W. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 1923.
104. Marrano, C.; de Macedo, P.; Gagnon, P.; Lapierre, D.; Gravel, C.; Keillor, J. W. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 3231.
105. Keillor, J. W.; Chica, R. A.; Chabot, N.; Vinci, V.; Pardin, C.; Fortin, E.; Gillet, S. M. F. G.; Nakano, Y.; Kaartinen, M. T.; Pelletier, J. N.; Lubell, W. D. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, **2008**, *86*, 271.
106. Halim, D.; Caron, K.; Keillor, J. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 305.
107. Gross, M.; Whetzel, N. K.; Folk, J. E. *J. Biol. Chem.*, **1975**, *250*, 4648.
108. Keillor, J. W.; Chabot, N.; Roy, I.; Mulani, A.; Leogane, O.; Pardin, C. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **2011**, *78*, 415.
109. Bergamini, C. M.; Signorini, M. *Biochem. J.*, **1993**, *291*, 37.
110. Begg, G. E.; Carrington, L.; Stokes, P. H.; Matthews, J. M.; Wouters, M. A.; Husain, A.; Lorand, L.; Iismaa, S. E.; Graham, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, *103*, 19683.
111. Begg, G. E.; Iismaa, S. E.; Carrington, L.; Holman, S.; Husain, A.; Graham, R. M. *FEBS J.*, **2005**, *272*, 408.

112. Case, A.; Stein, R. L. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 1106.
113. Duval, E.; Case, A.; Stein, R. L.; Cuny, G. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 1885.
114. Klock, C.; Jin, X.; Choi, K. H.; Khosla, C.; Madrid, P. B.; Spencer, A.; Raimundo, B. C.; Boardman, P.; Lanza, G.; Griffin, J. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 2692.
115. Chica, R. A.; Gagnon, P.; Keillor, J. W.; Pelletier, J. N. *Protein Sci.*, **2004**, *13*, 979.
116. Pardin, C.; Pelletier, J. N.; Lubell, W. D.; Keillor, J. W. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 5766.
117. Pardin, C.; Roy, I.; Lubell, W. D.; Keillor, J. W. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2008**, *72*, 189.
118. Pardin, C. (2007). *Synthèse et évaluation cinétique d'inhibiteurs de la Transglutaminase tissulaire*. (Thèse de doctorat inédite). Université de Montréal.
119. Pardin, C.; Roy, I.; Chica, R. A.; Bonneil, E.; Thibault, P.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Keillor, J. W. *Biochemistry*, **2009**, *48*, 3346.
120. Nassal, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 7540.
121. Brunner, J. *Annu. Rev. Biochem.*, **1993**, *62*, 483.
122. Das, J.; Zhou, X. J.; Miller, K. W. *Protein Sci.*, **2006**, *15*, 2107.
123. Ziebell, M. R.; Nirthanan, S.; Husain, S. S.; Miller, K. W.; Cohen, J. B. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 17640.
124. Gentile, V.; Saydak, M.; Chiocca, E. A.; Akande, O.; Birckbichler, P. J.; Lee, K. N.; Stein, J. P.; Davies, P. J. A. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 478.
125. Ikura, K.; Nasu, T.; Yokota, H.; Tsuchiya, Y.; Sasaki, R.; Chiba, H. *Biochemistry*, **1988**, *27*, 2898.
126. Smith, D. B.; Johnson, K. S. *Gene*, **1988**, *67*, 31.
127. Chakravarthi, S.; Jessop, C. E.; Bulleid, N. J. *EMBO Rep.*, **2006**, *7*, 271.
128. Miyata, O.; Shinada, T.; Ninomiya, I.; Naito, T. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 3519.
129. Kashima, C.; Takahashi, K.; Hosomi, A. *Heterocycles*, **1996**, *42*, 241.
130. Hu, B. H.; Messersmith, P. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14298.
131. Church, R. F. R.; Weiss, M. J. *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 2465.
132. Walter, M.; Lindhorst, T. K. *Synthesis-Stuttgart*, **2006**, 952.

133. Sadakane, Y.; Hatanaka, Y. *Anal. Sci.*, **2006**, *22*, 209.
134. Roy, I.; Smith, O.; Clouthier, C. M.; Keillor, J. W. *Protein Expression Purif.*, **2013**, *87*, 41.
135. Gillet, S. M. F. G.; Chica, R. A.; Keillor, J. W.; Pelletier, J. N. *Protein Expression Purif.*, **2004**, *33*, 256.
