

2M 11. 2786 . 7

11324100
v.016

Université de Montréal

Études mécanistiques de l'étape d'acylation de la transglutaminase
tissulaire de foie de cobaye

par

Nicolas Henri Day
Département de Chimie
Université de Montréal
Faculté des Arts et Sciences

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

8 novembre 1999

© Nicolas Henri Day 1999



F. 3885.11112

QD
3
U54
2000
V016

University of Toronto

Faculty of Arts
Department of History

History 100
Section 001
Lecturer: Dr. [Name]
Lecturer: Dr. [Name]
Lecturer: Dr. [Name]

Memorandum
Date: [Date]
To: [Name]
From: [Name]

Dr. [Name]

Dr. [Name]



Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:

Études mécanistiques de l'étape d'acylation de la transglutaminase
tissulaire de foie de cobaye

présenté par:

Nicolas Henri Day

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. J. W. Keillor (Département de Chimie, Université de Montréal)

Dr. J. D. Wuest (Département de Chimie, Université de Montréal)

Dr. H. Dugas (Département de Chimie, Université de Montréal)

Mémoire accepté le: 2000-03-21

À ma mère, mon père et ma grand-mère,

*qui m'ont tous toujours encouragé
à rester intéressé et à donner mon tout.*

Sommaire

Les enzymes rendent possibles des milliers de réactions chimiques chez les vivants et ce, même dans des conditions douces (température ambiante, pH physiologique/neutre, etc...). Par exemple, une réaction qui ne pourrait se dérouler sans catalyseur qu'à une température très élevée pourrait se dérouler, à l'intérieur du corps humain, à 37 °C à l'aide d'enzymes. Les enzymes sont spécifiques à certaines molécules et très bien régulées. Sans elles, la vie ne pourrait pas exister. Mais que se passe-t-il lorsqu'une enzyme ne fonctionne pas ou fonctionne mal? Il faudrait pouvoir réguler l'enzyme. Pour faire ceci, il est nécessaire de connaître son mécanisme. Une fois cette importante information en main, il est possible de développer des inhibiteurs pour l'enzyme, nous permettant ainsi de la contrôler à notre désir.

La transglutaminase (R-glutaminy-peptide, amine- γ -glutamyl-transférase (E.C. 2.3.2.13)) fait partie de la famille des aminoacyltransférases. Elle catalyse l'incorporation de liens ϵ -(γ -glutamyl)-lysine entre protéines en transférant le groupe acyle d'un donneur amide (Gln) à un accepteur amine (Lys). Elle est impliquée dans plusieurs processus et désordres biologiques tels que la stabilisation des caillots de sang, le développement des cataractes dans les cristallins humains, l'apoptose des cellules immunitaires provoquée par le VIH, la formation des plaques d'amyloïdes associées à la maladie d'Alzheimer et le psoriasis (un désordre de la peau dû à l'activité non-réglée de l'enzyme). Notre groupe de recherche a comme but de déterminer le mécanisme d'action de cette enzyme, ce qui pourrait s'avérer très utile dans le développement de nouvelles drogues inhibant l'enzyme. Alors, les désordres précédemment nommés pourront être contrôlés.

Ce mémoire traite de plusieurs sujets: l'isolation et la purification de la transglutaminase à partir de foies de cobayes, la synthèse de divers substrats et inhibiteurs analogues, le développement d'une méthode efficace, pratique et simple

pour pouvoir suivre des études cinétiques avec l'enzyme et finalement, des études cinétiques avec les molécules synthétisées.

Une méthode améliorée de purification de la TGase a été mise au point, ce qui nous a permis d'obtenir de l'enzyme purifiée, en grande quantité et possédant une activité enzymatique très élevée. Les résultats de cette recherche ont été publiés (18).

Deux groupes de substrats ont été préparés: des analogues fluorés de la propionamide et des analogues de la *N*-carbobenzyloxy-glutaminy glycine (soit des *Z*-glutamyl (γ -*p*-anilide) glycine), un substrat très connu de l'enzyme. Les composés fluorés n'ont pas présenté d'activité détectable, tandis que les analogues de la *Z*-Gln-Gly ont démontré de la reconnaissance envers l'enzyme comme inhibiteurs non-compétitifs en présence de *Z*-Gln-Gly. La synthèse de la série d'anilines a aussi été publiée (19).

Puisque les études cinétiques de ces substrats ne pouvaient pas être faites par une méthode directe à n'importe quel pH et en utilisant une gamme variée de substrats, un système bio-analytique à enzyme liée a été développé. Ce système incorpore l'utilisation d'une deuxième enzyme, la glutamate déshydrogénase (E.C. 1.4.1.3). Celle-ci se sert de l'ammoniac libéré durant le cycle catalytique de la transglutaminase et l'utilise pour faire une cascade de trois réactions, incluant l'oxydation du NADH (β -nicotinamide-adénine dinucléotide) en NAD^+ , ce qui peut être suivi à 340 nm grâce au spectrophotomètre UV-visible. Cette nouvelle méthode a aussi été publiée (21).

À l'aide de cette méthode, des études cinétiques ont pu être faites en utilisant les composés synthétisés. De plus, des études pH-activité sur la transglutaminase ont été réalisées, nous donnant de l'information importante sur l'identité des acides aminés impliqués au site actif lors de la réaction de catalyse enzymatique.

Table des Matières

Sommaire	iv
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xv
Liste des schémas	xvii
Liste des équations	xix
Liste des abbréviations	xx
Remerciements	xxii

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION 1

1-1 - MISE EN SITUATION: LES CATALYSES CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE.....	1
1-1-1 - <i>Les catalyses chimique et enzymatique</i>	1
1-1-2 – <i>Cinétiques des réactions catalysées par les enzymes: le modèle Michaelis-Menten</i>	2
1-2 - LA TRANSGLUTAMINASE	5
1-3 - TYPES DE TRANSGLUTAMINASE ET LEURS RÔLES	6
1-4 - LE MÉCANISME ENZYMATIQUE.....	7
1-5 - LE BUT DU PROJET	8

CHAPITRE 2 - PURIFICATION DE TRANSGLUTAMINASE PROVENANT DE FOIE DE COBAYES 11

2-1 - INTRODUCTION.....	11
2-2 - OBJECTIFS	12
2-2-1 - <i>Critères pour l'enzyme</i>	12
2-2-2 - <i>Définition d'unité d'activité et d'activité spécifique pour l'enzyme</i>	12
2-3 - PURIFICATION DE L'ENZYME	13

2-3-1 - Méthodes de purification déjà connues	13
2-3-2 – Problèmes rencontrés avec les méthodes déjà connues.....	14
2-4 - RÉSULTATS ET DISCUSSION DE LA PURIFICATION MODIFIÉE.....	15
2-4-1 - Modifications des procédures publiées.....	15
2-4-2 - Analyse de la pureté de l'enzyme isolée.....	22
2-5 - CONCLUSIONS	23

CHAPITRE 3 – PRÉPARATION DES SUBSTRATS ANALOGUES UTILISÉS DANS LES ÉTUDES CINÉTIQUES

3-1 - INTRODUCTION.....	25
3-1-1 – Analogues fluorés.....	25
3-1-2 – Anilides.....	28
3-1-3 – <i>N-Z-L-glutamyl(5-N-méthylamide)glycine</i>	30
3-2 - ANALOGUES FLUORÉS	31
3-3 - ANILIDES.....	36
3-3-1 - Préparation des amines	36
3-3-2 - Préparation du <i>N-Z-γ-tert-butyl glutamylglycine éthyl ester</i>	39
3-3-3 – Couplage du dipeptide et de l'amine.....	40
3-4 - <i>N-CARBOBENZYLOXY-γ-(N-MÉTHYL) GLUTAMYLGLYCINE</i>	41
3-5 - CONCLUSION.....	43

CHAPITRE 4 – UNE MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE CONTINUE À ENZYME COUPLÉE POUR SUIVRE LES CINÉTIQUES DE LA TRANSGLUTAMINASE

4-1 - INTRODUCTION.....	44
4-1-1 - Objectif.....	44
4-1-2 – <i>La glutamate déshydrogénase (GDH)</i>	45
4-2 – RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	47
4-2-1 - Conditions de base.....	47

4-2-2 - <i>Modification du tampon</i>	48
4-2-3 - <i>Détermination de la concentration de GDH à utiliser</i>	49
4-2-4 - <i>Détermination des quantités de TGase et de NADH à utiliser</i>	52
4-2-5 - <i>Tests de compatibilité entre la GDH et la TGase</i>	54
4-2-6 - <i>Tests d'inhibition de la TGase en présence de co-substrats pour la GDH</i>	55
4-2-7 - <i>Vérification que la TGase n'utilise pas la GDH comme substrat</i>	56
4-2-8 - <i>Conditions finales</i>	58
4-3 - RÉSULTATS CINÉTIQUES OBTENUS	59
4-4 - CONCLUSION	65
CHAPITRE 5 – PROFIL pH DE LA TRANSGLUTAMINASE	66
5-1 - INTRODUCTION.....	66
5-2 – EXPÉRIENCES CONTRÔLES	68
5-2-1 – <i>Effet du pH sur la stabilité de la TGase</i>	68
5-2-2 – <i>Effet du pH sur la stabilité de la GDH</i>	71
5-3 – RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION DES PROFILS PH.....	73
5-3-1 – <i>Z-Gln-Gly</i>	73
5-3-2 – <i>N,N-Diméthylcaséine</i>	77
5-4 – ANALYSE ET DISCUSSION DES PROFILS PH	81
5-5 – CONCLUSIONS.....	85
CHAPITRE 6 – ÉTUDES CINÉTIQUES DE DIVERS AMIDES AVEC LA TRANSGLUTAMINASE	87
6-1 - INTRODUCTION.....	87
6-1-1 – <i>Mise en situation</i>	87
6-1-2 – <i>Types d'inhibition</i>	88
6-2 – COMPOSÉS FLUORÉS	91
6-2-1 – <i>Mise en situation</i>	91

6-2-2 – <i>Étude des propionamides</i>	92
6-2-3 – <i>Conclusions</i>	96
6-3 – ANILIDES	96
6-3-1 – <i>Mise en situation</i>	96
6-3-2 – <i>Étude de la N-Z-L-glutamyl(γ-p-méthylanilide)glycine</i>	98
6-3-3 – <i>Étude de la N-Z-L-glutamyl(γ-p-chloroanilide)glycine</i>	99
6-3-4 – <i>Conclusions</i>	101
6-4 – N-Z-L-GLUTAMYL(5-N-MÉTHYLAMIDE)GLYCINE.....	102

CHAPITRE 7 - CONCLUSION 106

CHAPITRE 8: PROCÉDURES POUR LA PURIFICATION DE LA TRANSGLUTAMINASE PROVENANT DU FOIE DE COBAYE 108

8-1 - MATÉRIEL UTILISÉ.....	108
8-2 - PROCÉDURES POUR LES MÉTHODES DE DOSAGE UTILISÉES	108
8-2-1 - <i>Concentration de protéines</i>	108
8-2-2 - <i>Activité de la transglutaminase</i>	109
8-3 - PROCÉDURES POUR LA PURIFICATION.....	110
8-3-1 - <i>Étape 1: Préparation du surnageant de foies</i>	110
8-3-2 - <i>Étape 2: Chromatographie échangeuse d'ions</i>	111
8-3-3 - <i>Étape 3: Précipitation et extraction par sulfate de protamine</i>	111
8-3-4 - <i>Étape 4: Chromatographie d'exclusion de taille</i>	112
8-4 - ANALYSES DE L'ENZYME PURIFIÉE PAR ÉLECTROPHORÈSE.....	113
8-4-1 - <i>Électrophorèse</i>	113
8-4-2 - <i>Méthodes de révélation utilisées pour les gels</i>	114
8-4-3 - <i>Analyse des gels pour déterminer le degré de pureté</i>	115

CHAPITRE 9: SYNTHÈSE DES SUBSTRATS UTILISÉS POUR LES ÉTUDES CINÉTIQUES AVEC LA TRANSGLUTAMINASE..... 116

9-1 - GÉNÉRALITÉS	116
9-1-1 – Origine des produits utilisés.....	116
9-1-2 – Analyse des composés synthétisés	116
9-2 – SYNTHÈSE DES COMPOSÉS	117
9-2-1 – Anhydride de l'acide <i>p</i> -chlorobenzoïque (3.1)	117
9-2-2 - Anhydride de l'acide <i>p</i> -toluïque (3.2).....	118
9-2-3 – <i>p</i> -Chlorobenzamide (3.3).....	119
9-2-4 - <i>p</i> -Toluamide (3.4).....	120
9-2-5 – <i>p</i> -Chloroaniline (3.5).....	121
9-2-6 - <i>p</i> -Toluidine (3.6)	123
9-2-7 - <i>N</i> -Z-glutamylglycine éthyl ester (3.7)	125
9-2-8 - <i>N</i> -Z- <i>L</i> -glutamyl(γ - <i>p</i> -chloroanilide)glycine (3.8).....	127
9-2-9 - <i>N</i> -Z- <i>L</i> -glutamyl(γ - <i>p</i> -méthylanilide)glycine (3.9).....	130
9-2-10 - <i>N</i> -carbobenzyloxy-acide <i>L</i> -glutamique-5-méthyl ester (3.10)	133
9-2-11 - <i>N</i> -carbobenzyloxy- γ -(<i>N</i> -méthyle) glutaminyl glycine (3.11).....	134
9-2-12 - 2,2,3,3,3-Pentafluoropropionamide (3.12)	136
9-2-13 - 2,2-Difluoropropionamide (3.13)	137
9-2-14 - 2-fluoropropionamide (3.14)	139

CHAPITRE 10: MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE CONTINUE À ENZYME COUPLÉE POUR SUIVRE LES CINÉTIQUES DE LA TRANSGLUTAMINASE..... 141

10-1 - GÉNÉRALITÉS	141
10-1-1 – Origine des produits utilisés.....	141
10-1-2 – Instruments utilisés.....	141
10-1-2 – Définition d'une unité (U) d'activité de GDH.....	142

10-2 - PROCÉDURES	142
10-3 – INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.....	143
10-4 - INTERPRÉTATION DES PROFILS pH	145
RÉFÉRENCES.....	149

Figures

Figure 1	2
Comparaison entre une réaction chimique et une réaction enzymatique à l'aide d'un profil d'énergie libre.	
Figure 2	4
Graphique de type Michaelis-Menten d'une réaction enzymatique dans des conditions saturantes.	
Figure 3	5
Réaction catalysée par la transglutaminase sur deux molécules de fibrine.	
Figure 4	8
Mécanisme «ping-pong» modifié du transfert de γ -glutamyl catalysé par la TGase.	
Figure 5	9
Substrats synthétisés pour études cinétiques.	
Figure 6	14
Survol des étapes de purification de la TGase.	
Figure 7	17
Chromatogramme obtenu pour la colonne de chromatographie à échange d'ions qui démontre l'activité spécifique et la concentration de protéines des fractions conservées en fonction de la composition du gradient d'éluion.	
Figure 8	19
Chromatogramme de la colonne d'exclusion de taille démontrant l'activité spécifique et la concentration de protéines des fractions récoltées en fonction du volume élué.	
Figure 9	21
Gels d'électrophorèse SDS-PAGE de la solution finale de TGase purifiée.	
Figure 10	26
Effets des groupes fluorés sur la propionamide. Les nuages représentent le potentiel électrostatique des atomes.	

Figure 11	37
Valeurs de pK_a pour les anilines parentes des anilides synthétisés.	
Figure 12	45
Résumé des réactions impliquées dans le mécanisme de la TGase.	
Figure 13	47
La méthode spectrophotométrique continue à enzyme couplée GDH-TGase.	
Figure 14	57
Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de l'expérience d'incorporation de fluorescence.	
Figure 15	62
Détermination des paramètres cinétiques de la réaction enzymatique d'aminolyse impliquant de la Z-Gln-Gly comme donneur acyle avec de la <i>N</i> -acétyl lysine méthyl ester comme accepteur acyle à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH.	
Figure 16	63
Détermination des paramètres cinétiques de la réaction enzymatique d'aminolyse impliquant de la Z-Gln-Gly comme donneur acyle avec de la méthylamine comme accepteur acyle à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH.	
Figure 17	64
Détermination des paramètres cinétiques de la réaction enzymatique d'hydrolyse impliquant de la Z-Gln-Gly comme donneur acyle avec de l'eau comme accepteur acyle (hydrolyse) à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH.	
Figure 18	72
Effet du pH sur l'activité de la GDH et de la TGase.	
Figure 19	74
Effet du pH sur l'affinité de la TGase envers la Z-Gln-Gly.	
Figure 20	75
Effet du pH sur la vitesse de réaction de la TGase avec la Z-Gln-Gly.	

Figure 21	76
Effet du pH sur l'efficacité de la réaction entre la TGase et la Z-Gln-Gly.	
Figure 22	78
Effet du pH sur l'affinité de la TGase envers la <i>N,N</i> -diméthylcaséine.	
Figure 23	79
Effet du pH sur la vitesse de réaction de la TGase avec <i>N,N</i> -diméthylcaséine.	
Figure 24	80
Effet du pH sur l'efficacité de la réaction entre la TGase et la <i>N,N</i> -diméthylcaséine.	
Figure 25	82
Effet du pH sur le log de la vitesse de la réaction entre la TGase et la Z-Gln-Gly.	
Figure 26	83
Effet du pH sur le log de la vitesse de la réaction entre la TGase et la <i>N,N</i> -diméthylcaséine.	
Figure 27	89
Graphique de type Dixon d'un exemple théorique d'inhibition compétitive.	
Figure 28	90
Graphique de type Dixon d'un exemple théorique d'inhibition non-compétitive.	
Figure 29	91
Graphique de type Dixon d'un exemple théorique d'inhibition incompétitive.	
Figure 30	94
Études cinétiques du propionamide avec la TGase.	
Figure 31	95
Études cinétiques du pentafluoropropionamide avec la TGase.	
Figure 32	99
Graphique de type Dixon pour l'inhibition de la TGase par de la <i>N-Z-L</i> -glutamyl(γ - <i>p</i> -méthylanilide)glycine.	

Figure 33	100
Graphique de type Dixon pour l'inhibition de la TGase par de la <i>N-Z-L-glutamyl(γ-<i>p</i>-chloroanilide)glycine.</i>	
Figure 34	103
Graphique de type Dixon pour l'inhibition de la TGase par de la <i>N-Z-L-glutamyl(5-<i>N</i>-méthylamide)glycine.</i>	
Figure 35	104
Modèle de type ruban du site actif de la TGase (type Facteur XIIIa) basé sur les résultats d'une cristallographie.	
Figure 36	105
Modèle de type "space-fill" du site actif de la TGase (type Facteur XIIIa) basé sur les résultats d'une cristallographie.	

Tableaux

Tableau 1	15
Tableau comparatif de la méthode modifiée et de la méthode de Folk et Chung à différents niveaux.	
Tableau 2	27
Valeurs obtenues pour la charge et pour l'occupance du carbonyle des amides.	
Tableau 3	48
Conditions utilisées comme point de départ lors du développement de la méthode de dosage à enzyme couplée.	
Tableau 4	50
Détermination de l'activité de GDH appropriée pour les études cinétiques avec du NH ₃ .	
Tableau 5	51
Conditions modifiées utilisées lors du développement de la méthode de dosage à enzyme couplée.	
Tableau 6	52
Vitesses observées lors de la variation du nombre d'unités de GDH lors d'essais du système cinétique à enzyme couplée TGase-GDH.	
Tableau 7	53
Optimisation des quantités de TGase et de NADH à utiliser lors des essais cinétiques.	
Tableau 8	54
Troisième modification des conditions utilisées lors du développement de la méthode de dosage à enzyme couplée.	
Tableau 9	56
Tests pour inhibition pour les substrats/produits de la réaction de la GDH envers la TGase.	
Tableau 10	58
Tableau sommaire des modifications effectuées lors du développement de la méthode de dosage à enzyme couplée.	

Tableau 11	60
Constantes cinétiques pour la réaction enzymatique de la Z-Gln-Gly avec la transglutaminase en présence de divers substrats accepteurs acyles.	
Tableau 12	69
Effet du pH sur l'activité de la TGase après 30 minutes d'incubation dans un tampon donné.	
Tableau 13	71
Facteur de correction pour études cinétiques à pH variés.	
Tableau 14	93
Études cinétiques du propionamide avec la TGase.	
Tableau 15	93
Études cinétiques du pentafluoropropionamide avec la TGase.	

Schémas

Schéma 1	13
Test d'activité de la TGase. Le produit formé, la Z-L-glutamyl(γ -hydroxamate)glycine, forme un complexe avec du fer et absorbe à 525 nm.	
Schéma 2	29
Route synthétique suivie pour obtenir les dipeptides N-Z-L-glutamyl-(γ -anilido) glycine.	
Schéma 3	30
Route synthétique suivie pour obtenir le dipeptide N-Z-L-glutamyl(5-N-méthylamide)glycine (3.11).	
Schéma 4	31
Synthèse du pentafluoropropionamide (3.12).	
Schéma 5	32
Réaction du DAST avec le carbonyle d'un aldéhyde ou d'une cétone.	
Schéma 6	33
Réaction du DAST avec un alcool.	
Schéma 7	34
Synthèse du 2,2-difluoropropionamide (3.13).	
Schéma 8	35
Synthèse du 2-fluoropropionamide (3.14).	
Schéma 9	35
Mécanisme pour la réaction d'amidation.	
Schéma 10	38
Préparation des amides via l'utilisation d'anhydrides.	
Schéma 11	39
Réarrangement de Hofmann modifié.	

Schéma 12	39
Synthèse de la <i>N-Z</i> -glutamylglycine éthyl ester (3.7).	
Schéma 13	41
Couplage DCC entre la <i>N-Z</i> -glutamylglycine éthyl ester (3.7) et les anilines synthétisées pour obtenir les anilides <i>N-Z-L</i> -glutamyl(γ - <i>p</i> -chloroanilide)glycine (3.8) et <i>N-Z-L</i> -glutamyl(γ - <i>p</i> -méthylanilide)glycine (3.9).	
Schéma 14	42
Protection de l'acide L-glutamique-5-méthyl ester par un groupe carbobenzyloxy pour obtenir du <i>N-Z</i> -acide-L-glutamique-5-méthyl ester (3.10).	
Schéma 15	42
Préparation du <i>N</i> -carbobenzyloxy- γ -(<i>N</i> -méthyl) glutamylglycine (3.11).	
Schéma 16	46
Réaction catalysée par la GDH.	

Équations

Équation 1	3
Réaction typique de Michaelis-Menten.	
Équation 2	4
Équation mathématique de Michaelis-Menten exprimant la vitesse en fonction de la concentration du substrat.	
Équation 3	89
Constante d'inhibition pour inhibition compétitive.	
Équation 4	90
Constante d'inhibition pour inhibition non-compétitive. Il existe deux possibilités pour la constante.	
Équation 5	91
Constante d'inhibition pour inhibition non-compétitive.	