136. Shi, Q. L.; Kim, S. Y.; Blass, J. P.; Cooper, A. J. L. *Protein Expression Purif.*, **2002**, *24*, 366.
137. Lai, T. S.; Slaughter, T. F.; Koropchak, C. M.; Haroon, Z. A.; Greenberg, C. S. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 31191.
138. Bergamini, C. M. *FEBS Lett.*, **1988**, *239*, 255.
139. Noguchi, K.; Ishikawa, K.; Yokoyama, K.; Ohtsuka, T.; Nio, N.; Suzuki, E. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 12055.
140. Yee, V. C.; Pedersen, L. C.; Letrong, I.; Bishop, P. D.; Stenkamp, R. E.; Teller, D. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1994**, *91*, 7296.
141. Han, B. G.; Cho, J. W.; Cho, Y. D.; Jeong, K. C.; Kim, S. Y.; Lee, B. I. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2010**, *47*, 190.
142. Stammaes, J.; Pinkas, D. M.; Fleckenstein, B.; Khosla, C.; Sollid, L. M. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 25402.
143. Folk, J. E.; Cole, P. W. *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 5518.
144. Connellan, J. M.; Chung, S. I.; Whetzel, N. K.; Bradley, L. M.; Folk, J. E. *J. Biol. Chem.*, **1971**, *246*, 1093.
145. Chung, S. I.; Folk, J. E. *J. Biol. Chem.*, **1970**, *245*, 681.
146. Chica, R. A. (2006). *Modification de la spécificité de la transglutaminase par une approche semi-aléatoire : un nouvel outil pour la synthèse des peptides*. (Thèse de doctorat inédite). Université de Montréal.
147. Ahvazi, B.; Kim, H. C.; Kee, S. H.; Nemes, Z.; Steinert, P. M. *EMBO J.*, **2002**, *21*, 2055.
148. Sali, A.; Blundell, T. L. *J. Mol. Biol.*, **1993**, *234*, 779.
149. Lovell, S. C.; Davis, I. W.; Arendall, W. B., 3rd; de Bakker, P. I.; Word, J. M.; Prisant, M. G.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Proteins*, **2003**, *50*, 437.
150. Hoofft, R. W.; Vriend, G.; Sander, C.; Abola, E. E. *Nature*, **1996**, *381*, 272.

151. Sippl, M. J. *Proteins*, **1993**, *17*, 355.
152. Hengen, P. N. *Trends Biochem. Sci.*, **1995**, *20*, 285.
153. Hochuli, E.; Bannwarth, W.; Dobeli, H.; Gentz, R.; Stuber, D. *Bio-Technol*, **1988**, *6*, 1321.
154. Terpe, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, *60*, 523.
155. Lata, S.; Reichel, A.; Brock, R.; Tampe, R.; Piehler, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10205.
156. Nieba, L.; Nieba-Axmann, S. E.; Persson, A.; Hamalainen, M.; Edebratt, F.; Hansson, A.; Lidholm, J.; Magnusson, K.; Karlsson, A. F.; Pluckthun, A. *Anal. Biochem.*, **1997**, *252*, 217.
157. Lai, T. S.; Santiago, M. A.; Achyuthan, K. E.; Greenberg, C. S. *Protein Expression Purif.*, **1994**, *5*, 125.
158. Ho, S. N.; Hunt, H. D.; Horton, R. M.; Pullen, J. K.; Pease, L. R. *Gene*, **1989**, *77*, 51.
159. Lin, K.; Kurland, I.; Xu, L. Z.; Lange, A. J.; Pilkis, J.; el-Maghrabi, M. R.; Pilkis, S. J. *Protein Expr Purif*, **1990**, *1*, 169.
160. Liao, H. H. *Protein Expr Purif*, **1991**, *2*, 43.
161. Baneyx, F. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1999**, *10*, 411.
162. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning : a Laboratory Manual* (2<sup>e</sup> éd.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
163. Studier, F. W. *Protein Expression Purif.*, **2005**, *41*, 207.
164. Slaughter, T. F.; Achyuthan, K. E.; Lai, T. S.; Greenberg, C. S. *Anal. Biochem.*, **1992**, *205*, 166.
165. Jeitner, T. M.; Fuchsbauer, H. L.; Blass, J. P.; Cooper, A. J. L. *Anal. Biochem.*, **2001**, *292*, 198.
166. Lorand, L.; Campbell-Wilkes, L. K.; Cooperstein, L. *Anal. Biochem.*, **1972**, *50*, 623.
167. Castonguay, R.; Lherbet, C.; Keillor, J. W. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 4185.
168. Stone, S. R.; Hofsteenge, J. *Biochem. J.*, **1985**, *230*, 497.
169. Gothelf, K. V.; Jorgensen, K. A. *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 863.
170. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057.

171. Hsu, C. H.; Stedeford, T.; Okochi-Takada, E.; Ushijima, T.; Noguchi, H.; Muro-Cacho, C.; Holder, J. W.; Banasik, M. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, **2007**, *25*, 155.
172. Miller, R. D.; Reiser, O. *J. Heterocycl. Chem.*, **1993**, *30*, 755.
173. Frantz, D. E.; Fässler, R.; Carreira, E. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 1806.
174. Goodyer, C. L. M.; Chinje, E. C.; Jaffar, M.; Stratford, I. J.; Threadgill, M. D. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 4189.
175. Cavender, C. J.; Shiner, V. J. *J. Org. Chem.*, **1972**, *37*, 3567.
176. Nyffeler, P. T.; Liang, C. H.; Koeller, K. M.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 10773.
177. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004.
178. Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *16*, 4467.
179. Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1978**, 537.
180. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.*, **1970**, *34*, 595.
181. Lieber, E.; Rao, C. N. R.; Chao, T. S.; Hoffman, C. W. W. *Anal. Chem.*, **1957**, *29*, 916.
182. Carceller, E.; Salas, J.; Merlos, M.; Giral, M.; Ferrando, R.; Escamilla, I.; Ramis, J.; García-Rafanell, J.; Forn, J. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 3001.
183. Berger, S.; Braun, S. (2004). *200 and More NMR Experiments : a Practical Course* (3<sup>e</sup> éd.). Leipzig: Wiley-VCH.
184. Song, A.; Wang, X.; Lam, K. S. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 1755.
185. Corey, E. J.; Chaykovsky, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 1353.
186. Paxton, R. J.; Taylor, R. J. K. *Synlett*, **2007**, *2007*, 0633.
187. Corey, E. J.; Chaykovsky, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 3782.
188. Tang, S. B.; He, J. M.; Sun, Y. Q.; He, L.; She, X. G. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 3982.
189. Porcheddu, A.; De Luca, L.; Giacomelli, G. *Synlett*, **2009**, *2009*, 2149.
190. Chenault, J.; Dupin, J.-F. E. *Synthesis*, **1987**, *1987*, 498.
191. Corey, E. J.; Fuchs, P. L. *Tetrahedron Lett.*, **1972**, *13*, 3769.

192. Hwang, G. T.; Son, H. S.; Ku, J. K.; Kim, B. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 11241.
193. Eckert, T.; Ipaktschi, J. *Synth. Commun.*, **1998**, *28*, 327.
194. Katritzky, A. R.; Zhang, Y.; Singh, S. K. *Synthesis*, **2003**, *2003*, 2795.
195. Hutchins, R. O.; Rotstein, D.; Natale, N.; Fanelli, J.; Dimmel, D. *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 3328.