Abbréviations Utilisées

A.S.	–	activité spécifique
abs	–	unité d'absorbance
BSA	–	albumine de sérum bovin
CHES	–	acide 2-[N-cyclohexylamino]éthanesulfonique
Cys	–	cystéine
DAST	–	trifluorure de diéthylaminosulfure
DCC	–	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DEAE	–	diéthylaminoéthyle
DMF	–	N,N-diméthylformamide
dpi	–	“dots per inch” = points par pouce (résolution d'une imprimante)
DTT	–	dithiothréitol
EDC	–	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
EDTA	–	éthylènediaminetétraacétique
Et ₃ N	–	triéthylamine
g	–	unité de gravité
ΔG^\ddagger	–	l'énergie de Gibbs
GDH	–	glutamate déshydrogénase
GGT	–	γ -glutamyl transpeptidase
Gln	–	L-glutamine
His	–	histidine
kDa	–	kiloDalton
K _i	–	constante d'inhibition
K _M	–	représente la constante de Michaelis
K _M ^{app}	–	représente la constante Michaelis-Menten apparente (observée)
Lys	–	lysine
MDC	–	monodansylcadavérine
MeI	–	iodure de méthyle

MES	–	acide 2-[<i>N</i> -morpholino] éthanesulfonique
MOPS	–	acide <i>N</i> -morpholinopropane sulfonique
M_r	–	masse protéinique
N_2	–	azote gazeux / atmosphère inerte
NADH	–	β -nicotinamide-adénine dinucléotide
NBS	–	<i>N</i> -bromosuccinimide
O- <i>t</i> Bu	–	<i>tert</i> -butyl ester
ppm	–	parties par million (équivalent à 1 mg/L)
SDS-PAGE	–	"sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis"
S_N2	–	substitution nucléophile de type 2
<i>t</i> -Bu	–	<i>tert</i> butyle
T.A.	–	température ambiante
TCA	–	acide trichloroacétique
t.f.	–	point de fusion
TGase	–	transglutaminase
TNCG	–	Truncated Ponder-Richard Conjugate Gradient
TRIS	–	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	–	ultraviolet
v/v	–	volume/volume
V_{max}	–	représente la vitesse maximale de la réaction
w/v	–	masse/volume
Z ou Cbz	–	carbobenzyloxy
Z-Gln-Gly	–	benzyloxycarbonyl- <i>L</i> -glutaminyglycine

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Jeffrey Keillor, pour m'avoir toujours encouragé et pour m'avoir toujours donné une indépendance au niveau de mon projet. Durant mon Baccalauréat, je ne pensait pas faire d'études supérieures. Mais après avoir fait un stage d'été avec Jeff, il m'a donné le goût de poursuivre mes études graduées en chimie. Il a toujours été très patient avec moi et m'a initié au monde de la chimie bio-organique. Non seulement était-il mon directeur de recherche, mais il est aussi devenu un bon ami.

De plus, j'aimerais remercier tout le personnel du Département de Chimie de l'Université de Montréal qui ont tous contribué à mon succès en m'aidant toujours avec un sourire.

Finalement, j'aimerais aussi remercier tous mes collègues de laboratoire, vous m'avez rendu la vie intéressante et amusante. Plus particulièrement, j'aimerais remercier Anouk, Annie et Roselyne, trois biochimistes qui ont aidé ce pauvre chimiste à faire la transition du monde de la chimie au monde de la biochimie. On a souvent travaillé tard le soir et sans elles, ces soirées n'auraient pas été très amusantes. Anouk, je n'oublierai jamais les journées de 18 heures de purification et toutes les soirées que l'ont passait à ce raconter des histoires en attendant notre enzyme bien-aimée... Bonne chance à vous tous!

J'ai passé de très bonnes années ici que je n'oublierai jamais. Merci à tous, je ne vous oublierai pas.

Chapitre 1 - Introduction

1-1 - Mise en situation: Les catalyses chimique et enzymatique

1-1-1 - Les catalyses chimique et enzymatique

Un nombre important de réactions chimiques, chacune nécessaire à la survie de l'organisme, se produit à tous les jours dans n'importe quel corps vivant. Ces réactions nécessitent, par contre, des conditions assez spécifiques (température, pH, etc...) pour se produire. Le corps vivant ne peut pas toujours fournir ces conditions et a donc recours à un catalyseur naturel pour l'aider, une enzyme. Les enzymes permettent des vitesses de réaction beaucoup plus élevées dans des conditions plus douces (température, pH, pression atmosphérique), une spécificité plus grande au niveau des substrats et la capacité d'être régulées (1). En fait, les enzymes accélèrent les réactions par un facteur d'au moins un million (2). Sans elles, la grande partie des réactions se produisant dans le corps se feraient à des vitesses peu perceptibles.

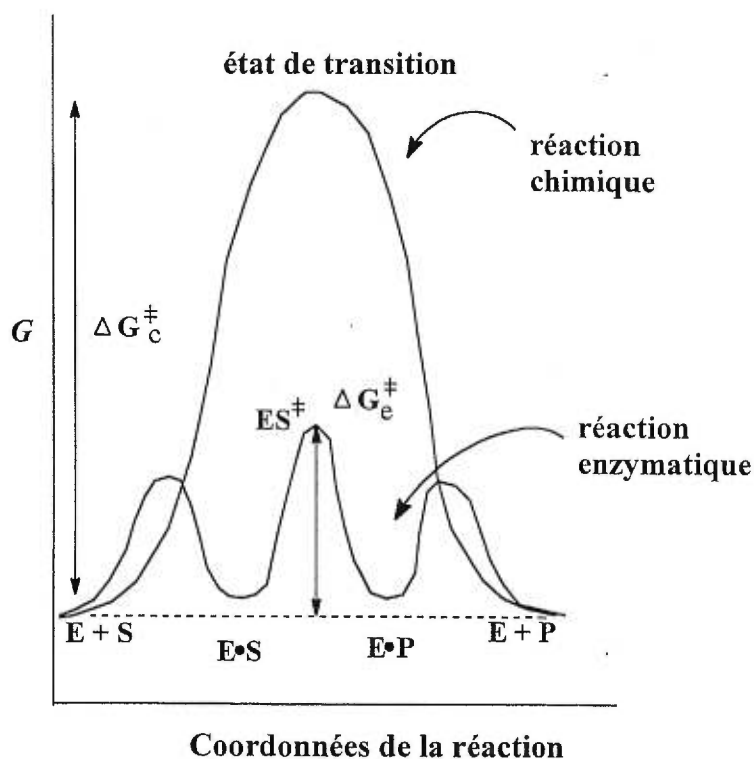
Prenons l'exemple d'une réaction chimique $S \rightarrow P$ (**Figure 1**). Le produit de départ S passe par un état de transition (qui possède une énergie plus élevée que S ou P) avant de devenir le produit P. La vitesse de la réaction $S \rightarrow P$ dépend de la différence en énergie libre (l'énergie de Gibbs, ΔG^\ddagger) entre le produit de départ S et l'état de transition.

$$\Delta G^\ddagger = G_{\text{état de transition}} - G_{\text{produit de départ S}}$$

Dans le cas d'une réaction enzymatique, le produit de départ S réagit avec l'enzyme pour former un intermédiaire enzyme-substrat (ES) "stable". Ensuite, ce

complexe passe par un état de transition dont le ΔG^\ddagger est beaucoup plus petit que celui de la réaction chimique. La barrière d'activation est donc abaissée et la réaction se déroule plus vite (2) dans des conditions plus douces.

Figure 1: Comparaison entre une réaction chimique et une réaction enzymatique à l'aide d'un profil d'énergie libre. Ici, ΔG_c^\ddagger représente l'énergie de Gibbs pour une réaction chimique et ΔG_e^\ddagger , celle pour une réaction enzymatique.



1-1-2 – Cinétiques des réactions catalysées par les enzymes: le modèle Michaelis-Menten

Lors d'une réaction enzymatique, différentes vitesses de réaction V sont

observées à différentes concentrations de substrat. À basse concentration de substrat, V semble augmenter proportionnellement à la concentration de substrat. À une concentration moyenne de substrat, V continue à augmenter, mais pas de façon proportionnelle. Finalement, à des concentrations élevées de substrat, V atteindra un certain point où elle cessera d'augmenter; elle est devenue indépendante de la concentration de substrat. C'est cet effet de saturation de l'enzyme qui a mené les chercheurs Leonore Michaelis et Maud Menten, en 1913, à proposer un modèle sur le fonctionnement des enzymes (2,3). Leur modèle propose que l'enzyme E se combine d'abord avec le substrat S pour former un complexe enzyme-substrat ES (**Équation 1**). C'est ce complexe qui, dans une deuxième étape, peut réagir pour former le produit P et régénérer l'enzyme ou de se dissocier pour redevenir E et S (3).

Équation 1: Réaction typique de Michaelis-Menten.

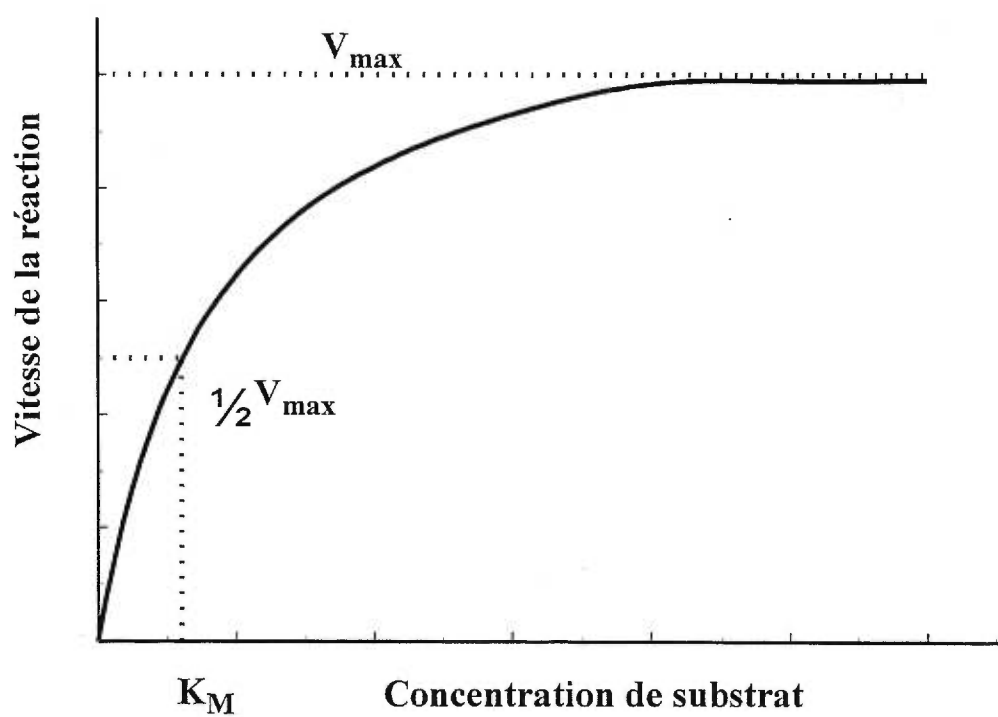


En utilisant les vitesses observées pour les différentes parties de la réaction, les deux chercheurs ont pu dériver une équation mathématique (**Équation 2**). Dans cette équation, V_{\max} représente la vitesse maximale de la réaction et K_M représente la constante de Michaelis (2,3). Nous pouvons déduire qu'à basse concentration de substrat, nous aurons $V = [S] V_{\max} / K_M$. Donc, à basse concentration de substrat, lorsque $[S]$ est beaucoup plus petit que K_M , la vitesse sera directement proportionnelle à la concentration de substrat. De même, à haute concentration de substrat (lorsque $[S]$ est beaucoup plus grand que K_M) nous pouvons déduire que $V = V_{\max}$. Ceci explique la vitesse maximale indépendante de la concentration de substrat. En posant $[S] = K_M$, nous obtenons $V = V_{\max} / 2$. Ceci nous permet de conclure que la constante de Michaelis, K_M , correspond à la concentration associée à la moitié de la valeur de V_{\max} (2) (**Figure 2**).

Équation 2: Équation mathématique de Michaelis-Menten exprimant la vitesse en fonction de la concentration du substrat.

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Figure 2: Graphique de type Michaelis-Menten d'une réaction enzymatique dans des conditions saturantes.

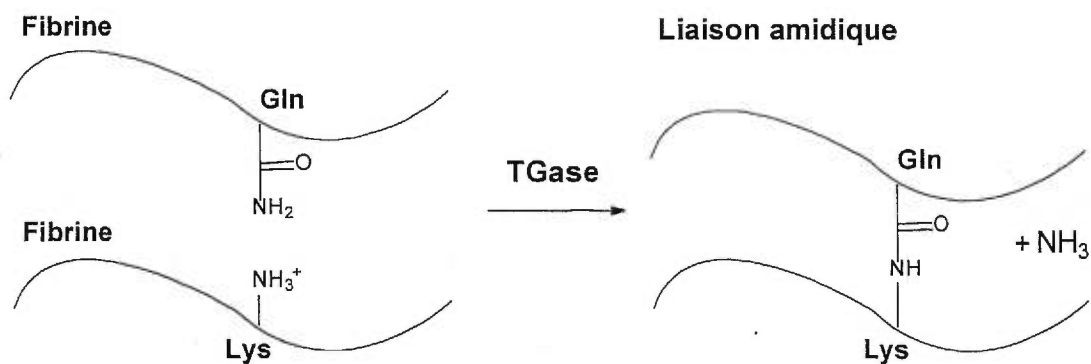


1-2 - La transglutaminase

Notre groupe de recherche a comme but de déterminer le mécanisme d'action d'enzymes de type transglutaminase (TGase). L'élucidation de ce mécanisme pourrait être très utile dans le développement de nouvelles drogues qui nous permettraient d'inhiber son activité.

La transglutaminase (R-glutaminyl-peptide, amine- γ -glutamyl-transférase (EC 2.3.2.13)) (4) est une enzyme dont l'activité dépend de la présence de calcium (Ca^{2+}). Elle fait partie de la classe d'enzymes des aminoacyltransférases (EC 2.3.2.-). La TGase catalyse un transfert acyle dans une réaction qui implique des résidus glutaminiques dans des protéines et des peptides (en tant que *donneurs* acyles) ainsi que des amines primaires (en tant qu'*accepteurs* acyles). La TGase est capable de catalyser l'incorporation de liens ϵ -(γ -glutamyl)-lysine entre protéines (**Figure 3**) en transférant le groupe acyle d'un donneur amide glutamine à un accepteur amine lysine (5,6).

Figure 3: Réaction catalysée par la transglutaminase sur deux molécules de fibrine



1-3 - Types de transglutaminase et leurs rôles

Il existe sept types de transglutaminase: Facteur XIIIa, TGase tissulaire, TGase des kératinocytes, TGase épidermale, TGase de la prostate, TGase des érythrocytes membranaires et TGase des hémocytes (7). Le type Facteur XIIIa, par exemple, est impliqué dans un processus biologique important: la stabilisation des caillots de sang (8). Le type utilisé dans notre recherche est de type tissulaire et provient de foies de cobaye. D'autres types de TGase tissulaires existent (humain, boeuf, souris, poule), mais la TGase isolée de foie de cobaye est la plus populaire au niveau de la recherche effectuée ainsi que la plus citée en littérature (9).

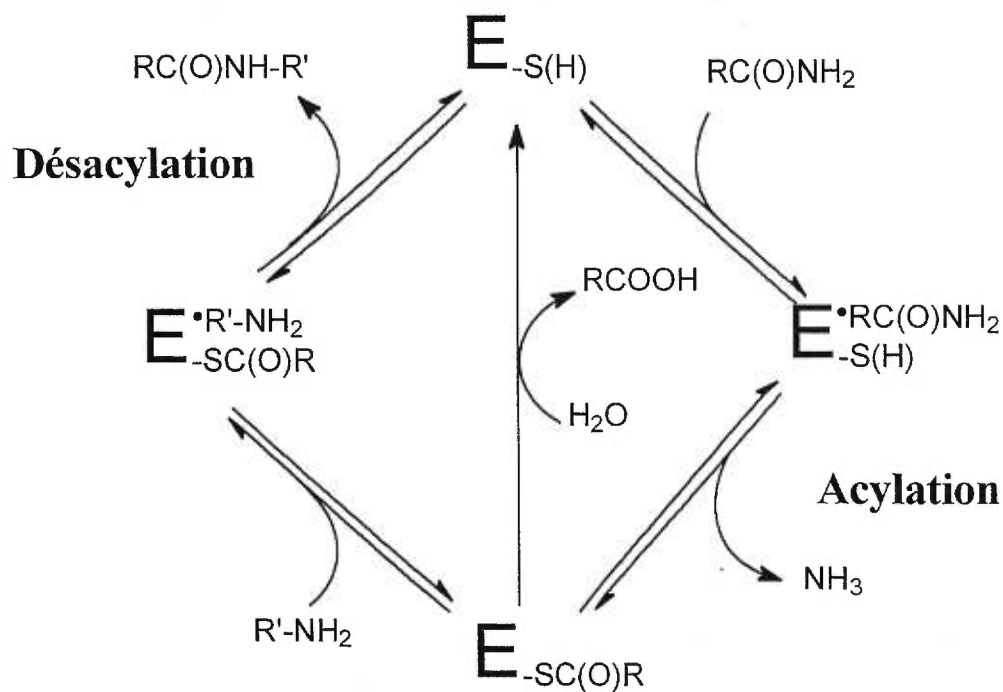
La TGase tissulaire semble être impliquée dans plusieurs désordres physiologiques dans des domaines aussi variés que la neurochimie, l'oncologie, la gastroentérologie, la pharmacologie, l'hématologie, la biologie moléculaire et la pathologie. Par exemple, des études récentes suggèrent que des événements catalysés par la TGase peuvent induire plusieurs désordres physiologiques tels que: le début de la thrombose et de l'artériosclérose (10); la formation de plaques d'amyloïdes insolubles dans le cerveau, ce qui est associé avec la maladie d'Alzheimer (11); l'inflammation intestinale induite par un excès d'albumine végétale provenant du blé, autrement connue sous le nom de maladies céliaques (12); et le développement de cataractes dans l'oeil humain causé par le dépôt de cristaux sur la lentille de l'oeil (13). De même, ces études suggèrent que l'enzyme est aussi impliquée dans des maladies neurodégénératives (par exemple, la maladie d'Huntington) qui sont associées à une augmentation de peptides contenant des polyglutamines dans le cerveau (14). Cette enzyme est aussi impliquée dans des maladies telles que l'apoptose des cellules immunitaires provoquée par le VIH (11) et la psoriasis (une condition de la peau) qui serait due à l'activité non-régulée de l'enzyme (15). Une intervention thérapeutique pour plusieurs de ces désordres nécessiterait l'utilisation d'inhibiteurs de la TGase, mettant donc l'accent sur l'importance des recherches mécanistiques de la TGase purifiée.

1-4 - Le mécanisme enzymatique

Le processus catalysé par l'enzyme contient deux étapes: l'acylation et la désacylation. Durant la première étape, l'acylation, il y a une attaque nucléophile sur le premier substrat (la glutamine) par un thiol présent dans le site actif de l'enzyme pour former un thioester. Lors de la formation de ce thioester, qui est formé en passant par un état de transition tétraédrique, il y a libération d'un équivalent d'ammoniac. Dans la seconde étape, la désacylation, une seconde attaque nucléophile se produit lorsqu'une amine primaire (une lysine présente dans un peptide, par exemple) attaque le thioester intermédiaire pour régénérer le thiol au site actif de l'enzyme. La décomposition du complexe enzyme-thioester, qui elle aussi se produit en passant par un état de transition tétraédrique, est accompagnée de la formation et de la libération d'un équivalent d'amide secondaire (5). (**Figure 4**)

Le mécanisme est de type "ping-pong" modifié (16). Un premier substrat se lie à l'enzyme pour former un complexe de type Michaelis-Menten (complexe enzyme-substrat ("ES")) et la libération d'un premier produit a lieu pour créer l'intermédiaire thioester. Ensuite, un second substrat vient se lier à l'intermédiaire (complexe "ES") pour désacyler la TGase (formation d'un complexe enzyme-produit ("EP")). Finalement, un produit ("P") est libéré et le site actif de l'enzyme est régénéré. Ce type de mécanisme est appelé "modifié" puisque le site actif de l'enzyme peut être également régénéré par l'hydrolyse de l'intermédiaire.

Figure 4: Mécanisme «ping-pong» modifié du transfert de γ -glutamyl catalysé par la TGase (16).

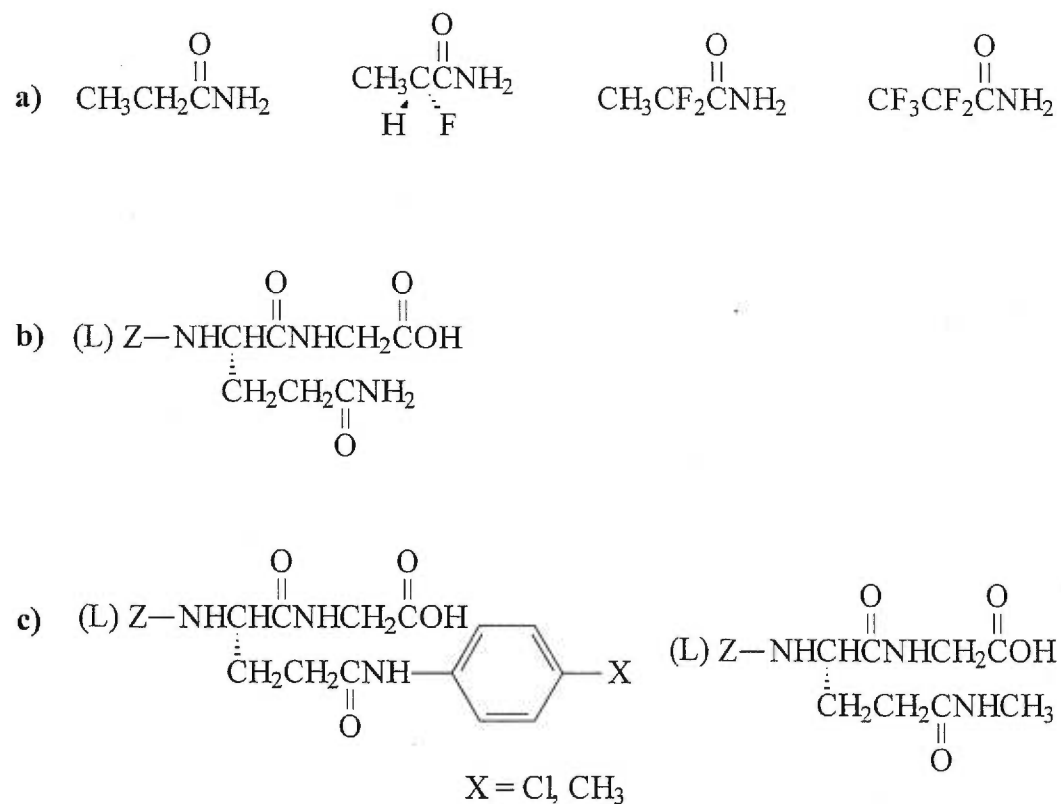


1-5 - Le but du projet

Le projet consistait à étudier la première étape du mécanisme de la TGase, soit l'étape d'acylation. Pour débiter, il a fallu isoler et purifier de la TGase à partir de foies de cobayes à partir de procédures déjà publiées (17), mais certaines modifications ont dû être apportées pour améliorer le rendement et l'activité de l'enzyme purifiée (18).