196. Michaelis, L.; Menten, M. L. *Biochem. Z.*, **1913**, *49*, 333.
197. Michaelis, L.; Menten, M. L.; Johnson, K. A.; Goody, R. S. *Biochemistry*, **2011**, *50*, 8264.
198. Cleland, W. W. *Biochim. Biophys. Acta*, **1963**, *67*, 104.
199. Cleland, W. W. *Biochim. Biophys. Acta*, **1963**, *67*, 173.
200. Cleland, W. W. *Biochim. Biophys. Acta*, **1963**, *67*, 188.
201. Cleland, W. W. *Nature*, **1963**, *198*, 463.
202. Cleland, W. W. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **1967**, *29*, 1.
203. Silverman, R. B. (2000). *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. San Diego, CA: Academic Press.
204. Cornish-Bowden, A.; Jamin, M.; Valdur, S. (2005). *Cinétique enzymatique*. Les Ulis, France: EDP sciences.
205. Cook, P. F.; Cleland, W. W. (2007). *Enzyme Kinetics and Mechanism*. London: Garland Science.
206. Copeland, R. A. (2013). *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists* (2<sup>e</sup> éd.). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons.
207. McNae, I. W.; Kan, D.; Kontopidis, G.; Patterson, A.; Taylor, P.; Worrall, L.; Walkinshaw, M. D. *Crystallogr. Rev.*, **2005**, *11*, 61.
208. Skinner, A. L.; Laurence, J. S. *J. Pharm. Sci.*, **2008**, *97*, 4670.
209. Levinthal, C.; Wodak, S. J.; Kahn, P.; Dadivanian, A. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1975**, *72*, 1330.
210. Meng, E. C.; Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. *J. Comput. Chem.*, **1992**, *13*, 505.
211. Whitesides, G. M.; Krishnamurthy, V. M. *Q. Rev. Biophys.*, **2005**, *38*, 385.

212. Akashi, S. *Med. Res. Rev.*, **2006**, 26, 339.
213. Schagger, H.; von Jagow, G. *Anal. Biochem.*, **1991**, 199, 223.
214. Berezovski, M.; Krylov, S. N. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 13674.
215. Fillion, D.; Deraet, M.; Holleran, B. J.; Escher, E. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 2200.
216. Das, J.; Zhou, X.; Miller, K. W. *Protein Sci.*, **2006**, 15, 2107.
217. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.*, **1998**, 19, 1639.
218. Keillor, J. W. *Chem. Biol.*, **2005**, 12, 410.
219. Clouthier, C. M.; Mironov, G. G.; Okhonin, V.; Berezovski, M. V.; Keillor, J. W. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 12464.
220. Addona, G. H.; Husain, S. S.; Stehle, T.; Miller, K. W. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 25685.
221. Hatanaka, Y.; Hashimoto, M.; Kanaoka, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 453.
222. Chaiet, L.; Wolf, F. J. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1964**, 106, 1.
223. Green, N. M. *Adv. Protein Chem.*, **1975**, 29, 85.
224. Launer, H. F.; Fraenkel-Conrat, H. *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 125.
225. Chabot, N.; Franck, S.; Keillor, J. W. Résultats non publiés.
226. Beynon, R. J.; Bond, J. S. (1989). *Proteolytic Enzymes : a Practical Approach*. Oxford, New York: Oxford University Press.
227. Upadhya, K.; Khattak, I. K.; Mullah, B. *Nucleo. Nucleot. Nucl.*, **2005**, 24, 919.
228. Garlick, R. K.; Giese, R. W. *Biochem. J.*, **1990**, 268, 611.
229. Chabot, N.; Keillor, J. W. Résultats non publiés.
230. Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. *Nucl. Acids Res.*, **1994**, 22, 4673.
231. Laemmli, U. K. *Nature*, **1970**, 227, 680.