Par la suite, des substrats ont été synthétisés afin de mieux comprendre l'acylation de la TGase. Une première série de substrats consistait en une série d'analogues fluorés qui permettent d'étudier les effets d'une variation de l'électrophilie du carbonyle de l'amide sur la réactivité du composé avec la TGase (**Figure 5a**). Se basant sur un substrat connu de la TGase, de la benzyloxycarbonyl-L-glutaminylglycine (Z-Gln-Gly) (**Figure 5b**), une deuxième série de substrats analogues a été synthétisée (19) (**Figure 5c**).

Figure 5: a) Analogues fluorés (gauche-droite): propionamide, 2-fluoropropionamide, 2,2-difluoropropionamide et pentafluoropropionamide b) benzyloxycarbonyl-L-glutaminylglycine (Z-Gln-Gly) c) Analogues de la Z-Gln-Gly (gauche-droite): *N*-Z-L-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine, *N*-Z-L-glutamyl(γ -*p*-méthylanilide)glycine et *N*-Z-L-glutamyl(5-*N*-méthylamide)glycine.



Pour étudier la réactivité de ces substrats avec l'enzyme, il a fallu suivre la formation d'ammoniac. Une des méthodes les plus populaires pour doser l'ammoniac en faible concentration en milieu aqueux est la méthode de Nessler (20). Cette méthode de dosage colorimétrique permet de mesurer des quantités d'ammoniac en concentrations aussi faibles que 1 mM. Par contre, elle ne peut pas suivre la réaction cinétique de façon continue, donc plus de manipulations sont nécessaires et les erreurs expérimentales peuvent devenir plus importantes.

Il a donc fallu développer une nouvelle méthode pour pouvoir suivre, de façon continue, les réactions cinétiques (21). Ceci a été accompli à l'aide d'une seconde enzyme, la glutamate déshydrogénase (GDH), une enzyme qui utilise de l'ammoniac comme substrat. Le développement d'un système à enzyme couplée impliquant la GDH a donc été fait. Dans cette méthode, la TGase "consomme" son substrat (l'amide) et libère de l'ammoniac. Cet ammoniac est ensuite utilisé dans une réaction impliquant la GDH, l'oxydation de β -NADH en NAD^+ . Cette dernière réaction peut être suivie grâce à un spectrophotomètre UV-visible.

La nouvelle méthode a ensuite servi à l'étude cinétique de divers composés synthétisés et à la production d'un profil pH-vitesse de la TGase. Ce profil pH-vitesse nous aidera à possiblement identifier, à l'aide des pK_a tirés de celui-ci, les acides aminés impliqués dans le site actif de la TGase.

Les résultats de ces études contribueront à nos connaissances sur le fonctionnement de l'enzyme et nous aideront à élucider son mécanisme. Une fois le mécanisme connu, le développement d'inhibiteurs sera facilité et de nouveaux produits pharmaceutiques, capables de traiter des maladies telles que l'Alzheimer, le psoriasis ou le SIDA, pourront être créés.

Chapitre 2 - Purification de transglutaminase provenant de foie de cobayes

2-1 - Introduction

On retrouve la TGase tissulaire à plusieurs endroits chez les vertébrés, comme le foie, les poumons, le cerveau, les reins, la rate et les cellules du muscle lisse des artères et des capillaires sanguins (7). Elle se situe surtout dans le milieu intracellulaire, mais elle est également présente dans les fluides interstitiels. Elle peut être purifiée à partir de plusieurs sources (foies de mammifères, tissus testiculaires de rats ou érythrocytes humains) (22) ou même, peut être produite par expression bactérienne (23). Par contre, la source la plus commune pour les études est le foie de cobaye. Ceci est dû à l'abondance de l'enzyme retrouvée dans le foie (9) par rapport aux foies d'autres animaux (rats, souris, lapin, vache) ainsi que son homologie élevée avec la TGase humaine. Cette homologie d'environ 80% permettra l'utilisation des informations recueillies sur ce type de TGase dans la création de remèdes contre plusieurs désordres physiologiques chez l'humain (24). De plus, la TGase de foie de cobaye démontre une basse spécificité pour ses substrats par rapport aux autres membres de la famille des TGases (25). Ceci est important puisque ça nous donne la chance de faire l'étude d'une plus grosse gamme de produits que de l'enzyme qui aurait plus de spécificité. C'est pour ces raisons que la TGase tissulaire à provenance de foies de cobayes est favorisée pour la recherche.

La méthode d'isolation et de purification de la TGase est basée sur une méthode classique publiée par Folk et Chung (17). Après quelques essais de purification, il était clair que nos résultats ne ressemblaient pas trop aux données publiées. Nous avons donc dû apporter quelques modifications à leurs procédures pour nous augmenter l'activité spécifique de l'enzyme ainsi que son rendement de purification global. Les résultats présentés dans ce chapitre représentent la somme de

la recherche effectuée lors de la collaboration avec une de mes collègues de laboratoire, Anouk Leblanc (18,26).

2-2 - Objectifs

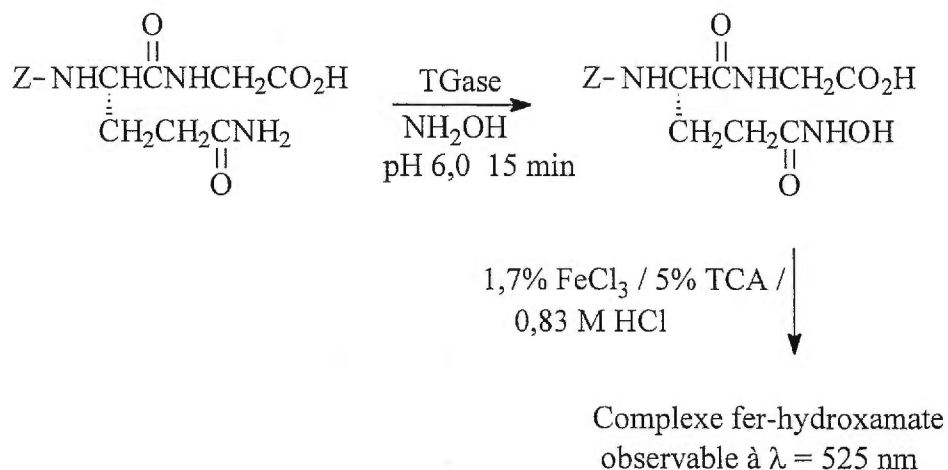
2-2-1 - Critères pour l'enzyme

Pour les études cinétiques, de la TGase purifiée possédant une haute activité est requise. Ceci peut se traduire en un besoin de TGase possédant une activité spécifique d'au moins 10,0 U/mg (la définition d'une unité d'activité pour l'enzyme est retrouvée dans la section 2-2-2), ce qui correspond à 80% de la valeur maximale d'activité spécifique retrouvée en littérature (27). Commercialement, seule de l'enzyme brute possédant une activité spécifique d'environ 2 U/mg est disponible, ce qui ne satisfait pas nos critères de base. Il fallait donc purifier l'enzyme nous-mêmes.

2-2-2 - Définition d'unité d'activité et d'activité spécifique pour l'enzyme

Une unité d'activité (1 U) d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la formation de 1 μmol de Z-L-glutamyl(γ -hydroxamate)glycine en une minute. Ce test utilise de la Z-L-Gln-Gly comme substrat donneur avec de l'hydroxylamine comme substrat accepteur (17). À la fin de l'incubation des deux substrats avec l'enzyme, une solution de $\text{FeCl}_3/\text{TCA}/\text{HCl}$ est ajoutée pour former un complexe entre le fer et l'hydroxamate. Celui-ci est subséquentment dosé par absorbance à 525 nm (maximum d'absorbance pour le complexe fer-hydroxamate) grâce à un spectrophotomètre UV-visible (**Schéma 1**). L'activité spécifique de l'enzyme est l'activité par mg de protéine totale et est donnée en U/mg.

Schéma 1: Test d'activité de la TGase. Le produit formé, la Z-L-glutamyl(γ -hydroxamate)glycine, forme un complexe avec du fer qui absorbe à 525 nm.

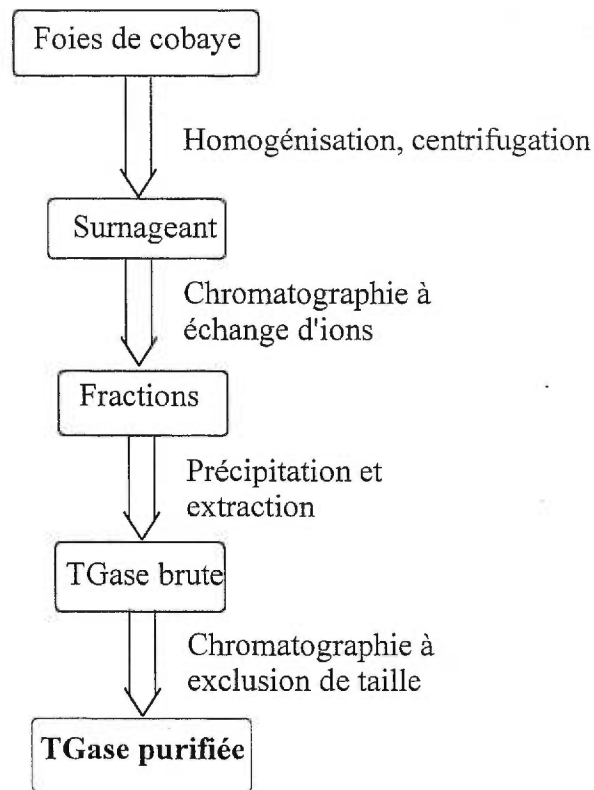


2-3 - Purification de l'enzyme

2-3-1 - Méthodes de purification déjà connues

La meilleure méthode (et la plus répandue) trouvée dans la littérature pour la purification de ce type de TGase est celle publiée par Folk et Chung (17,28,29) (**Figure 6**). Cette méthode répond aux deux critères importants pour une purification d'enzyme qui sont une haute activité et un rendement élevé. De plus, l'enzyme ainsi purifiée est assez pure d'après l'absence d'impuretés constatée sur les gels d'électrophorèse SDS-PAGE. Il existe une autre méthode pour produire de l'enzyme en utilisant des anticorps monoclonaux. Par contre, cette méthode nécessite beaucoup de temps de préparation (plusieurs mois) et est limitée par la disponibilité des anticorps (30). En général, on ne retrouve pas de méthode produisant de l'enzyme ayant une activité spécifique au-delà de 14,0 U/mg (27).

Figure 6: Survol des étapes de purification de la TGase



2-3-2 – Problèmes rencontrés avec les méthodes déjà connues

Même s'il existe déjà des méthodes simples pour purifier la TGase (17,28,29), l'application de ces méthodes dans nos laboratoires nous a causé de nombreux problèmes. Par exemple, l'entreposage de l'enzyme n'était pas efficace. L'enzyme ne semblait pas pouvoir maintenir son activité pour plus de 24-48 heures après la purification quand on l'entreposait de la façon décrite dans les publications. Les étapes de précipitation et d'extraction ont également été assez problématiques,

dû à leur très faible rendement. Ces problèmes ont tous été résolus, un à la fois, avec plusieurs purifications.

2-4 - Résultats et discussion de la purification modifiée

2-4-1 - Modifications des procédures publiées

Nous avons modifié plusieurs étapes de la purification réalisée par Folk et Chung (17) et avons comparé les résultats obtenus après chaque étape de notre purification (18) avec ceux qu'ils ont obtenus (**Tableau 1**). Les détails expérimentaux de la purification se retrouvent dans le Chapitre 8.

Tableau 1: Tableau comparatif de la méthode modifiée (18) et de la méthode de Folk et Chung (17) à différents niveaux. L'erreur expérimentale des valeurs d'activité obtenues est estimée à $\leq 10\%$.

Étape	Quantité de protéine (mg)		Activité ($\mu\text{mol}/\text{min}$)		Activité spécifique ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)		Rendement (%)	
	Folk	Nous	Folk	Nous	Folk	Nous	Folk	Nous
Homogénéisation	25 000	22 500	1250	1440	0,05	0,06	100	100
Surnageant	10 000	6 930	1100	1310	0,11	0,19	88	91
Échange d'ions	250	371	625	1110	2,5	3,0	50	76
Extraction	56	65	448	520	8,0	8,0	36	36
Exclusion de taille	18	25	252	450	14,0	18,0	20	31

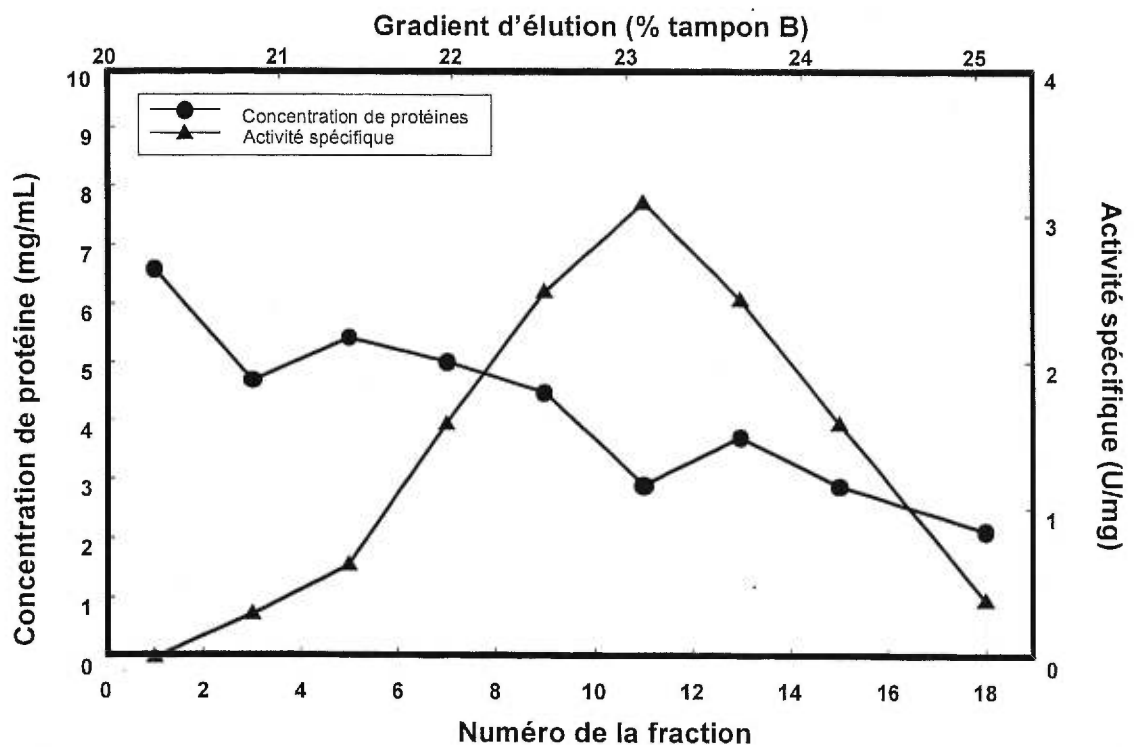
Nous avons déterminé que le temps de manipulation était critique; il faut minimiser le plus possible le temps entre les manipulations. Les foies de cobaye doivent être obtenus frais et entreposés sur glace. Lors de leur réception, ils doivent être homogénéisés et centrifugés (première étape) immédiatement pour maximiser l'activité de la TGase isolée. À cette étape, le surnageant peut être congelé et emmagasiné à -20 °C pour une période allant jusqu'à quelques mois sans observer de perte d'activité. Nous avons déterminé qu'il est impossible d'arrêter la purification après une étape intermédiaire autre que celle-là. Par exemple, nous avons observé que l'entreposage du précipité obtenu lors de la troisième étape (précipitation au sulfate de protamine) dans du tampon Tris-acétate 0,2 M (pH 6,0) à 4 °C, pour une période de 24 heures, fait perdre jusqu'à 50 % de l'activité de la TGase. Ces observations sont en contradiction avec celles publiées par Folk et Cole, qui suggèrent que l'enzyme, à cette étape, est stable pour au moins trois jours sans perte d'activité (28). Pour cette raison, nous avons décidé de faire une purification sans interruption, contrairement à la méthode publiée.

Pour maximiser l'activité spécifique de la solution finale d'enzyme purifiée, nous avons dû optimiser l'étape qui était continuellement limitante dans la purification, soit celle de la chromatographie d'échange d'ions (deuxième étape). À une vitesse d'élution de 5 mL/min, le gel utilisé (DEAE Bio-Gel A) se faisait continuellement écrasé, causant une augmentation de la pression à l'intérieur de la colonne ainsi qu'un ralentissement de son débit. Par contre, lors de la substitution de ce gel pour du gel Bio-Rad Macro-Prep DEAE, ces problèmes ont été éliminés. Ce dernier support est plus rigide que celui suggéré par Folk et peut être utilisé plusieurs fois sans se faire "écraser" (**Figure 7**). En faisant ce changement, nous avons pu obtenir une amélioration importante en comparaison avec les résultats publiés par Folk (17), soit une activité spécifique de 3,0 U/mg comparativement à 2,5 U/mg ainsi qu'un rendement de 76 % par rapport à 50 %.

Dans la **Figure 7**, on observe un pic d'activité qui ne se passe pas en même temps que le pic de concentration de protéines. Ceci est puisque cette première

colonne n'isole pas seulement la TGase, mais plutôt un mélange de protéines ioniquement équivalentes. C'est la première étape dans une série d'étapes pour purifier l'enzyme. Le pic d'activité décalé représente les fractions où le pourcentage de TGase active présente en solution est élevé.

Figure 7: Chromatogramme obtenu pour la colonne de chromatographie à échange d'ions qui démontre l'activité spécifique et la concentration de protéines des fractions conservées en fonction de la composition du gradient d'élué. La colonne est éluée avec un tampon de chlorure de Tris 5 mM, pH 7,5 avec 2 mM EDTA (tampon A) avec un gradient de chlorure de Tris 5 mM, pH 7,5 avec 2 mM EDTA et 1 M NaCl (tampon B).



La troisième étape consiste à faire une précipitation et l'extraction de l'enzyme. Cette étape doit être faite avec soin puisqu'il faut additionner lentement, goutte à goutte, une solution 1 % (w/v) de sulfate de protamine tout en agitant le mélange pour faire précipiter la TGase (ainsi que quelques autres protéines). L'addition du sulfate de protamine change la nature ionique de la solution ce qui fait précipiter les protéines en solution. Une addition trop rapide cause un changement

trop important dans la nature ionique du mélange, causant une dénaturation de l'enzyme. Généralement, on rajoute au volume total des fractions récoltées après la colonne un volume de sulfate de protamine qui donne une concentration finale de 0,15 % (w/v). Cette addition se fait également lentement, c'est-à-dire sur 15 minutes pour bien faire précipiter la TGase sans la dénaturer.

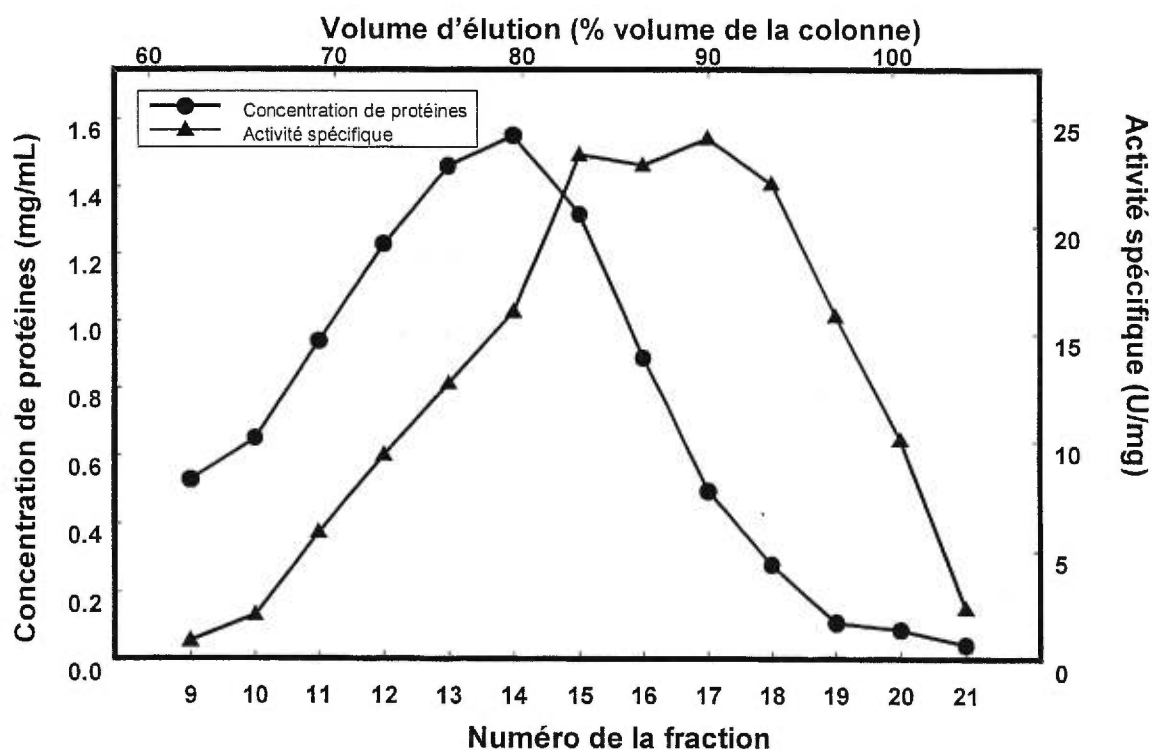
Ensuite, deux extractions du précipité avec une solution de sulfate d'ammonium 0,05 M dans du tampon A (chlorure de Tris 5 mM, pH 7,5 avec 2 mM EDTA) sont nécessaires pour récolter l'enzyme. Ces extractions sont faites en utilisant des volumes différents, chacun plus petit que le précédent, pour éviter de se retrouver avec un volume élevé à la fin. Ceci n'affecte presque pas le rendement. Un volume élevé à cette étape résulte normalement en une perte d'activité spécifique de l'enzyme. Il faut noter que la stabilité de l'enzyme augmente normalement avec la concentration d'enzyme en solution. Une solution d'enzyme diluée ne se conservera pas aussi longtemps qu'une solution concentrée parce qu'elle aura plus de chances de se faire oxyder.

Une des différences les plus marquées entre les procédures publiées par Folk (17,28,29) et les nôtres est le fait d'exclure l'étape de concentration par précipitation utilisant du sulfate d'ammonium. Ceci se faisait normalement après la troisième étape, soit l'étape de précipitation et d'extraction. D'après Folk, cette étape comprend l'addition d'une grande quantité de sulfate d'ammonium aux extraits pour refaire précipiter l'enzyme, qui est subséquentement récoltée par centrifugation. Cette dernière était ensuite redissoute dans un tampon approprié pour la chromatographie d'exclusion de taille. Ceci nous a causé des problèmes à deux niveaux, le premier étant qu'une précipitation incomplète conduisait à un rendement plus faible, et le deuxième, que la haute concentration en ammonium dans les solutions finales interférait avec le test standard d'activité. Nous avons donc décidé de concentrer les extraits en utilisant des tubes à concentration pour centrifuges (tubes Amicon Centri-Prep 30, filtres de masse moléculaire de 30 kDa) pour quelques heures à 4 °C. Ceci est acceptable pour réduire le volume à un volume approprié (soit entre 1 et 4 mL)

pour la colonne suivante sans perte importante d'activité. Ce changement nous donne une alternative vite et facile à la méthode de Folk.

Une fois que le volume désiré a été atteint, la solution enzymatique est chargée sur une colonne d'exclusion de taille (quatrième étape) selon les procédures publiées par Folk (17). Les fractions contenant de la TGase en concentration élevée éluent normalement de la colonne après un demi-volume de la colonne, soit après environ 65 mL d'éluat avec du tampon Tris-acétate 10 mM (pH 6,0) contenant 1 mM EDTA ainsi que 0,16 M KCl (**Figure 8**).

Figure 8: Chromatogramme de la colonne d'exclusion de taille démontrant l'activité spécifique et la concentration de protéines des fractions récoltées en fonction du volume élué.



D'après les méthodes publiées, les fractions les plus riches en enzyme active sont combinées et sont concentrées par ultrafiltration à des solutions d'au moins 10 mg/mL avant d'être congelées. À ces concentrations élevées, l'enzyme est censée

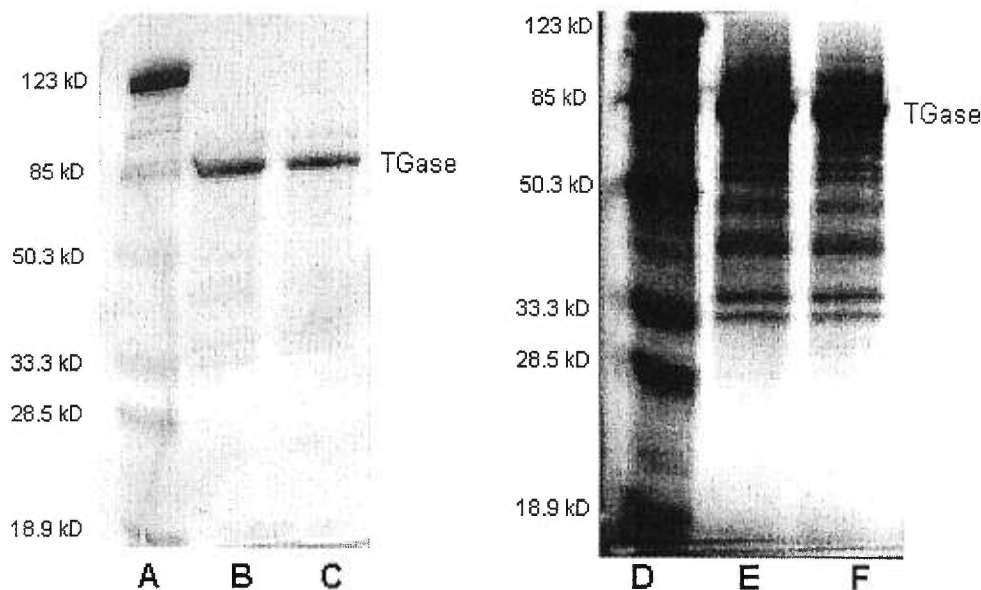
rester stable à -20 °C pour plusieurs mois (17). Par contre, nous avons eu plusieurs problèmes avec ceci après avoir observé, à plusieurs reprises, une perte de plus de 50% d'activité après quatre jours d'entreposage dans les conditions publiées. Après deux semaines, il y avait une perte appréciable d'activité de l'enzyme (activité spécifique observée plus basse que 2 U/mg). Une hypothèse possible pour ce phénomène serait l'oxydation possible du thiol au site actif de l'enzyme, ce qui mènerait à une diminution importante de l'activité spécifique observée. Ceci a été confirmé par l'ajout d'un agent réduisant de thiol, du dithiothreitol (DTT), qui peut partiellement rétablir l'activité perdue durant l'entreposage (17). Par contre, ceci n'était pas favorable dans notre cas puisque nous désirons obtenir de l'enzyme purifiée pour nos études cinétiques, mais sans composés pouvant interférer. Pour éviter l'oxydation, nous avons essayé de mettre les tubes contenant l'enzyme sous atmosphère inerte (N₂) avant de les congeler. Ceci n'a pas offert d'amélioration, nous suggérant que l'inactivation prenant place lors de l'entreposage n'est peut-être pas entièrement due à une oxydation du thiol.

Dans un résumé concernant la TGase, Folk et Chung discutent d'une impureté contaminante qui est occasionnellement trouvée dans les solutions finales des préparations enzymatiques (31), ce qui pourrait expliquer notre perte abrupte d'activité. L'impureté dont ils discutent a été isolée et identifiée comme étant de l'estérase provenant du foie. Celle-ci peut être inhibée par l'ajout d'une petite quantité de phosphorofluoridate de diisopropyle. Il a aussi été démontré que la TGase tissulaire isolée des foies de rats est co-purifiée avec une protéase capable de désactiver la TGase (32). Il est donc possible que ceci s'est réalisé dans notre cas. Nous avons donc fait des électrophorèses sur gel SDS-PAGE des solutions finales enzymatiques pour vérifier la présence d'impuretés ainsi que pour déterminer, du même coup, le degré de pureté de l'enzyme (**Figure 9**) (voir Chapitre 8). Dans certains cas, il est possible de détecter quatre légères bandes en plus de la bande représentant la TGase à 78 kDa. Deux bandes semblent migrer vers une masse moléculaire entre 31 et 32 kDa, une autre vers 40 kDa et la dernière, vers une masse moléculaire d'environ 51 kDa. Nous aurions aimé pouvoir comparer nos gels avec

ceux de Folk pour évaluer notre degré de pureté en comparaison avec la leur, mais il n'y avait qu'une description qualitative du gel dans leur article.

L'activité spécifique élevée de notre purification met en évidence le fait que notre protocole fonctionne bien. Par contre, la co-purification d'une protéase ou d'une estérase avec notre enzyme posait encore un défi pour son entreposage. Le problème d'instabilité lors de cette étape a été résolu par la lyophilisation de l'enzyme directement après la colonne d'exclusion de taille. L'enzyme lyophilisée conserve environ 90% de son activité originale pendant plusieurs mois.

Figure 9: Gels d'électrophorèse SDS-PAGE de la solution finale de TGase purifiée. Les puits A-C ont été révélés avec du bleu de Coomassie tandis que les puits D-F ont été révélés avec du zinc et de l'imidazole. Les puits A et D ont été chargés avec des marqueurs moléculaires (dont le poids correspondant est inscrit à gauche du gel), les puits B et E avec 5,0 μ g TGase purifiée et les puits C et F avec 7,5 μ g TGase purifiée.



2-4-2 - Analyse de la pureté de l'enzyme isolée

Finalement, pour pouvoir quantifier le degré de pureté de la TGase purifiée, nous avons eu recours à un logiciel informatique d'analyse de gels nommé «Scion Image for Windows». Après avoir utilisé un numériseur pour avoir l'image du gel sur l'écran, le logiciel a analysé celui-ci en fin de pouvoir mesurer l'intensité de chaque bande. Une courbe d'étalonnage de l'intensité des bandes en fonction de leur concentration en protéines est d'abord établie en utilisant des quantités connues de l'albumine de sérum bovin (BSA, voir Chapitre 8) sur un gel SDS-PAGE. Ensuite, à l'aide de cette courbe d'étalonnage, la quantité de protéines présente dans toutes les bandes sur les gels de la TGase purifiée est exprimée graphiquement sous forme de pics par rapport à leur masse. Le logiciel génère ensuite un histogramme des pics basé sur leur intensité et calcule l'aire en dessous de chaque pic. Utilisant la courbe d'étalonnage comme référence, les aires sont ensuite converties en concentration de protéines. Ceci nous a permis de déterminer la quantité relative de TGase présente dans nos solutions finales.

Pour bien s'assurer de la validité de nos données, deux masses finales de TGase ont été chargées sur les gels, soit 5,0 et 7,5 μg , et deux méthodes de révélation ont été employées, soit le bleu de Coomassie (33) et la révélation au zinc (34). La méthode au zinc a été utilisée puisque c'est une nouvelle méthode plus sensible et plus rapide que celle au bleu de Coomassie. Par contre, la méthode au bleu de Coomassie n'est pas aussi sensible ni rapide, mais elle a été utilisée lors des études de Folk. Le bleu de Coomassie a donc été utilisé comme point de comparaison entre notre recherche et la leur, et la révélation au zinc a été utilisée pour nous fournir des résultats plus sensibles que ceux déjà publiés.

Une inspection visuelle des gels présentés dans la **Figure 9** nous démontre que la méthode de révélation par le bleu de Coomassie est beaucoup moins sensible que la méthode de révélation au zinc. La méthode standard de révélation par le bleu

de Coomassie a une limite de détection de 0,1 - 1,0 µg de protéine (33), tandis que la limite de détection de la technique de révélation au zinc est plus basse, soit de 10 - 100 ng de protéine (34). En conséquence, le gel traité au bleu de Coomassie semble être très pur en ayant quatre bandes pâles et une bande intense tandis que le gel traité au zinc révèle environ neuf bandes significativement intenses, diminuant donc l'interprétation de la pureté de l'enzyme. À l'aide du logiciel «Scion Image for Windows», ces observations qualitatives ont pu être interprétées de façon quantitative: le gel révélé au bleu de Coomassie présente un degré de pureté de 85%, tandis que le gel révélé au zinc ne présente qu'un degré de pureté de 60%. En général, les résultats publiés traitant de la pureté de l'enzyme, telle qu'évaluée par électrophorèse, utilisent exclusivement la technique de révélation au bleu de Coomassie. Nos résultats suggèrent donc que le choix de méthode de révélation peut avoir un effet significatif sur les conclusions tirées au niveau de la pureté de la TGase isolée.

2-5 - Conclusions

La méthode de purification de la TGase provenant du foie de cobaye présentée ici représente la somme d'une série de purifications, chacune légèrement modifiée par rapport à la précédente. Les modifications appliquées au protocole de purification classique de Folk (17,28,29) nous ont permis d'obtenir le plus haut rendement et la plus haute activité spécifique publiés jusqu'à ce jour (18). Nous avons atteint les objectifs que nous nous étions donnés: nous avons trouvé une méthode nous permettant d'obtenir une grande quantité d'enzyme purifiée, possédant une haute activité spécifique et qui se conserve pendant une période de quelques mois. L'entreposage de l'enzyme est un important problème maintenant réglé puisque cette enzyme allait être nécessaire pour des études cinétiques, ce qui était le coeur de la recherche faite au courant de nos études.

En somme, l'application des modifications a mené au développement d'une nouvelle méthode de purification réfléchissant une amélioration de 28% en activité spécifique de l'enzyme et de 55% en rendement global (18). Le problème d'entreposage a été résolu en lyophilisant l'enzyme, qui conserve maintenant jusqu'à 90% de son activité originale après trois mois à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Chapitre 3 – Préparation des substrats analogues utilisés dans les études cinétiques

3-1 - Introduction

Trois séries de composés ont été synthétisées, chacune ayant un but différent. Les résultats des études cinétiques avec ces composés contribuent aux connaissances générales du mécanisme enzymatique de la TGase. Ce chapitre présente la synthèse de ces composés. Les résultats des études cinétiques avec ces composés sont présentés dans le Chapitre 6. Les détails expérimentaux de toutes ces synthèses se retrouvent dans le Chapitre 9.

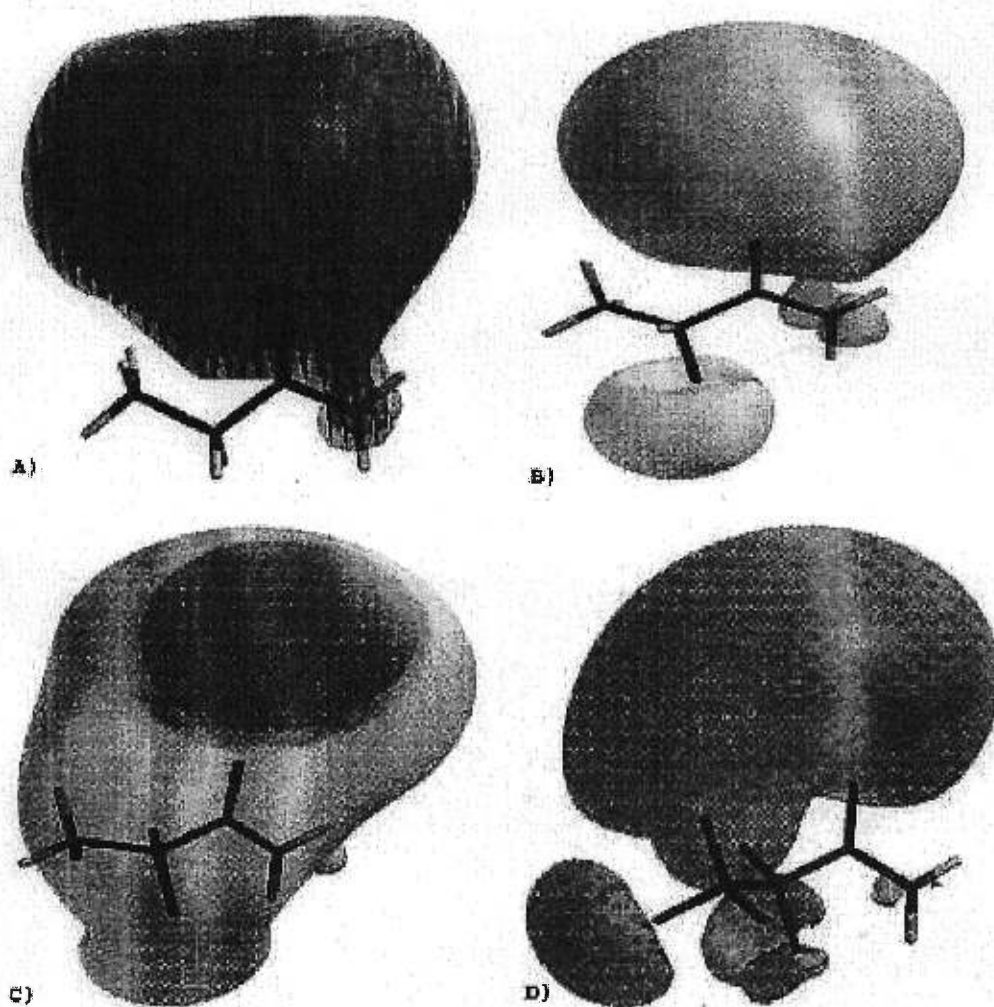
3-1-1 – Analogues fluorés

La partie réactive de la Z-GlnGly, lors de sa réaction avec la TGase, est son groupe γ -carboxamide. Pour tenter une étude qui pourrait nous donner de l'information utile sur le site actif de l'enzyme, il pourrait être possible d'utiliser une plus petite molécule. Cette petite molécule aurait comme avantage la facilité d'être modifié au niveau de la nature de ses groupes fonctionnels auxiliaires. Folk et Gross ont déterminé que le propionamide pourrait servir comme un substrat pour la TGase (35). Quoique le substrat n'ait pas un bon K_M ni un bon V_{max} , la facilité avec laquelle elle peut être manipulée nous a mené à la choisir.

Une série d'analogues fluorés du propionamide a été utilisée pour nous permettre d'étudier l'effet d'un groupe électroattracteur, tel qu'un fluor, sur le carbonyle de l'amide, en essayant ainsi de le rendre plus susceptible à une attaque nucléophile. En variant le nombre d'atomes de fluor présents sur la molécule, le degré d'électrophilie du carbonyle est varié (**Figure 10**). Ainsi, le degré de sensibilité

qu'a la vitesse de la réaction envers une variation électrophile du groupement amide pourra être déterminé. Ceci nous permettra d'étudier la nucléophilie du thiol au site actif de l'enzyme.

Figure 10: Effets des groupes fluorés sur la propionamide. Les nuages représentent le potentiel électrostatique des atomes. Les modèles ont été générés à l'aide du logiciel Spartan, utilisant un champs de force MM2 ainsi que l'algorithme de minimisation TNCG; les nuages de potentiel électrostatique ont subséquemment été générés à l'aide du même logiciel. **A)** propionamide **B)** 2-fluoropropionamide **C)** 2,2-difluoropropionamide **D)** pentafluoropropionamide. Les molécules sont placées dans cette orientation: (propionamide) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$.



Le potentiel électrostatique d'une molécule est gouvernée par la distribution des électrons dans celui-ci. L'analyse du potentiel électrostatique est utilisée pour pouvoir trouver des sites de réaction à l'intérieur d'une molécule. Pour chaque atome de la molécule, on peut tirer deux données à partir de l'analyse du potentiel électrostatique: la charge sur chaque atome et la valeur d'occupance. En se basant sur les valeurs de charge obtenues, on peut prédire où, sur la molécule, il y aura les meilleures chances de se produire une attaque nucléophile ou électrophile (36) (**Tableau 2**). Plus que la valeur de charge est négative, plus qu'il y aura de chances de se produire une attaque électrophile sur ce site. Plus que la valeur de charge est positive, plus qu'il y aura de chances de se produire une attaque nucléophile. La valeur d'occupance sur un atome représente la probabilité de trouver des électrons à cet endroit. Plus la valeur est élevée, plus la probabilité de trouver des électrons à cet endroit sera élevé. Sur une représentation graphique de ce potentiel, les nuages observés représentent les endroits où il y a une forte chance de retrouver des électrons. Plus que le nuage est grand, plus qu'il y aura de chances à retrouver des électrons a cet endroit.

Tableau 2: Valeurs obtenues pour la charge et pour l'occupance du carbonyle des amides

Composé	Occupance (oxygène, Unités)	Charge (carbone, Debye)	Charge (oxygène, Debye)
Propionamide	6,359	0,249	-0,359
2-fluoropropionamide	6,352	0,265	-0,352
2,2-difluoropropionamide	6,324	0,277	-0,324
pentafluoropropionamide	6,252	0,301	-0,292

La **Figure 10**, en combinaison avec les données du **Tableau 2**, nous démontre bien que plus qu'il y a d'atomes de fluor sur la molécule (en allant du propionamide au pentafluoropropionamide), moins qu'il y aura de potentiel électrostatique sur le carbonyle, et donc, plus que le carbone du carbonyle sera électrophile. Sur le modèle du propionamide, on voit que le nuage de potentiel

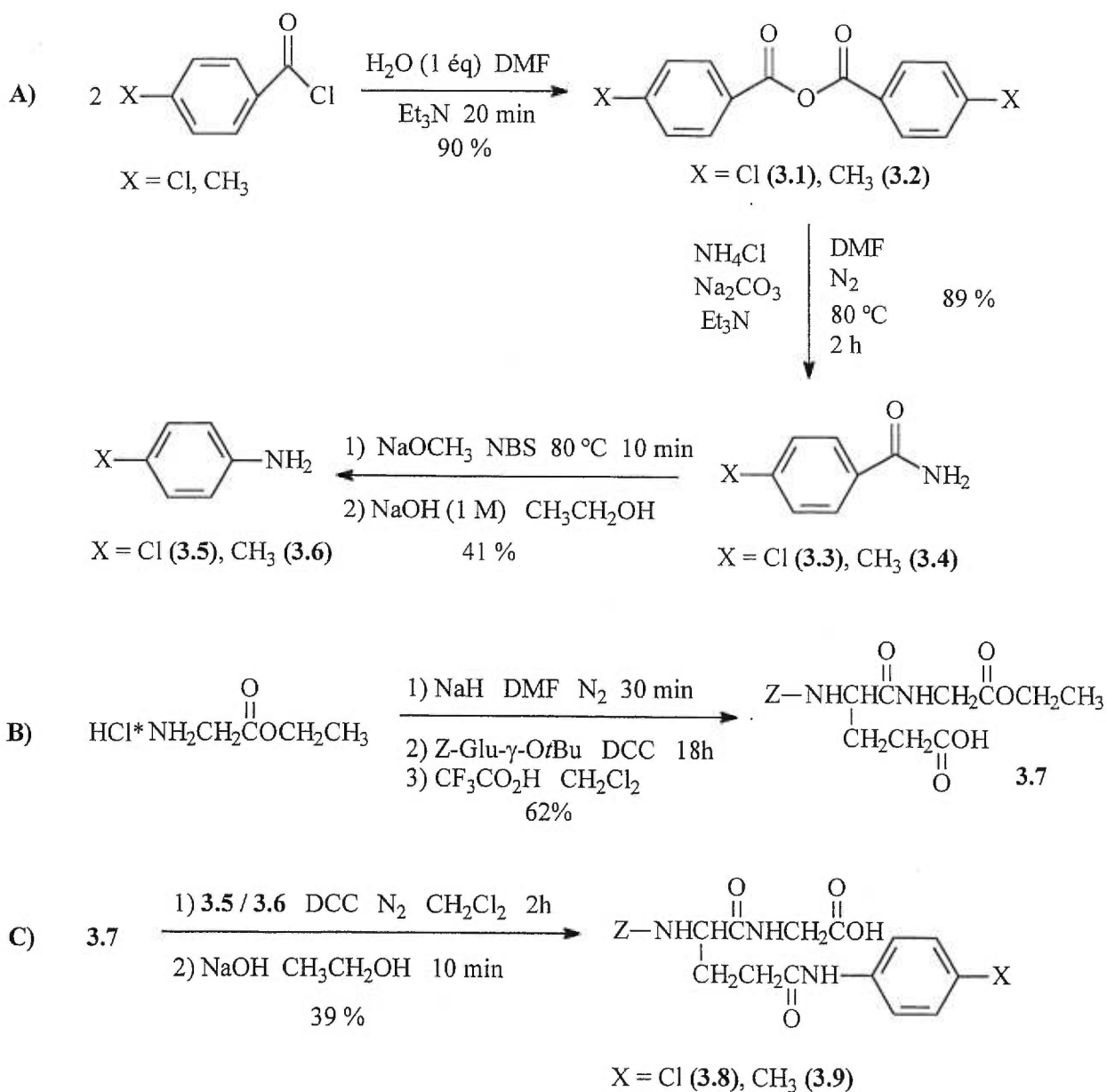
électrostatique est entièrement sur l'oxygène du carbonyle (occupance de 6,359 unités). En substituant un atome d'hydrogène par un atome de fluor (2-fluoropropionamide), on voit immédiatement qu'une partie de ce nuage est allé se placer sur le fluor (occupance de 6,352 unités sur l'oxygène du carbonyle). Ceci continue jusqu'à la substitution des 5 atomes d'hydrogène par 5 atomes de fluor (pentafluoropropionamide) où le nuage est partagé entre le carbonyle et les atomes de fluor (occupance de 6,252 unités). Dans ce cas-ci (pentafluoropropionamide), le carbone du carbonyle devrait être plus apte à subir une attaque nucléophile puisqu'il est plus électrophile que dans le cas du propionamide (comparaison de la charge, soit de 0,249 Debye pour le propionamide en comparaison avec 0,301 Debye pour le pentafluoropropionamide).

3-1-2 – Anilides

Le projet est composé de plusieurs étapes: la synthèse d'amides, suivi de leur réarrangement en aniline puis de leur couplage avec de la *N-Z-L*-glutaminyglycine éthyl ester pour donner un nouveau dipeptide, un *N-Z-L*-glutamyl(γ -anilide)glycine (**Schéma 2**). Les deux substrats synthétisés sont la *N-Z-L*-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine (**3.8**) et la *N-Z-L*-glutamyl(γ -*p*-méthylanilide)glycine (**3.9**), deux analogues du substrat connu de la TGase, la *Z*-GlnGly. Il a fallu synthétiser deux substrats ayant des auxiliaires en position γ de la glutamine de pK_a différents. Ces différences en pK_a changent les propriétés physiques des substrats, nous permettant donc de varier la réactivité des substrats avec la transglutaminase. Par exemple, si le substituant en position *para* du groupe phényl est électroattracteur, il diminuera la densité électronique présente sur l'azote de l'aniline ainsi que le pK_a de l'ion anilinium correspondant (le groupe partant lors de la réaction enzymatique). Ceci, en retour, diminuera la densité électronique sur le carbonyle de l'amide, le rendant plus susceptible à une attaque nucléophile. L'inverse s'applique aussi. Quoique les anilines **3.5** et **3.6** soient disponibles commercialement, des versions ^{15}N non-disponibles commercialement ont été préparées en même temps (pour un différent projet). La synthèse des anilines **3.5** et

3.6 n'a été faite que pour vérifier la méthode synthétique utilisée pour obtenir ces anilines ^{15}N . Subséquemment, elles ont été utilisées pour la synthèse des anilides.

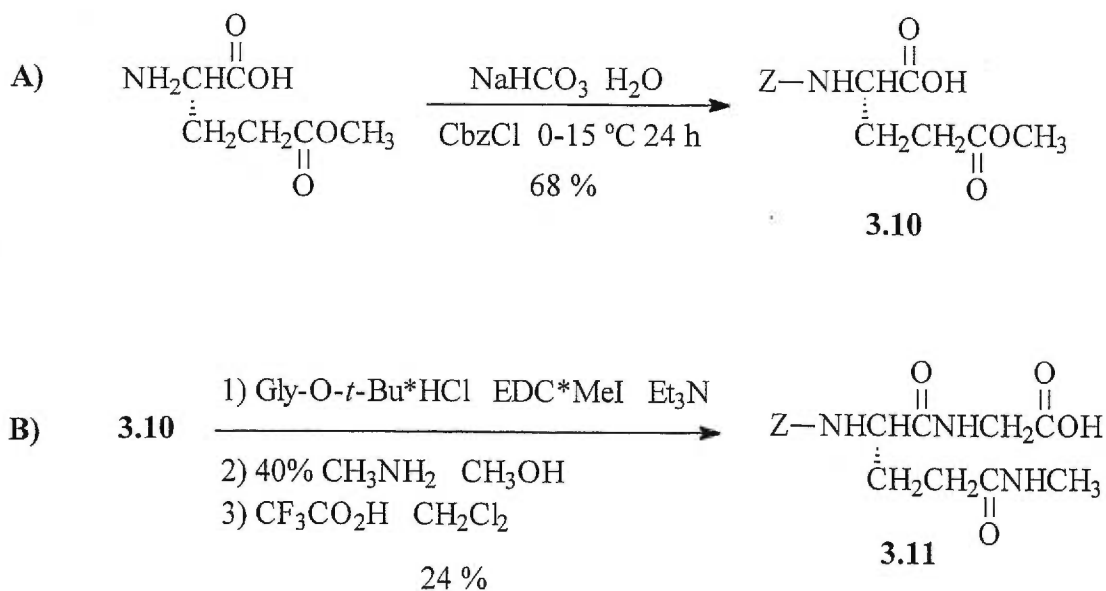
Schéma 2: Route synthétique suivie pour obtenir les dipeptides *N-Z-L*-glutamyl(γ -anilide)glycine: la *N-Z-L*-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine ($\text{X}=\text{Cl}$, **3.8**) et la *N-Z-L*-glutamyl(γ -*p*-méthylanilide)glycine ($\text{X}=\text{CH}_3$, **3.9**). **A)** Synthèse des anilines. **B)** Synthèse de la *N-Z-L*-glutamylglycine éthyl ester. **C)** Couplage entre l'aniline et l'acide et la déprotection de la glycine pour obtenir les anilides.



3-1-3 – *N-Z-L-glutamyl(5-N-méthylamide)glycine*

Dans le cas de la *N-Z-L-glutamyl(5-N-méthylamide)glycine* (**3.11**), l'objectif est de vérifier l'importance du groupe phényle (de la série d'anilides) en le remplaçant par un plus petit groupe fonctionnel tel qu'un méthyle (**Schéma 3**). La substitution du groupe phényle par un plus petit groupe fonctionnel tel qu'un groupe méthyle nous permettra de vérifier si la réactivité de la molécule varie et donc, si elle fonctionne encore mieux.

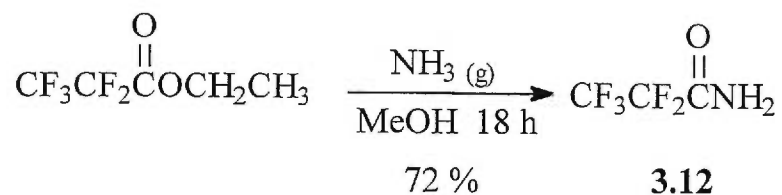
Schéma 3: Route synthétique suivie pour obtenir le dipeptide *N-Z-L-glutamyl(5-N-méthylamide)glycine* (**3.11**). **A)** Protection de l'acide glutamique 5-méthyl ester. **B)** Couplage avec de la glycine *t*-Bu-ester et déprotection de la glycine.



3-2 - Analogues fluorés

Trois composés fluorés ont été préparés pour les études cinétiques: le pentafluoropropionamide ($\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CONH}_2$), le 2,2-difluoropropionamide ($\text{CH}_3\text{CF}_2\text{CONH}_2$) et le 2-fluoropropionamide ($\text{CH}_3\text{CHFCONH}_2$). Le plus facile des trois à préparer était le premier, le pentafluoropropionamide (**3.12**). Dans le cas de celui-ci, tout ce qu'il y avait à faire était une simple amidation sur un produit de départ disponible commercialement (**Schéma 4**). C'est une réaction où le produit est facile à isoler et qui donne un rendement assez élevé.

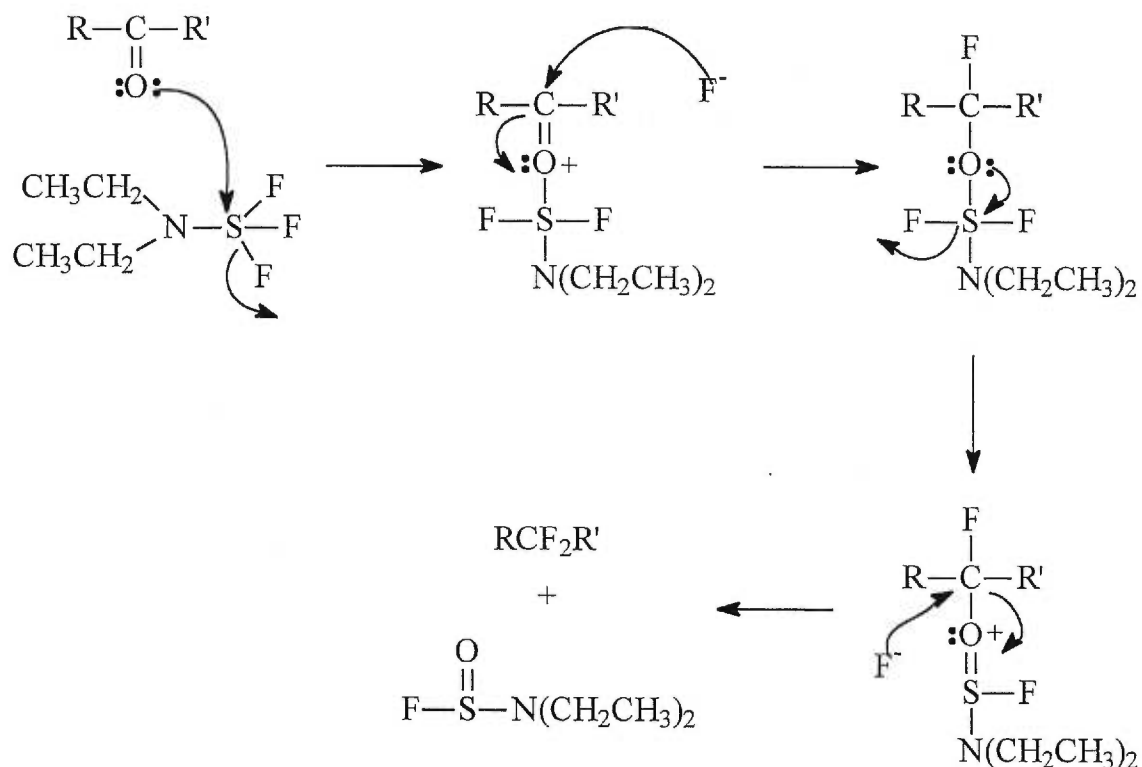
Schéma 4: Synthèse du pentafluoropropionamide (**3.12**).



La synthèse des deux autres produits est un peu différente. Pour chaque produit, il faut utiliser un composé de fluorination: le trifluorure de diéthylaminosulfure (DAST). Ce dernier est une source de fluor nucléophile (F^-) qui sert à transformer un alcool en fluorure ou bien un aldéhyde ou une cétone en difluorure géminale (37). Toutes les réactions impliquant le DAST doivent se faire à -78°C , dans des conditions anhydres (sous N_2) et dans un solvant organique aprotique. Il est important de conserver des conditions anhydres puisque le DAST est très réactif (explosif) en présence d'eau.

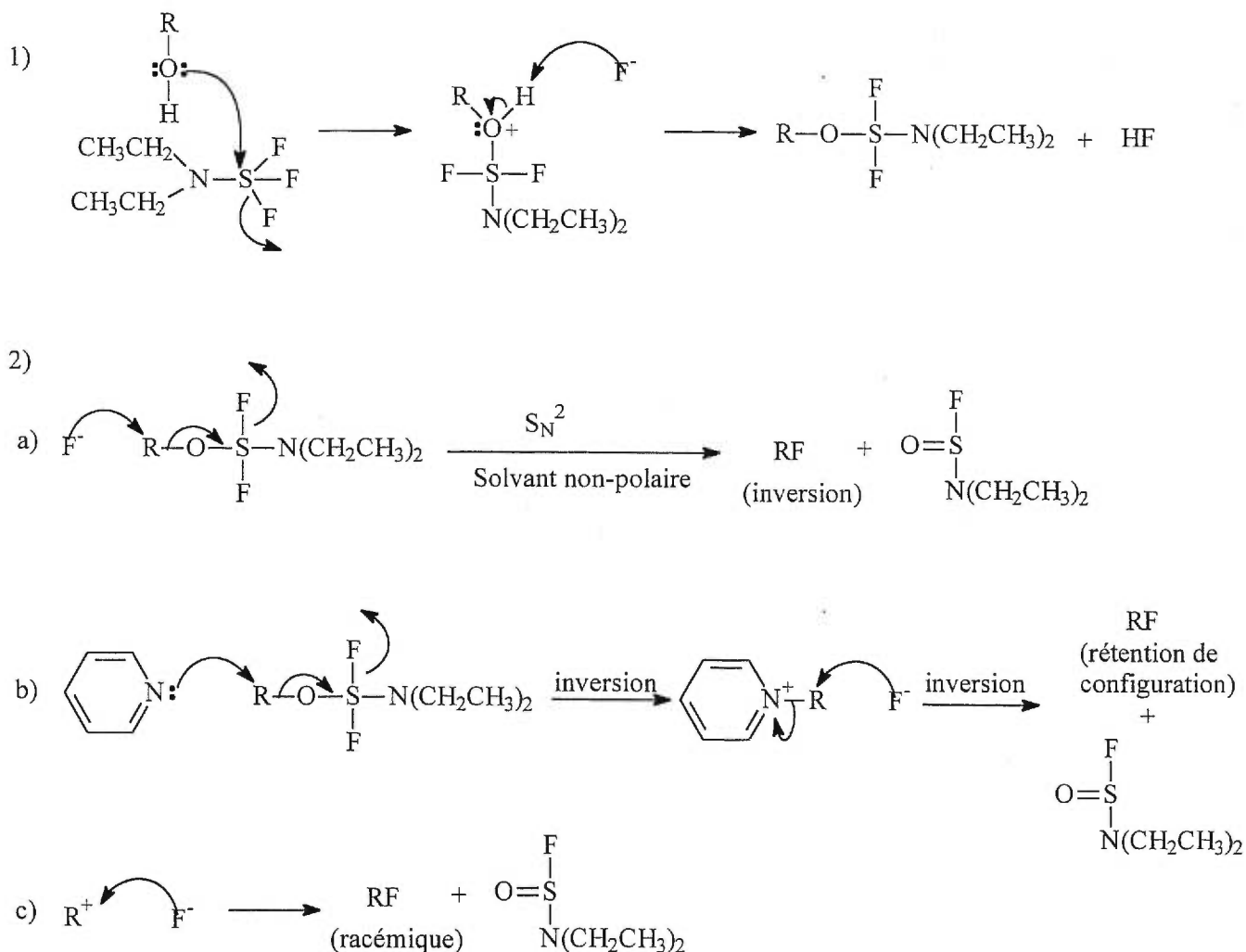
Dans le cas des aldéhydes ou des cétones, un des doublets d'électrons libres appartenant au groupe carbonyle de la molécule à fluorer attaque le soufre du DAST pour relâcher un fluor nucléophile (**Schéma 5**). Celui-ci attaque subséquemment le groupe carbonyle, ce qui cause un réarrangement résultant en une double fluorination (37).

Schéma 5: Réaction du DAST avec le carbonyle d'un aldéhyde ou d'une cétone



En ce qui concerne les alcools, il peut y avoir plusieurs différents produits (**Schéma 6**). Dans le cas d'un solvant non-polaire utilisé (comme le CH_2Cl_2), une inversion de configuration est obtenue lors d'une réaction S_N2 . Par contre, dans le cas de l'utilisation d'un solvant polaire tel que la pyridine, celui-ci agit comme un nucléophile et attaquera le carbone du groupe R (carbone chiral ou chaîne aliphatique, par exemple) pour faire une première inversion de configuration, suivie d'une attaque par l'ion fluorure sur le même carbone, faisant donc une autre inversion de configuration. Cette double inversion de configuration résulte en une rétention de configuration. Le choix de solvant est donc très important pour cette réaction (37). Une troisième possibilité existe aussi: si R est un bon carbocation, un mélange racémique sera obtenu.

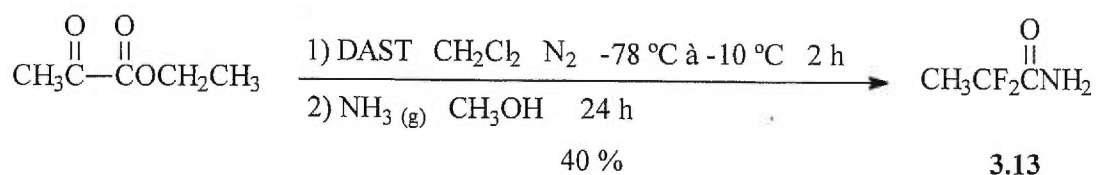
Schéma 6: Réaction du DAST avec un alcool. Dans la première étape, l'oxygène de l'alcool attaque le soufre du DAST et perd un proton. Ensuite, un ion fluorure libre vient attaquer le carbone du groupe R de l'alcool (le groupe pourrait être, par exemple, un groupe méthyle. L'attaque se fait sur le carbone lié à l'oxygène.). Trois produits peuvent subséquemment être formés selon le milieu de réaction: a) le cas d'un solvant non-polaire b) le cas de la pyridine c) le cas où R est un bon carbocation.



La synthèse des deux autres produits s'est donc faite de cette manière, soit une première réaction avec du DAST, suivie par une amidation. La réaction faite à partir du pyruvate d'éthyle a donné du 2,2-difluoropropionamide (**3.13**) avec un rendement moyen (**Schéma 7**). La réaction d'amidation fonctionne très bien, mais le

rendement moyen peut être attribué à la première moitié de la réaction, soit la fluorination au DAST. Le DAST est un composé très fragile et extrêmement susceptible à l'hydrolyse (37). Pour éviter la décomposition du DAST, il faut donc que la réaction se fasse à basse température, ce qui n'accélère définitivement pas sa vitesse. Par contre, à basse température, la réaction est trop lente. Il faut donc laisser lentement augmenter la température.

Schéma 7: Synthèse du 2,2-difluoropropionamide (**3.13**). Dans la première étape de la réaction, le DAST réagit avec le groupe carbonyle de la cétone pour former un composé difluoré. Dans la seconde étape, une simple amidation est faite pour donner l'amide (**3.13**).



En ce qui concerne la réaction faite à partir du *S*-(-) lactate d'éthyle, elle a permis d'obtenir du 2-fluoropropionamide (**3.14**) avec un rendement un peu plus élevé que la réaction précédente (**Schéma 8**). Le pouvoir rotatoire a été mesuré pour donner une valeur de $[\alpha]_D = +0,0312$. Il semble donc y avoir un petit excès de (+), mais nous ne savons pas exactement combien. On aurait pu déterminer la quantité d'excès en préparant un ester de Mosher de l'acide, mais n'avons pas pu le faire dû à des limitations au niveau du temps. De l'éthanol a été utilisé comme solvant pour l'amidation après avoir obtenu, à maintes reprises, des mauvais rendements avec du méthanol. En fait, cette substitution ne devrait pas poser de problèmes puisqu'un des produits formés lors de la réaction d'amidation est de l'éthanol (**Schéma 9**). L'utilisation de l'éthanol comme solvant pour les autres réactions n'a pas été faite car assez de produit pour nos études avait été obtenu. Cette amélioration de la réaction pourrait être due au fait que la présence d'une faible quantité d'eau dans l'éthanol (éthanol 95 %, eau 5 %) permet à l'ammoniac gazeux de mieux se solubiliser et donc, de mieux réagir. De l'ammoniac gazeux est utilisé en excès pour s'assurer

d'obtenir le plus haut rendement possible.

En ce qui concerne l'inversion de configuration, le produit obtenu, en théorie, devrait être de configuration *R* puisque le produit de départ était de configuration *S*. Dans ce type de réaction et sous les conditions utilisées, il devrait y avoir une inversion de configuration puisque c'est une réaction de type S_N2 (**Schéma 8**). Par contre, nous n'avons pas pu prendre de spectre rayon-X pour confirmer ce fait. Ceci ne nous dérange pas puisque l'on voulait, dans un premier temps, vérifier la réactivité de la molécule avant de considérer sa stéréochimie.

Schéma 8: Synthèse du 2-fluoropropionamide (**3.14**). Dans la première étape de la réaction, le DAST réagit avec l'alcool pour former un nouveau lien carbone-fluor avec inversion de configuration. Dans la seconde étape, une simple amidation est réalisée (**3.14**).

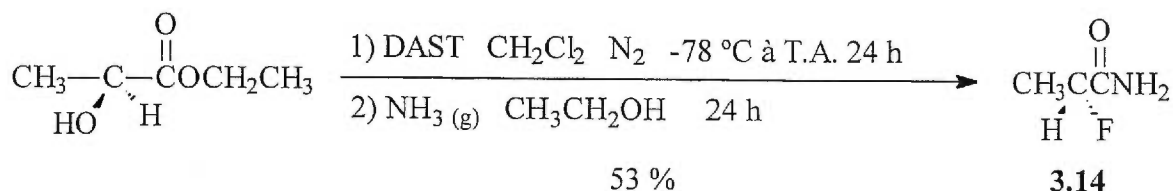
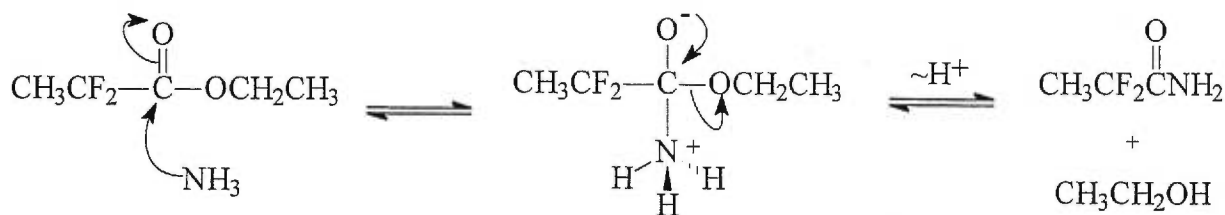


Schéma 9: Mécanisme pour la réaction d'amidation. Un produit formé en même temps que l'amide, lorsque l'on utilise des éthyl esters, est de l'éthanol.



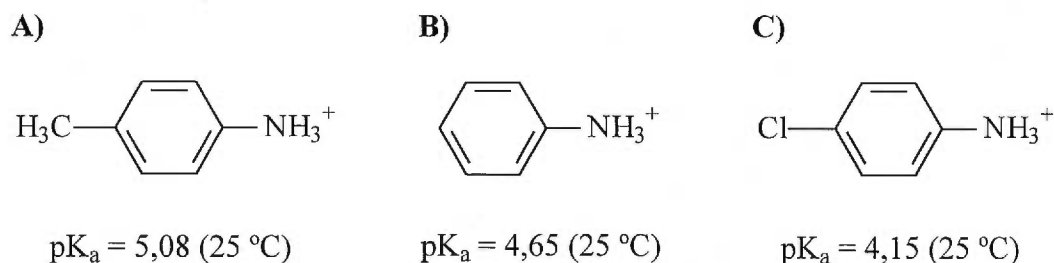
3-3 - Anilides

3-3-1 - Préparation des amines

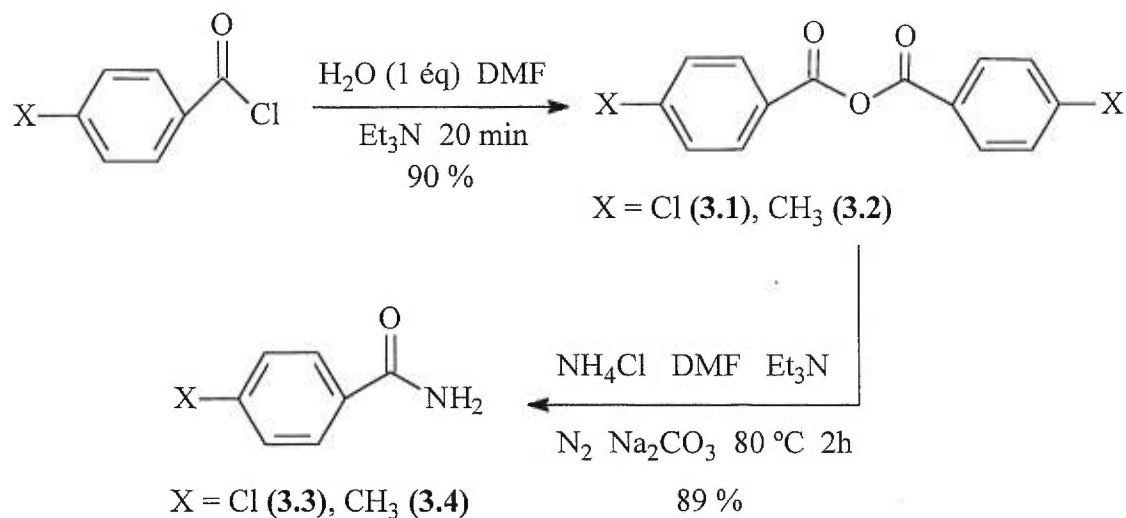
La stratégie envisagée pour synthétiser ces deux substrats est représentée dans le **Schéma 2**. Il faut donc commencer par la préparation de l'anhydride de l'acide *p*-chlorobenzoïque (**3.1**) et de l'anhydride de l'acide *p*-toluique (**3.2**) qui serviront à produire les amides correspondants, soit la *p*-chlorobenzamide (**3.3**) et la *p*-toluamide (**3.4**). Ces deux amides sont ensuite réarrangés en amines (*p*-chloroaniline (**3.5**) et *p*-toluidine (**3.6**)) par un réarrangement de Hofmann. Une fois purifiées, les amines sont couplées (avec DCC) avec un dipeptide synthétisé, soit la *N*-Z-glutamylglycine éthyl ester (**3.7**). Les esters sont ensuite hydrolysés puis les dipeptides sont purifiés pour donner les deux anilides, soit la *N*-Z-L-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine (**3.8**) et la *N*-Z-L-glutamyl(γ -*p*-méthylanilide)glycine (**3.9**). Après avoir caractérisé ces nouveaux dipeptides par spectroscopie de masse, par RMN (proton et ^{13}C) et par point de fusion, ils seront utilisés dans des études cinétiques avec la TGase.

Si nous n'avions aucun groupe substituant sur la molécule (nous aurions donc de l'aniline), le $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'acide conjugué serait de 4,65 (38). La chloroaniline possède comme groupe substituant un Cl, qui est un groupe légèrement électroattracteur. Ceci abaisse donc le $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'acide conjugué de l'aniline parente à une valeur de 4,15 (38). La toluidine, par contre, possède comme groupe substituant un CH_3 , qui est un groupe légèrement électrodonneur. Ce dernier augmente un peu le $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'aniline parente à une valeur de 5,08 (38). (**Figure 11**)

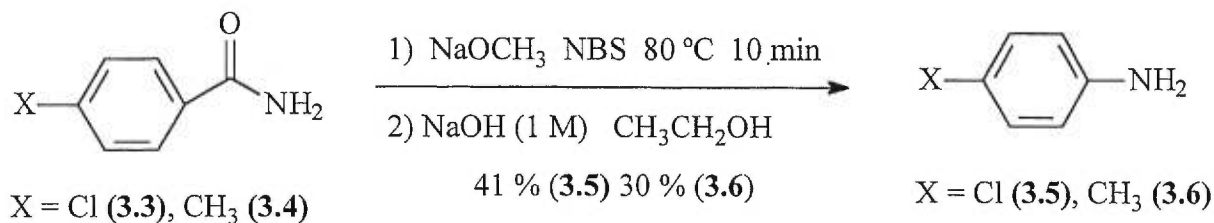
Figure 11: Valeurs de pK_a pour les acides conjugués des anilines parentes des anilides synthétisés. **A)** Groupe substituant électrodonneur (*p*-toluidine); **B)** Aucun groupe substituant (aniline); **C)** Groupe substituant électroattracteur (*p*-chloroaniline) (38).



La première étape de ce projet consistait donc à synthétiser les deux amines substituées ci-dessus. Ces deux amines allaient être synthétisées à partir de deux amides: le *p*-chlorobenzamide (**3.3**) et le *p*-toluamide (**3.4**) (**Schéma 10**). Nous avons commencé en préparant un anhydride pour chaque amide à partir de chlorures d'acyles. L'anhydride de l'acide *p*-chlorobenzoïque (**3.1**) et l'anhydride de l'acide *p*-toluïque (**3.2**) peuvent être activés avec de la triéthylamine pour ensuite réagir, au besoin, avec du chlorure d'ammonium pour former les amides. Du carbonate de sodium est utilisé comme base. Cette méthode nous permet de synthétiser une grosse quantité (2,5 g) d'anhydride (qui est assez stable), puis de synthétiser au besoin, à partir de celui-ci, l'amide. Les rendements obtenus pour les composés **3.1** et **3.2** ainsi que pour les composés **3.3** et **3.4** étaient les mêmes.

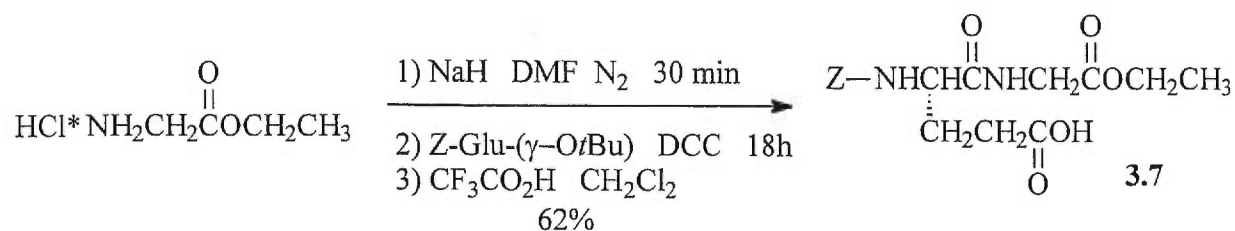
Schéma 10: Préparation des amides via l'utilisation d'anhydrides

La prochaine étape était de transformer les amides en carbamates pour ensuite pouvoir les transformer en amines. Pour faire ceci, nous avons essayé une nouvelle méthode pour faire le réarrangement de Hofmann; une méthode développée dans notre laboratoire (39) qui utilise des conditions plus douces d'oxydation et qui se produit dans une plus courte période de temps (**Schéma 11**). Cette méthode consiste à faire dissoudre du sodium métallique dans du méthanol pour obtenir du méthoxyde de sodium. Ce dernier réagit avec l'amide, en présence de NBS (*N*-bromosuccinimide), sous reflux à environ 80 °C et la réaction est complète après environ 10 minutes. D'après les résultats de nos synthèses, la combinaison méthoxyde de sodium/NBS semble être un oxydant beaucoup plus doux que d'autres oxydants utilisés dans des réarrangements de Hofmann, tels que le tétraacétate de plomb et le diacétate de mercure. De plus, il n'est pas aussi sensible à l'humidité que le tétraacétate de plomb et pose l'avantage de ne pas contaminer le produit (nous évitant donc de faire une purification pour l'enlever). La déprotection pour retrouver l'amine est ensuite faite en hydrolysant le carbamate en milieu basique.

Schéma 11: Réarrangement de Hofmann modifié

3-3-2 - Préparation du *N-Z-γ-tert-butyl glutamylglycine éthyl ester*

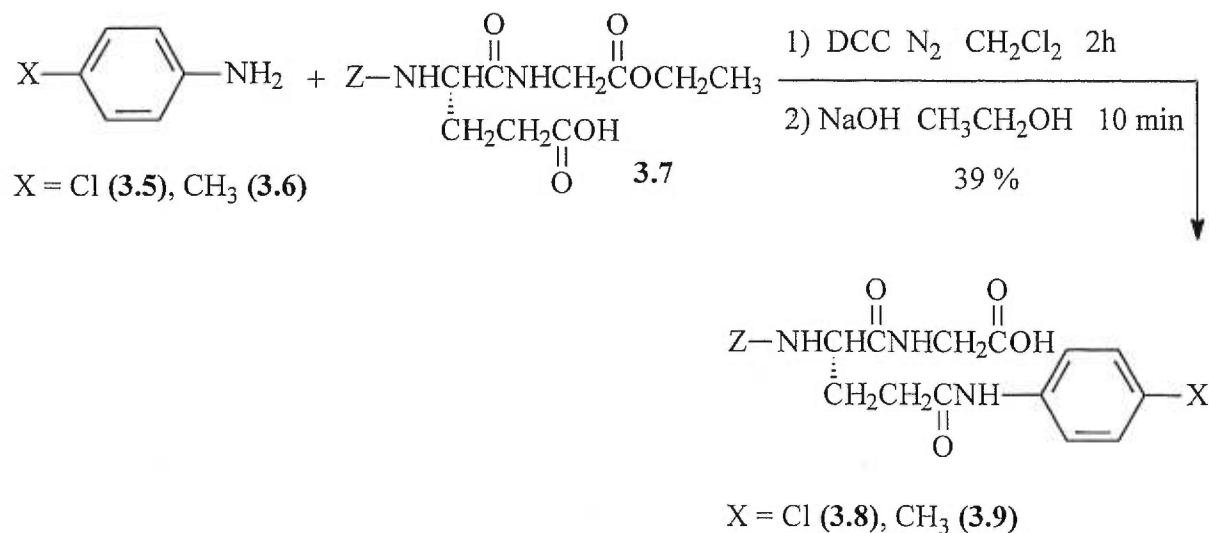
La synthèse d'un dipeptide, la *N-Z-glutamylglycine éthyl ester* (3.7), était nécessaire afin de coupler cette dernière avec les amines pour donner les anilides. Pour obtenir ce dipeptide, il a fallu synthétiser la *N-Z-(γ-tert-butyl)glutamylglycine éthyl ester* par couplage DCC entre la glycine éthyl ester et la *N-Z-γ-glutamate de tert-butyle* (Schéma 12). Cette réaction fonctionne bien si tout est utilisé en excès (soit environ 2 équivalents) par rapport à la concentration de *N-Z-γ-glutamate de tert-butyle* (limitant). Le produit final est ensuite obtenu en enlevant le groupe protecteur *tert-butyle* à l'aide d'acide trifluoroacétique. Un des seuls problèmes rencontrés durant cette réaction était la formation d'une quantité appréciable d'urée (un produit secondaire habituel du couplage avec le DCC) lors de la réaction de couplage, mais celle-ci peut être facilement enlevée par chromatographie.

Schéma 12: Synthèse de la *N-Z-glutamylglycine éthyl ester* (3.7)

3-3-3 – Couplage du dipeptide et de l'amine

L'étape finale consistait à coupler les amines avec le dipeptide synthétisé, la *N*-Z-glutamylglycine éthyl ester (**3.7**). Pour ceci, nous avons une fois de plus effectué un couplage par DCC (**Schéma 13**). Le couplage par DCC est une réaction facile qui donne un bon rendement, mais il faut subséquemment purifier le produit obtenu par chromatographie pour enlever l'urée formée. Une fois le couplage terminé, il faut déprotéger le nouveau dipeptide synthétisé en utilisant du NaOH avec de l'éthanol. Les produits sont ensuite purifiés par recristallisation en utilisant de l'eau et un peu d'éthanol. Le rendement faible de 40 % (obtenu pour les deux anilides **3.8** et **3.9**) peut être attribué à l'étape de déprotection puisque le couplage tout seul donne un rendement de 90 %. Il est fort possible que les conditions de déprotection soient un peu trop fortes pour le produit et qu'il se produit une hydrolyse de l'anilide. De plus, une recristallisation donne souvent un produit pur, mais le rendement en souffre beaucoup.

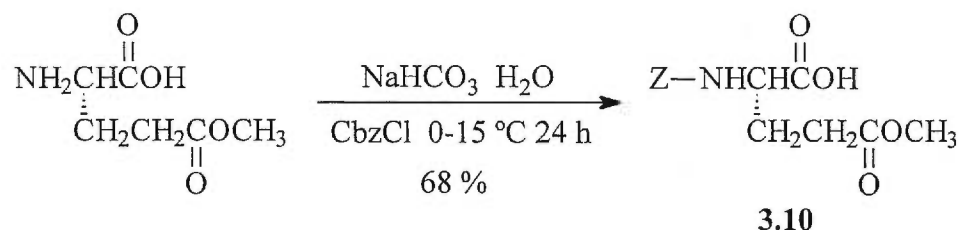
Schéma 13: Couplage DCC entre la *N*-Z-glutamylglycine éthyl ester (**3.7**) et les anilines synthétisées pour obtenir les anilides *N*-Z-L-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine (**3.8**) et *N*-Z-L-glutamyl(γ -*p*-méthylanilide)glycine (**3.9**).



3-4 - *N*-Carbobenzyloxy- γ -(*N*-méthyl) glutamylglycine

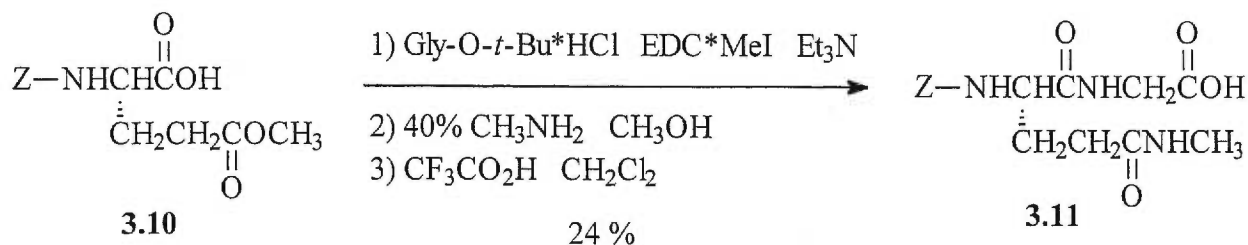
La synthèse de ce produit s'est faite en quatre étapes: la protection de l'amine de l'acide L-glutamique-5-méthyl ester, le couplage avec la glycine *t*-Bu-ester, l'aminolyse du méthyl ester et la déprotection de la glycine. La protection du groupe α -amino de l'acide L-glutamique-5-méthyl ester avec un groupe carbobenzyloxy est faite simplement avec du Cbz-Cl et donne un rendement acceptable (**Schéma 14**). La réaction est débutée dans un bain de glace pour une période de 2 h, puis le mélange est ensuite laissé à température ambiante pour 22 heures.

Schéma 14: Protection de l'acide L-glutamique-5-méthyl ester par un groupe carbobenzyloxy pour obtenir du *N*-Z-acide-L-glutamique-5-méthyl ester (3.10).



L'acide glutamique ainsi protégé, le couplage peptidique avec la glycine *t*-Bu-ester*HCl a pu être réalisé (**Schéma 15**). Plutôt que de faire un couplage par DCC, il a été fait par EDC. Cet agent de couplage, qui fonctionne aussi bien que le DCC, possède comme avantage une grande facilité de purification du produit final puisque l'EDC est soluble dans l'acide aqueux et peut être enlevé par simple extraction acide-base à la fin du couplage. Ensuite, l'ester est transformé en amide par une aminolyse avec la méthylamine. L'amide formé, il ne reste qu'à effectuer une déprotection de l'acide (*t*-Bu-ester) à l'aide d'acide trifluoroacétique. Le produit final, le *N*-Z-L-glutamyl(5-*N*-méthylamide)glycine, est ensuite purifié et prêt à utiliser pour des études cinétiques.

Schéma 15: Préparation du *N*-carbobenzyloxy- γ -(*N*-méthyl) glutamylglycine (3.11).



3-5 - Conclusion

La synthèse de tous les composés dans ce chapitre a été faite en suivant des routes synthétiques typiques à l'exception du réarrangement de Hofmann, dont la méthode a été développée dans notre laboratoire par le Dr. Xicai Huang (39). Cette dernière fonctionne très bien, donne des bons rendements, une immense facilité de manipulation ainsi qu'un temps de réaction total d'environ 10 minutes. En comparaison avec les méthodes classiques utilisant du tétraacétate de plomb ou du diacétate de mercure, cette nouvelle méthode est une vraie amélioration. Les vieilles méthodes laissaient toujours des traces de contamination dans le produit, peu importe le nombre de purifications effectuées. Une simple extraction acide-base était la seule étape de purification nécessaire lors de l'isolation du produit obtenu par la nouvelle méthode.

En ce qui concerne les produits fluorés, les réactions étaient toutes simples et typiques. Nous n'avons pas pu confirmer la configuration absolue du 2-fluoropropionamide puisque nous n'avons pas eu la chance de faire une étude aux rayons-X du produit. Nous aurions pu essayer de déterminer la stéréochimie d'une autre façon, mais des considérations sur la réactivité du composé prenaient plus d'importance que celles de la stéréochimie.

Tous les composés synthétisés ont été obtenus en quantités suffisantes pour faire des essais cinétiques. Ils ont tous été caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C , par point de fusion et par spectrométrie de masse. Les spectres obtenus étaient propres et les points de fusion, précis. Les produits ont ensuite été utilisés pour des études cinétiques avec la TGase, dont les résultats sont trouvés dans le chapitre 6.

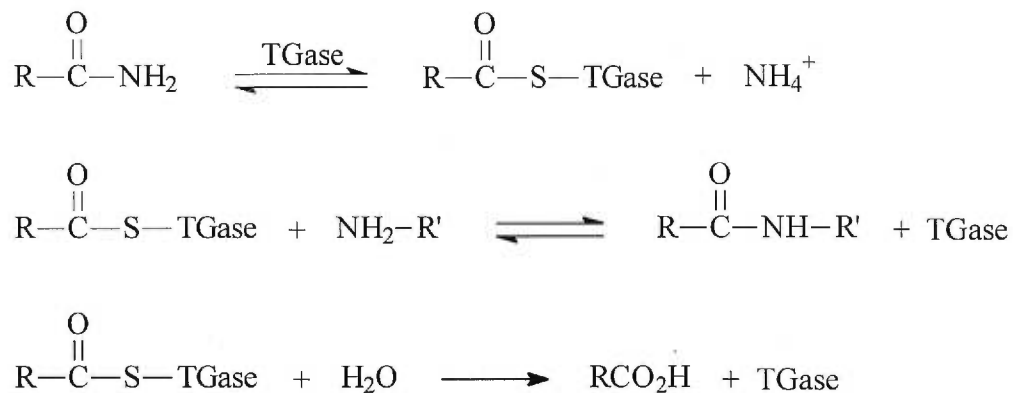
Chapitre 4 – Une méthode spectrophotométrique continue à enzyme couplée pour suivre les cinétiques de la transglutaminase

4-1 - Introduction

4-1-1 - Objectif

Pour pouvoir étudier l'étape d'acylation du mécanisme enzymatique de la TGase, il faut suivre le progrès de la réaction par la disparition du premier substrat (amide) ou bien par la formation du premier produit (l'ammoniac). Ceci se fait, bien sur, en assumant que l'étape d'acylation est en fait l'étape limitante du cycle catalytique. Il existe présentement plusieurs techniques pour suivre la disparition d'un amide au sein d'une réaction: par RMN ^1H , ^{14}C ou ^{15}N , par fluorimétrie si l'amide ou l'amine possède un groupe fluorescent ou par marquage radioactif (par exemple, par ^{14}C sur l'amide) et un compteur à scintillation. Toutes ces techniques possèdent des désavantages, par exemple, un grand nombre de manipulations, une limitation au niveau de l'écart pH où la méthode fonctionne ou une limitation au niveau des substrats utilisés.

Dans le mécanisme de type ping-pong modifié appartenant à la TGase, un thiol présent dans le site actif est acylé par un amide, résultant en la libération d'un équivalent d'ammoniac, avant d'être désacylé par hydrolyse ou par aminolyse (40) (Figure 12).

Figure 12: Résumé des réactions impliquées dans le mécanisme de la TGase

Le progrès de l'acylation de la TGase pourrait aussi être suivi en dosant la libération d'ammoniac plutôt que de suivre la disparition d'amide. Il existe déjà plusieurs méthodes pour doser l'ammoniac en milieu aqueux. Par exemple, il y a la méthode de Nessler (20), où un complexe coloré est formé entre l'ammoniac et un réactif ($\text{HgI}_2 \cdot 2\text{KI}$) dans des conditions basiques. Il y a aussi la méthode de révélation à la ninhydrine (41), où un complexe coloré/fluorescent est formé entre une amine primaire et le 1,2,3-indantrione monohydrate. Ces deux méthodes de dosage colorimétrique peuvent mesurer des quantités d'ammoniac en concentrations aussi faibles que 1 mM (dans le cas de Nessler). Par contre, elles ne peuvent pas être utilisées pour suivre la réaction cinétique de façon continue, ce qui serait l'idéal puisque des méthodes discontinues peuvent être ennuyeuses et plus susceptibles aux erreurs expérimentales.

4-1-2 – La glutamate déshydrogénase (GDH)

Une méthode existait déjà pour suivre de façon continue la formation d'ammoniac dans la réaction d'une enzyme de la même famille (EC 2.3.2.-) que la transglutaminase, la γ -glutamyl transpeptidase (GGT) (EC 2.3.2.2) (42). Cette réaction impliquait une seconde enzyme, la glutamate déshydrogénase (GDH)

(EC 1.4.1.3) qui catalysait une réaction secondaire à celle de la GGT (43) (**Schéma 18**).

Schéma 18: Réaction catalysée par la GDH

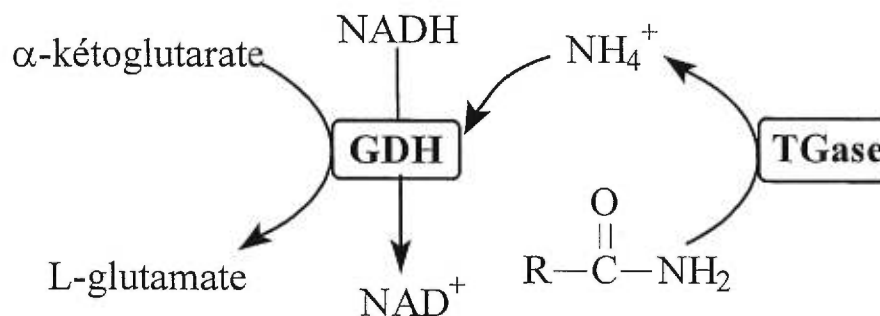


L'enzyme (GDH) prend l'ammoniac libéré lors de la réaction enzymatique de la GGT et l'utilise pour faire une amination réductive du α -kétoglutarate en L-glutamate, tout en oxydant du NADH en NAD^+ . Cette dernière réaction peut être suivie spectrophotométriquement (diminution d'absorbance du NADH), ce qui permet de suivre, de manière simple et continue, la réaction cinétique.

Il ne suffisait qu'à adapter cette méthode pour la TGase pour pouvoir suivre les réactions cinétiques de façon continue (**Figure 13**). Cette méthode aurait comme avantages par rapport à une méthode discontinue (telle que celle de Nessler) la liberté d'utiliser presque n'importe quel accepteur acyle (aminé primaire) ainsi qu'une réduction importante du nombre d'erreurs expérimentales qui seraient dues à un nombre élevé de manipulations.

Pour que ce nouveau système fonctionne, il faut que trois conditions soient satisfaites: Premièrement, il faut que la réaction avec la GDH se produise beaucoup plus rapidement que la réaction avec la TGase pour s'assurer que nous suivons bel et bien la réaction enzymatique de la TGase et non celle de la GDH. Deuxièmement, il faut s'assurer que la TGase ne consomme pas la GDH comme substrat. Troisièmement, il faut s'assurer qu'il n'y ait pas d'interférences entre les composés utilisés (substrats et co-substrats de la GDH ou de la TGase) et les enzymes.

Figure 13: La méthode spectrophotométrique continue à enzyme couplée GDH-TGase. L'ammoniac produit par la réaction enzymatique de la TGase se lie à la GDH pour effectuer une amination réductive du α -kétoglutarate, produisant du L-glutamate tout en oxydant le β -NADH en NAD^+ (41). Cette oxydation est suivie spectrophotométriquement en observant une diminution d'absorbance à 340 nm due à la disparition du NADH.



4-2 – Résultats et discussion

4-2-1 - Conditions de base

Premièrement, il fallait déterminer les conditions de réaction pour le dosage. Nous avons utilisé comme point de départ une fusion des conditions de réaction de deux expériences différentes: celles du test d'activité de la transglutaminase (test d'hydroxamate) (17) et celles de la réaction de dosage d'ammoniac avec la GDH (43). Nous avons utilisé le même tampon et les mêmes concentrations de tampon, de chlorure de calcium et de EDTA que le test d'activité de la TGase. Le pH et les concentrations de NADH et de α -kétoglutarate ont tous été tirés du dosage d'ammoniac avec la GDH (**Tableau 3**). Les concentrations d'enzymes à utiliser ne sont pas incluses car elles sont déterminées plus loin.

Tableau 3: Conditions utilisées comme point de départ lors du développement de la méthode de dosage à enzyme couplée. Les concentrations d'enzyme ne sont pas comprises.

Composé	Concentration
Tampon Tris-acétate (pH 7,0)	200 mM
CaCl ₂	5 mM
EDTA	1 mM
β-NADH	250 μM
α-kétoglutarate	10 mM

Pour s'assurer qu'il n'y ait aucune limitation de la méthode causée par la GDH, les substrats pour celle-ci étaient en concentrations supérieures à leurs valeurs de K_M : 123 μM pour α-kétoglutarate et 18 μM pour le β-NADH (44).

4-2-2 - Modification du tampon

Ces conditions ont nécessité quelques ajustements. En ce qui concerne le tampon, il ne doit être utilisé que dans un intervalle de plus ou moins 0,5 unités de pH du pK_a du tampon (45). Le pK_a de l'acide conjugué du tampon Tris (Tris(hydroxyméthyl)aminométhane) est de 8,06 et devrait donc être utilisé pour un intervalle de pH allant de 7,5 à 8,5. Puisque nous voulons obtenir un solution tamponnée à un pH de 7,0, le tampon idéal à utiliser serait le MOPS (acide sulfonique *N*-morpholinopropane) qui a un pK_a (de l'acide conjugué) de 7,2 et donc, peut être utilisé dans un intervalle de pH allant de 6,7 à 7,7. Ce changement a donc été effectué tout en gardant la même concentration que le Tris, soit 200 mM.

4-2-3 - Détermination de la concentration de GDH à utiliser

Pour déterminer quelle était la plus petite quantité de GDH qui pouvait être utilisée tout en donnant des résultats fiables, quatre quantités finales d'enzyme ont été choisies en se basant sur les conditions d'une expérience similaire impliquant la GDH (42). Les quantités finales de GDH utilisées étaient de 12 U, 2,4 U, 1,2 U et 0,6 U.

En ce qui concerne le choix de la concentration d'ammoniac à utiliser durant ces essais, nous avons procédé de la manière suivante: nous savons que le K_M de la Z-Gln-Gly avec la TGase est d'environ 5 mM (35,4). De plus, nous savons que la réaction enzymatique de la TGase produit une molécule d'ammoniac pour chaque molécule de Z-Gln-Gly consommée. Donc, la concentration finale d'ammoniac attendue durant une réaction entre la TGase et 5 mM de Z-Gln-Gly devrait être d'environ 5 mM. Alors, si nous voulons utiliser une concentration d'ammoniac qui serait représentative de la concentration d'ammoniac libérée lors de la réaction enzymatique de la TGase avec une concentration K_M de Z-Gln-Gly, une concentration d'environ 5 mM devrait être appropriée.

En utilisant les conditions établies ci-haut, nous avons fait des essais cinétiques. En utilisant une cuvette en quartz de 1 mL, il faut préincuber pendant 3 minutes à 37 °C une solution de 200 mM tampon MOPS (pH 7,0), 5 mM CaCl_2 , 1 mM EDTA, 250 μM NADH, 10 mM α -kétoglutarate, et 5 mM NH_4Cl (source d'ammoniac) dans un volume final de 475 μL . La réaction enzymatique est ensuite initiée en ajoutant de la GDH (quantités variables) pour donner un volume final de 500 μL . La cuvette est placée dans le spectrophotomètre, à 37 °C, et la diminution d'absorbance est suivie (**Tableau 4**).

Tableau 4: Détermination de l'activité de GDH appropriée pour les études cinétiques avec du NH_3 . L'erreur expérimentale dans ces valeurs tirées des résultats de trois expériences identiques est estimée à $\leq 10\%$.

Nombre d'unités GDH	Vitesse (abs/min) ^a	Activité ($\mu\text{mol}/\text{min}$) ^b
12	-----*	-----*
2,4	1,1520	0,926
1,2	0,4148	0,333
0,6	0,3480	0,280

* La réaction s'est déroulée trop vite pour obtenir des résultats.

^a La vitesse est obtenue en prenant la pente initiale (premiers 10-20% de la réaction) sur le graphique d'absorbance en fonction de temps pour la réaction. Les vitesses données sont des diminutions d'absorbance.

^b L'activité est obtenue en divisant la vitesse par le coefficient d'extinction du NADH à 340 nm (6220 abs/M*cm) et en la multipliant par le volume utilisé (0,5 mL).

Cette expérience a été faite pour nous donner une idée de l'activité de la GDH, sous les conditions cinétiques, en présence d'ammoniac. Nous voulions aussi déterminer le domaine d'unités de GDH à utiliser lors des expériences avec la TGase. Pour s'assurer que la GDH fonctionne plus vite que la TGase et ne limite pas la réaction, elle doit avoir une activité supérieure à celle de la TGase. En assumant que la TGase qui sera utilisée pour les cinétiques a une activité autour de $0,28 \mu\text{mol}/\text{min}$ (activité spécifique = $8 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$; $[\text{TGase}] = 0,35\text{mg}/\text{mL}$ selon l'enzyme disponible dans notre laboratoire au moment de l'expérience), le nombre d'unités de GDH qui serait le plus adéquat serait de 1,2 U.

Nous avons ensuite tenté le même genre d'expérience, mais cette fois-ci, en utilisant un système complet incluant la TGase, une amine primaire comme accepteur acyle et un substrat pour la TGase, de la Z-Gln-Gly. Cette dernière est utilisée en concentrations élevées (équivalent à $2 K_M$), soit 10 mM (17). Puisque l'hydroxylamine interfère possiblement avec la GDH, il fallait trouver un autre

second substrat. Pour ceci, de la *N*-acétyllysine méthyl ester a été choisie puisqu'elle ressemble beaucoup au substrat accepteur natif de la TGase. Ce dernier a un K_M de 0,668 mM avec la TGase (46) donc, pour s'assurer de l'avoir en concentrations saturantes, nous utilisons une concentration équivalente à 5 fois cette valeur, soit 3,34 mM (**Tableau 5**).

Tableau 5: Conditions modifiées utilisées lors du développement de la méthode de dosage à enzyme couplée (les modifications sont dans les cases grises)

Conditions de départ	Conditions modifiées
200 mM tampon Tris-acétate (pH 7,0)	200 mM tampon MOPS (pH 7,0)
5 mM CaCl ₂	5 mM CaCl ₂
1 mM EDTA	1 mM EDTA
250 µM β-NADH	250 µM β-NADH
10 mM α-kétoglutarate	10 mM α-kétoglutarate
aucun	10 mM Z-Gln-Gly
aucun	3,34 mM <i>N</i> -acétyl lysine méthyl ester
Pas déterminée	0,28 U TGase
Pas déterminée	GDH (variation de 1,2 à 3,6 U)

La quantité de GDH est variée de 1,2 U à 3,6 U. La quantité de TGase utilisée est basée sur celle typiquement utilisée durant les tests d'activité (voir chapitre 8). Les essais cinétiques sont effectués tels que décrits précédemment et les résultats se retrouvent dans le **Tableau 6**.

Tableau 6: Vitesses observées lors de la variation du nombre d'unités de GDH lors d'essais du système cinétique à enzyme couplée TGase-GDH. L'erreur expérimentale dans ces valeurs tirées des résultats de trois expériences identiques est estimée à $\leq 10\%$.

Nombre d'unités GDH	V (abs/min)
1,2	0,0413
2,4	0,0631
3,6*	0,0680

*Il faut noter qu'après 25 minutes de cinétique, une augmentation en absorbance a été observée, correspondant à une précipitation de protéine.

D'après les résultats de l'expérience, une quantité finale de 2,4 U de GDH a été choisie pour deux raisons: il ne semblait pas y avoir de différence significative entre la vitesse de la réaction utilisant 2,4 U et 3,6 U de GDH, ce qui signifie que la GDH est en quantité suffisante pour rendre sa réaction plus rapide que celle de la TGase. Donc, nous suivons uniquement la réaction de la TGase lors de l'utilisation de 2,4 U de GDH. De plus, la seconde concentration (3,6 U) semblait être trop concentrée et a causé une formation de précipité après 25 minutes de cinétique. Cette précipitation, possiblement due à une dénaturation de la GDH, rend l'utilisation de 3,6 U de GDH inacceptable.

4-2-4 - Détermination des quantités de TGase et de NADH à utiliser

Puisque la TGase purifiée est rare et précieuse, il fallait s'assurer d'utiliser le minimum d'enzyme possible. Par contre, il fallait que cette quantité d'enzyme soit quand même assez élevée pour produire de bons résultats. Alors, nous avons fixé la concentration de Z-Gln-Gly et varié la concentration de TGase. En même temps,

pour s'assurer que la concentration de NADH utilisée était la bonne, nous avons varié la concentration de NADH pour obtenir la concentration idéale (**Tableau 7**).

Tableau 7: Optimisation des quantités de TGase et de NADH à utiliser lors des essais cinétiques. La vitesse obtenue est corrigée pour la concentration de TGase utilisée. Les tests sont faits avec 2,4 U GDH. L'erreur expérimentale dans ces valeurs tirées des résultats de trois expériences identiques est estimée à $\leq 10\%$.

[Z-Gln-Gly] (mM)	Vitesse obtenue, V ($\mu\text{mol}/\text{min}$ par μmol TGase)		
	0,14 U TGase / 250 μM NADH	0,14 U TGase / 500 μM NADH	0,28 U TGase / 500 μM NADH
15	39,7	43,0	39,6
10	47,5	47,1	37,8
5	35,2	31,0	25,5

Si la TGase est présente en quantité limitante, en doublant la quantité de TGase en solution, la vitesse observée devrait doubler. Dans le **Tableau 7**, les valeurs de vitesses sont corrigées pour la concentration de TGase. Donc, si la vitesse double lors du dédoublement de la quantité de TGase en solution, la vitesse présentée en $\mu\text{mol}/\text{min}$ par μmol TGase devrait demeurer la même. Comme il est possible de le constater, une variation de la concentration de TGase de 0,14 U à 0,28 U semble donner les mêmes résultats $\pm 20\%$, ce qui signifie qu'à une concentration de 0,14 U, nous sommes à une concentration limitante de TGase.

En ce qui concerne le NADH, en variant la concentration de 250 μM à 500 μM , la durée totale de l'expérience augmente mais les résultats demeurent pratiquement les mêmes. La durée augmente parce qu'il y a plus de NADH à consommer par la GDH et il y a normalement terminaison de la réaction observée lorsque tout le NADH est consommé. En utilisant une concentration plus élevée de NADH (500 μM), la réaction durera plus longtemps, ce qui nous permettra d'obtenir

des résultats moyennés sur plus de temps. Par exemple, à concentration élevée de Z-Gln-Gly, la pente observée sur le graphique d'absorbance en fonction de temps est abrupte, donc, la vitesse observée est élevée. Donc, en utilisant plus de NADH, nous pourrions obtenir une valeur plus précise puisque les résultats seront moyennés sur plus de temps (**Tableau 8**). Il est important de pouvoir voir la fin de la réaction pour s'assurer qu'il n'y ait pas eu de précipitation non-désirée dans la cuvette.

Tableau 8: Troisième modification des conditions utilisées lors du développement de la méthode de dosage à enzyme couplée (les modifications sont dans les cases grises)

Conditions de départ	Première modification	Deuxième modification
200 mM tampon Tris-acétate (pH 7,0)	200 mM tampon MOPS (pH 7,0)	200 mM tampon MOPS (pH 7,0)
5 mM CaCl ₂	5 mM CaCl ₂	5 mM CaCl ₂
1 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM EDTA
250 µM β-NADH	250 µM β-NADH	500 µM β-NADH
10 mM α-kétoglutarate	10 mM α-kétoglutarate	10 mM α-kétoglutarate
aucun	10 mM Z-Gln-Gly	10 mM Z-Gln-Gly
aucun	3,34 mM <i>N</i> -acétyl lysine méthyl ester	3,34 mM <i>N</i> -acétyl lysine méthyl ester
Pas déterminée	0,28 U TGase	0,14 U TGase
Pas déterminée	GDH (variation de 1,2 à 3,6 U)	2,4 U GDH

4-2-5 - Tests de compatibilité entre la GDH et la TGase

La prochaine chose à faire a été de voir si la GDH était stable sous les conditions cinétiques (en absence d'ammoniac et de Z-L-Gln-Gly) pour au moins 15

minutes. Sur le graphique d'absorbance en fonction du temps, une ligne horizontale a été observée. Ceci indique qu'il n'y a aucune réaction entre la GDH et les produits en solution, c'est-à-dire, aucune réaction produisant de l'ammoniac. De plus, l'enzyme ne semble pas précipiter. Ensuite, pour s'assurer que l'enzyme fonctionnait encore, de l'ammoniac (NH_4Cl) a été rajouté à la cuvette pour donner une concentration de 5 mM, comme les tests de la section 4-2-3. Immédiatement, une diminution d'absorbance a eu lieu, donnant une pente de 1,0871 abs/min, ce qui ressemble énormément à la valeur trouvée précédemment (**Tableau 4**) de 1,1520 abs/min (mêmes concentrations d'enzyme, d'ammoniac et de co-substrats). Ceci nous assure que la GDH fonctionne bien dans les conditions cinétiques développées.

Le prochain test à faire a été de voir si la GDH réagit avec la Z-L-Gln-Gly ou pour voir s'il y a possibilité qu'elle l'utilise comme substrat. Une concentration de 15 mM de Z-L-Gln-Gly a été utilisée, ce qui est équivalent à 3 K_M pour la TGase (17). Une fois de plus, une ligne horizontale a été observée sur le graphique d'absorbance en fonction du temps. Il ne semble donc pas y avoir d'interaction entre la GDH et la Z-L-Gln-Gly.

4-2-6 - Tests d'inhibition de la TGase en présence de co-substrats pour la GDH

D'autres tests ont été faits pour vérifier la stabilité de la TGase en présence des divers produits présents dans le mélange cinétique. Ceci a permis de voir si un des produits avait une activité inhibitrice sur l'enzyme. Un test d'activité standard (test d'hydroxamate, voir Annexe A) pour la TGase a été fait sur l'enzyme après l'avoir laissée 10 minutes à 37 °C avec chaque substrat/produit de la réaction de la GDH (20 mM α -kétoglutarate, 20 mM d'acide L-glutamique, 0,4 mg/mL GDH. Les quantités utilisées sont en excès des conditions déterminées dans le **Tableau 8** pour bien s'assurer qu'il n'y a aucune interférence). L'expérience a aussi été répétée avec de l'eau comme contrôle. D'après les résultats observés, l'activité de l'enzyme ne

semble pas changer en présence des substrats/produits de la réaction de la GDH (Tableau 9).

Tableau 9: Tests pour inhibition pour les substrats/produits de la réaction de la GDH envers la TGase (37 °C, 10 minutes)

Co-substrat	Activité spécifique* ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ TGase)
Eau (contrôle)	10,5
100 mM α -kétoglutarate	10,5
100 mM acide L-glutamique	10,0

* Pour chaque produit, l'expérience a été répétée en triplicata. La moyenne des trois valeurs obtenues est présentée. L'erreur expérimentale est estimée à $\leq 10\%$.

4-2-7 - Vérification que la TGase n'utilise pas la GDH comme substrat

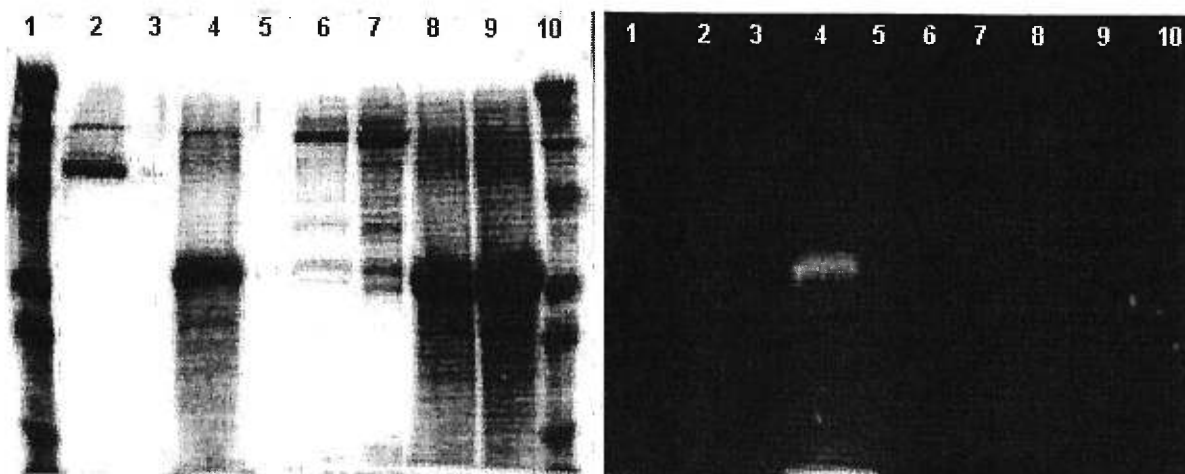
Une expérience de contrôle finale a été faite pour confirmer que la GDH n'est pas un substrat (donneur glutamyl) pour la TGase. Une expérience d'incorporation de fluorophore a été faite en utilisant de la monodansylcadavérine (MDC), une amine primaire fluorescente qui sert de substrat (accepteur acyle) pour la TGase (47). Pour ceci, il fallait avoir un contrôle actif pour s'assurer de la validité de nos observations. Dans ce cas-ci, il fallait trouver un composé qui pouvait servir de substrat donneur acyle pour la TGase et qui avait une masse molaire assez élevée (plus que 20 kDa, où 1 kDa correspond à une masse molaire de 1000 g/mol) pour être distingué sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Le composé idéal, la *N,N*-diméthyl caséine, avait déjà été utilisée comme substrat pour la TGase lors d'une expérience similaire d'incorporation de fluorescence (48). En se basant sur les procédures obtenues de ces deux articles, nous avons pu faire une expérience pour prouver que la GDH n'est pas utilisée comme substrat pour la TGase.

Dans les conditions finales suivantes, 0,26 unités de TGase ont été ajoutées à

une solution formée par 200 mM tampon MOPS (pH 7,0), 5 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, 0,75 mM MDC et 1 mg/mL GDH ou 2 mg/mL *N,N*-diméthyl caséine (contrôle actif). Le tout a été agité et incubé à 37 °C pendant 30 minutes avant d'être "quenché" dans une solution de dénaturation SDS (voir chapitre 8) à 95 °C pendant 4 minutes.

Les deux échantillons sont passés à travers un gel pour ensuite être révélés à la lumière ultraviolette et au zinc (34) (**Figure 14**). Les résultats sont très clairs: il n'y a aucune incorporation de fluorescence dans la bande de GDH (colonne 2), tandis que dans la bande de la *N,N*-diméthyl caséine (contrôle actif utilisé parce qu'il est le seul de la famille des caséines qui réagit bien avec la TGase), il est possible d'observer de la fluorescence (puits 4).

Figure 14: Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de l'expérience d'incorporation de fluorescence. Les puits 1 et 10 contiennent des marqueurs moléculaires (large échelle: 7,2, 20,4, 28,3, 34,8, 49,5, 79,5, 115 et 208 kDa). Le puits 2 contient la TGase, la GDH et le MDC. Les puits 3 et 5 sont vides. Le puits 4 contient de la TGase, *N,N*-diméthylcaséine et MDC. Les puits 6 et 7 contiennent seulement de la TGase. Les puits 8 et 9 contiennent seulement de la *N,N*-diméthylcaséine. Les deux images sont du même gel (12% Tris-HCl avec un gel de concentration de 4%). L'image à gauche montre le gel révélé au zinc (34) tandis que l'image à droite démontre une photo du même gel sous de la lumière UV.



4-2-8 – Conditions finales

Après avoir fait toutes les expériences témoins, nous avons pu établir les conditions optimales à utiliser pour les études cinétiques (**Tableau 10**). Le type de tampon a été changé de Tris-acétate au MOPS, puisque ce dernier est meilleur à pH 7,0. Plus de NADH a été utilisé pour bien moyenner les résultats obtenus.

Tableau 10: Tableau sommaire des modifications effectuées lors du développement de la méthode de dosage à enzyme couplée. Les conditions de départ sont présentées à gauche et les conditions finales sont présentées à droite. Toute les modifications faites sont dans des cases grises.

Conditions de départ	Conditions finales
200 mM tampon Tris-acétate (pH 7,0)	200 mM tampon MOPS (pH 7,0)
5 mM CaCl ₂	5 mM CaCl ₂
1 mM EDTA	1 mM EDTA
250 µM β-NADH	500 µM β-NADH
10 mM α-kétoglutarate	10 mM α-kétoglutarate
aucun	10 mM Z-Gln-Gly
aucun	3,34 mM N-acétyl lysine méthyl ester
Pas déterminée	0,14 U TGase
Pas déterminée	2,4 U GDH

En ce qui concerne les quantités d'enzyme utilisées, nous avons décidé d'utiliser 0,14 U de TGase parce que cette quantité était économique au niveau de l'enzyme tout en donnant des bons résultats. De plus, pour s'assurer que la réaction avec la GDH se passait plus vite qu'avec la TGase, nous utilisons 17 fois plus d'unités de GDH que de TGase. Ces conditions permettront qu'à des concentrations saturantes des substrats pour la TGase (soit environ 5 fois plus grandes que leurs valeurs respectives de K_M^{app} , la constante Michaelis-Menten apparente observée),

une augmentation de la quantité de GDH ne donne pas d'effet visible.

4-3 – Résultats cinétiques obtenus

Avant de pouvoir commencer à faire des études cinétiques sur des nouveaux composés, tels que ceux décrits dans le chapitre 3, il fallait prouver que cette méthode pouvait produire de bons résultats fiables. Pour pouvoir prouver ceci, nous avons décidé de déterminer, avec notre méthode, les paramètres cinétiques (déjà publiés (49)) de la réaction entre la TGase et la Z-Gln-Gly. En comparant les résultats obtenus avec ceux de la littérature, nous pourrions ainsi confirmer la validité de notre méthode. Ces études ont utilisé de la Z-Gln-Gly comme substrat donneur acyle et un substrat accepteur acyle, la méthylamine, pour donner des résultats sur la réaction d'aminolyse. De plus, les études publiées incluaient aussi les résultats de la réaction d'hydrolyse (utilisant donc de l'eau comme substrat accepteur) avec la Z-Gln-Gly. Pour accomplir quelque chose de nouveau, nous avons décidé d'utiliser en plus un autre accepteur acyle, de la *N*-acétyl lysine méthyl ester (**Figure 15**).

Les expériences ont toutes été faites telles que décrites dans le chapitre 10: tous les substrats et co-substrats, dissous dans du tampon MOPS à pH 7,0, sont placés dans une cuvette spectrophotométrique en quartz de 1 mL. La GDH est rajoutée et le tout est incubé pendant 3 minutes à 37 °C. La TGase est ensuite ajoutée, la cuvette est agitée par inversion (brassage de haut en bas) et la réaction enzymatique est ainsi amorcée. La valeur de la pente de chaque graphique fait par le spectrophotomètre est convertie en vitesse en utilisant le coefficient d'extinction molaire du NADH ($6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (43)). Les vitesses obtenues sont utilisées pour tracer un modèle de courbe hyperbolique de saturation Michaelis-Menten à l'aide d'équations cinétiques d'aminolyse ou d'hydrolyse telles que publiées dans un article

de référence (49). Une comparaison des valeurs expérimentales trouvées avec les données publiées (49) démontre l'exactitude de la méthode et établit sa validité comme méthode cinétique (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Constantes cinétiques pour la réaction enzymatique de la Z-Gln-Gly avec la transglutaminase^a en présence de divers substrats accepteurs acyles

Substrat Accepteur Acyle	Expérimental ^b		Littérature ^c	
	K _M ^{app} (mM)	V _{max} ^d	K _M ^{app} (mM)	V _{max} ^d
N-Acétyl-L-lysine méthyl ester ^e	9,6	168	n/a	n/a
Méthylamine ^e	13,1	184	8,3 ± 2,0	167 ± 31
Eau (hydrolyse) ^f	4,1	34	2,0 ± 0,3	40.2 ± 5,2

^a Utilisant 0,14 unités de transglutaminase par test.

^b Déterminé en utilisant six concentrations de Z-Gln-Gly allant de 0,6 à 15 mM. L'erreur expérimentale dans ces valeurs de K_M^{app} et de V_{max} tirées des résultats de trois expériences identiques est estimée à ≤ 10%.

^c Référence (49). "n/a" signifie non-disponible.

^d V_{max} est donné en μmol/min par μmol de TGase, se basant sur une masse moléculaire pour l'enzyme de 90 kDa (17).

^e Paramètres calculés à partir de l'équation donnée dans la référence (49):

$$V = (V_{ab}AB) / (K_{ah}K_{bt} + K_{at}B + K_{bt}A + AB)$$
 où A = [Z-Gln-Gly] et B = [substrat accepteur acyle].
Noter que pour les valeurs présentées ici, K_M^{app} = K_{at} et V_{max} = V_{ab}. K_{bt} et K_{at} sont définis dans le chapitre 10.

^f Paramètres calculés à partir de l'équation donnée dans la référence (49):

$$V = (V_{max}A) / (K_M^{app} + A)$$
 où A = [Z-Gln-Gly].

Les valeurs obtenues pour la réaction d'aminolyse entre la Z-Gln-Gly et la méthylamine (**Figure 16**) ont donné des valeurs de K_M et de V_{max} qui ressemblent beaucoup aux valeurs publiées. La même chose s'applique pour la réaction d'hydrolyse (**Figure 17**). Il faut cependant noter que les valeurs obtenues pour le

V_{\max} sont beaucoup plus proches des valeurs publiées que les valeurs obtenues pour le K_M . En ce qui concerne la réaction d'aminolyse entre la Z-Gln-Gly et la *N*-acétyl lysine méthyl ester, il n'y avait aucun point de comparaison avec la littérature puisque c'était la première fois que cette expérience était faite.

D'après les résultats cinétiques obtenus, la réaction d'aminolyse avec la méthylamine comme accepteur acyle semble avoir une vitesse maximale plus élevée que celle avec la *N*-acétyl lysine méthyl ester. Par contre, en tenant compte de l'erreur expérimentale d'environ 10 %, les deux fonctionnent à environ la même vitesse. La même chose s'applique au niveau de l'affinité de l'enzyme envers la Z-Gln-Gly en présence de ces deux accepteurs acyles.

En ce qui concerne la réaction d'hydrolyse, la réaction se déroule beaucoup plus lentement. En fait, l'hydrolyse se déroule généralement jusqu'à dix fois plus lentement que l'aminolyse (45). Mais pourquoi l'affinité de l'enzyme envers la Z-Gln-Gly augmente-t-elle lors de l'hydrolyse? Simplement parce que dans ce cas, l'étape d'acylation n'est plus l'étape limitante du cycle catalytique: l'étape limitante est maintenant devenue l'hydrolyse du thioester intermédiaire. Donc, puisque le cycle fonctionne maintenant beaucoup plus lentement, l'enzyme a besoin de beaucoup moins de substrat donneur acyle (Z-Gln-Gly) pour atteindre sa vitesse maximale. Le K_M pour la Z-Gln-Gly devient donc plus petit, donnant l'apparence d'une augmentation d'affinité.

Figure 15: Détermination des paramètres cinétiques de la réaction enzymatique d'aminolyse impliquant de la Z-Gln-Gly comme donneur acyle avec de la *N*-acétyl lysine méthyl ester comme accepteur acyle à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les cinétiques sont faites à 37 °C en utilisant 0,14 U de TGase et 2,4 U de GDH. La concentration de Z-Gln-Gly est variée tandis que la concentration de *N*-acétyl lysine méthyl ester est fixée à 3,34 mM. Les données dans le graphique sont une moyenne des résultats obtenus de trois expériences identiques.

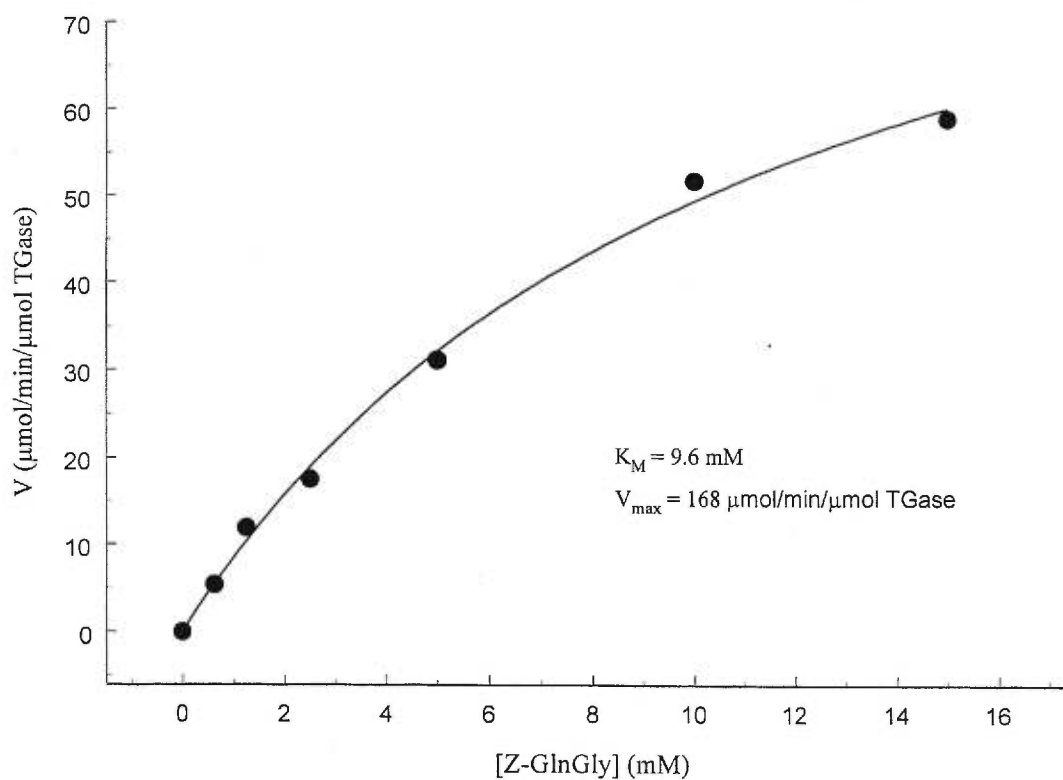


Figure 16: Détermination des paramètres cinétiques de la réaction enzymatique d'aminolyse impliquant de la Z-Gln-Gly comme donneur acyle avec de la méthylamine comme accepteur acyle à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les cinétiques sont faites à 37 °C en utilisant 0,14 U de TGase et 2,4 U de GDH. La concentration de Z-Gln-Gly est variée tandis que la concentration de méthylamine est fixée à 1 mM. Les données dans le graphique sont une moyenne des résultats obtenus de trois expériences identiques.

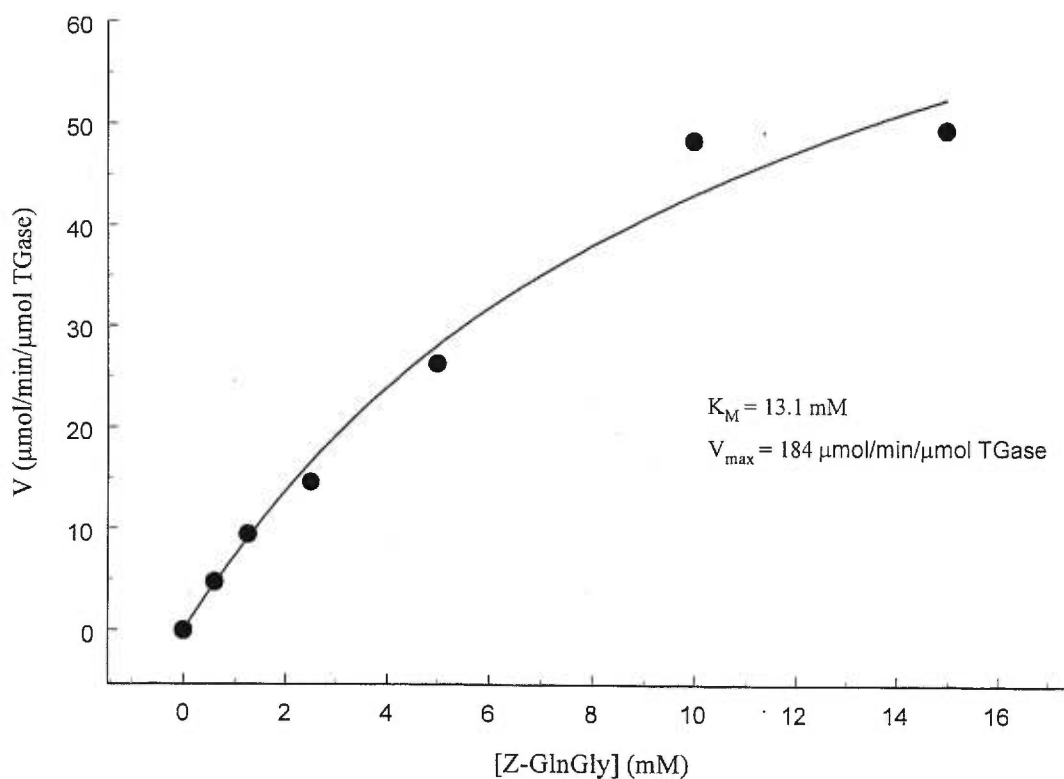
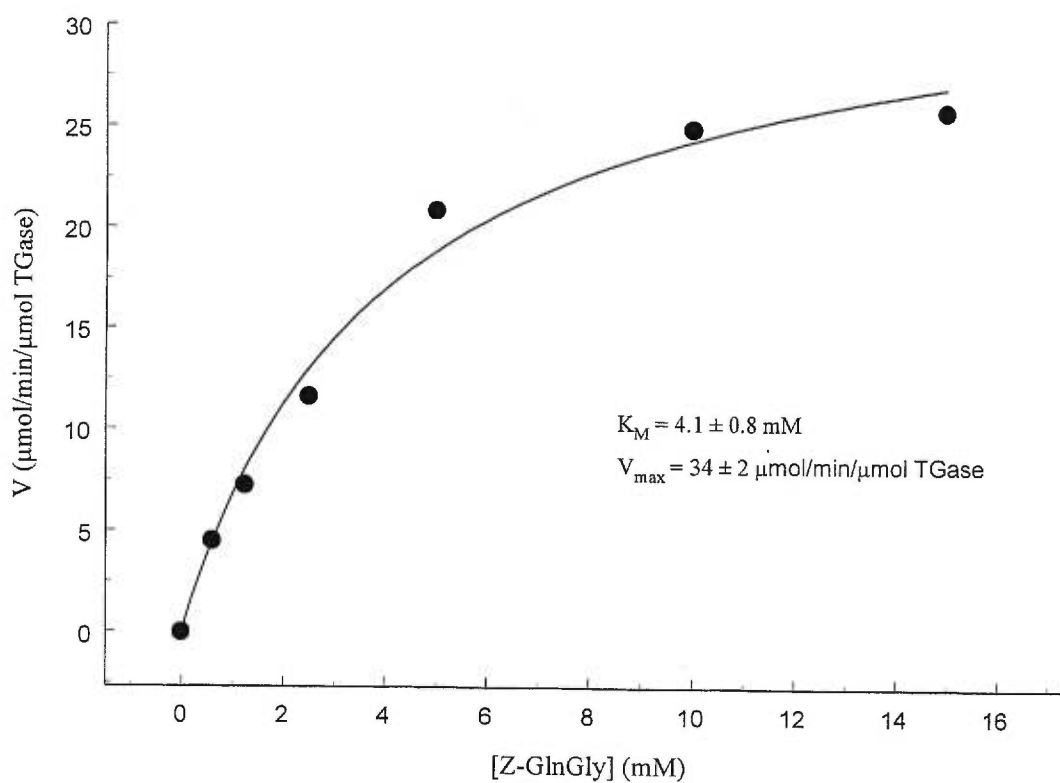


Figure 17: Détermination des paramètres cinétiques de la réaction enzymatique d'hydrolyse impliquant de la Z-Gln-Gly comme donneur acyle avec de l'eau comme accepteur acyle (hydrolyse) à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les cinétiques sont faites à 37 °C en utilisant 0,14 U de TGase et 2,4 U de GDH. La concentration de Z-Gln-Gly est variée. Les données dans le graphique sont une moyenne des résultats obtenus de trois expériences identiques.



4-4 – Conclusion

Cette nouvelle méthode d'enzyme couplée TGase-GDH peut être appliquée de manière générale à l'analyse de l'acylation de la TGase où le substrat donneur acyle est un amide primaire. Ainsi, durant chaque cycle catalytique de la TGase, un équivalent d'ammoniac est libéré pour réagir avec la GDH. Puisque cette méthode n'est pas affectée par l'identité du substrat accepteur acyle de la TGase, elle devrait être compatible avec une grande variété d'amines primaires. De plus, les amines primaires (à l'exception possible de l'hydroxylamine (50)) semblent être incapables de fonctionner comme substrats pour la GDH puisque celle-ci possède une haute spécificité pour l'ammoniac (51). L'hydroxylamine peut causer des problèmes puisqu'elle peut se décomposer et relâcher de l'ammoniac durant ce processus (en conditions légèrement acides, l'hydroxylamine peut se décomposer en ammoniac et en eau (50)). Donc, puisqu'elle peut affecter la concentration d'ammoniac qui est présente en solution lors des cinétiques, on peut dire que l'hydroxylamine pourrait affecter le bon fonctionnement de cette méthode.

En général, la flexibilité de cette procédure avec les substrats choisis, combinée avec la facilité d'une méthode spectrophotométrique continue, rendent cette méthode à enzyme couplée une technique rapide et pratique pour mesurer l'activité cinétique de la TGase (21).

Chapitre 5 – Profil pH de la transglutaminase

5-1 - Introduction

Le site actif d'une enzyme comprend plusieurs acides aminés, dont quelques uns sont impliqués dans la catalyse de la réaction enzymatique. Pour pouvoir déterminer le mécanisme enzymatique, il faut commencer en identifiant tous les acides aminés impliqués dans la catalyse: Il faut déterminer celui ou ceux qui vont former des liens covalents avec le substrat pour le mettre en position/conformation pour réagir; il faut déterminer le ou les acide(s) aminé(s) qui agiront comme nucléophile(s) ou électrophile(s); et il faut identifier les voisins de ceux-ci car ils peuvent aussi avoir une influence sur le rôle qu'ils joueront. Mais comment est-ce qu'on peut identifier tous ces acides aminés? Une façon de procéder est par cristallographie. Mais ceci n'est pas toujours une bonne option car obtenir les cristaux d'une enzyme peut être très difficile, même impossible, à faire. De plus, il faut se rappeler que la cristallographie ne donne qu'une seule image de l'enzyme gelée en état solide.

Une autre façon de procéder serait de suivre une méthode existante qui peut nous aider à identifier le nombre, et parfois l'identité, des acides aminés jouant un rôle dans la réaction enzymatique: analyser le profil pH. Un profil pH est essentiellement un graphique du logarithme népérien (\log) des paramètres cinétiques en fonction du pH pour une réaction choisie. Un profil K_M en fonction de pH nous donnera de l'information sur l'affinité de l'enzyme pour un substrat, un profil V_{\max} en fonction de pH nous donnera de l'information sur la vitesse de réaction de l'enzyme avec un substrat, et un profil V_{\max}/K_M en fonction de pH nous donnera de l'information sur l'efficacité de la réaction enzymatique en général avec un substrat.

En variant le pH d'une solution cinétique, tout en gardant les autres facteurs constants (substrats), on peut observer des variations dans l'affinité de l'enzyme envers le substrat, dans la vitesse de la réaction, et conséquemment, dans l'efficacité de la réaction. En analysant ces résultats sur un graphique, on peut identifier certains pH où un changement a lieu: à un certain pH, on observera une augmentation de la vitesse de réaction, tandis qu'à un autre pH, on observera une baisse dans la vitesse de réaction. De ceci, on peut déduire qu'à chacun de ces pH, il doit se passer quelque chose au niveau de l'enzyme ou au niveau du substrat: au niveau de l'enzyme, certains acides aminés seront protonés ou déprotonés; au niveau du substrat, il se passera une ionisation (52).

Si on suppose que le changement observé se passe au niveau de l'enzyme, chaque changement correspondra à la protonation ou à la déprotonation d'un acide aminé impliqué. Comme on le sait, chaque chaîne latérale des acides aminés a un pK_a différent: il se fait protoner à un différent pH. À l'aide de ces pK_a , ainsi que ceux tirés des résultats du profil pH, on peut déterminer le nombre d'acides aminés impliqués, on peut suggérer l'identité de ces derniers et on peut même suggérer dans quel état de protonation ces résidus se retrouvent pour favoriser la réaction enzymatique. Il faut noter que des acides aminés présents dans des autres endroits de l'enzyme peuvent aussi subir des protonations/déprotonations, ce qui n'affecte pas généralement la réactivité, sauf dans le cas où la conformation de l'enzyme est affectée: Pour maintenir la structure secondaire de l'enzyme, la présence de ponts salins entre certains acides aminés est nécessaire. Si une protonation ou un déprotonation perturbe ces derniers, la conformation changera, ce qui en tour affectera la réactivité de l'enzyme. Enfin, les seules ionisations que l'on verra seront ceux des groupes qui sont directement impliqués dans la catalyse au centre actif ou bien de ceux qui sont responsables de maintenir la conformation active de l'enzyme (53).

Si on suppose que le changement observé se passe au niveau du substrat,

chaque changement correspondra à une ionisation de celui-ci. La réaction enzymatique avec le substrat sera favorisée lorsque le substrat est présent dans un certain état d'ionisation. Cette information est intéressante, mais n'est pas le but de l'expérience. Pour bien s'assurer que les résultats que nous obtenons (pK_a) sont bel et bien ceux de l'enzyme et non ceux des substrats utilisés, il est toujours mieux de faire le profil avec plusieurs substrats. Il ne faut pas oublier que le substrat pour l'enzyme est aussi susceptible à une variation de pH que les acides aminés au centre actif.

Dans notre cas, nous avons commencé en observant, à différents pH, la réaction d'acylation de la transglutaminase avec la Z-GlnGly comme donneur acyle en présence de trois différents accepteurs acyles (*N*-Ac-Lys-OMe, MeNH₂ et H₂O (hydrolyse)). Pour bien s'assurer que les résultats qu'on a obtenu sont ceux de la TGase uniquement et non ceux du substrat, un profil pH serait aussi fait avec un second donneur acyle, la *N,N*-diméthylcaséine. En comparant les différents profils pH obtenus, on a pu ainsi tirer des conclusions concernant seulement les acides aminés impliqués au centre actif de l'enzyme et non les substrats utilisés.

5-2 – Expériences contrôles

5-2-1 – Effet du pH sur la stabilité de la TGase

Il fallait s'assurer que la TGase était stable et pourrait être utilisée pour faire un profil pH. Pour vérifier ceci, nous avons mesuré l'activité de la TGase après l'avoir incubé à 37 °C, pendant une période de 30 minutes, dans les divers tampons (pH 5,45 à pH 8,5) utilisés. L'activité a été mesurée par le dosage colorimétrique de formation d'hydroxamate en présence de Z-GlnGly, EDTA, CaCl₂ et hydroxylamine dans du tampon Tris-acétate (pH 6,0), sur une période de 10 minutes (voir Chapitre 10) (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Effet du pH sur l'activité de la TGase après 30 minutes d'incubation à 37 °C dans un tampon donné (concentration de 200 mM). L'activité résiduelle est représentée en pourcentage (où 100% représente aucune perte d'activité et 0% représente une perte totale d'activité).

pH	% d'activité résiduelle
5,5	66
6,0	79
6,5	50
7,0	45
7,5	48
8,0	22
8,5	6

Étant donné que nos essais cinétiques ne durent qu'environ 30 minutes, nous avons utilisé les résultats de cette expérience pour déterminer à quels pH les résultats obtenus étaient acceptables pour contribuer au profil pH. On voit que pour les solutions cinétiques de pH 5,5 à 7,5, il y a une conservation d'activité acceptable (soit d'environ 50% ou plus). Nous disons que 50% est acceptable puisque lors du développement de la méthode (**Chapitre 4**), nous avons fait toutes nos cinétiques à pH 7,0. En comparant les résultats obtenus (K_M et V_{max}) avec les résultats trouvés dans la littérature (49), nous avons obtenu pratiquement les mêmes résultats. Nous pouvons donc supposer que les résultats obtenus, utilisant de l'enzyme ayant une activité résiduelle de 50% après 30 minutes d'incubation dans un tampon donné, sont valides et usables pour construire un profil pH.

Dans le cas des deux solutions les plus basiques, celles de pH 8,0 et 8,5, il y a cependant une perte considérable d'activité, soit de 78% et 94% respectivement (une conservation d'activité de 22% pour pH 8,0 et de 6% pour pH 8,5). Une augmentation de la concentration de TGase à ces deux pH basiques, dans le but d'essayer de conserver le même nombre d'unités actives d'enzyme qu'aux autres pH,

a mené à une précipitation de l'enzyme. Dûe à cette faible activité enzymatique à ces deux pH, nous avons décidé d'éliminer ces derniers de notre profil pH. Nous n'avons eu aucun choix puisque les résultats obtenus à ces deux pH auraient été un mélange de deux facteurs: la baisse en activité de l'enzyme à pH basiques et les effets sur l'efficacité de la réaction (affinité de l'enzyme envers le substrat et vitesse de la réaction) à ces mêmes pH. On s'attendait à cette perte d'activité à pH élevés puisque des recherches effectuées auparavant ont trouvé que la TGase subit une perte d'activité au delà de pH 7,8 (54).

Pour pouvoir rendre les données obtenues usables, il fallait corriger les valeurs de V_{\max} obtenues pour s'assurer de regarder uniquement les effets du pH sur la réaction enzymatique et non sur l'enzyme elle même. Pour s'assurer de bien pouvoir comparer toutes les valeurs obtenues de façon égale, nous avons introduit un facteur de correction pour corriger les vitesses obtenues (**Tableau 13**). En multipliant les vitesses obtenues à un pH donné par le facteur de correction, la vitesse est corrigée pour être comparable à celles obtenues aux autres pH. Le facteur de correction est simplement le facteur nécessaire pour rendre l'enzyme utilisée à chaque pH équivalente au niveau d'activité. Dans notre cas, nous avons corrigé toutes nos valeurs à l'activité résiduelle correspondant au pH 7,5 (point de référence).

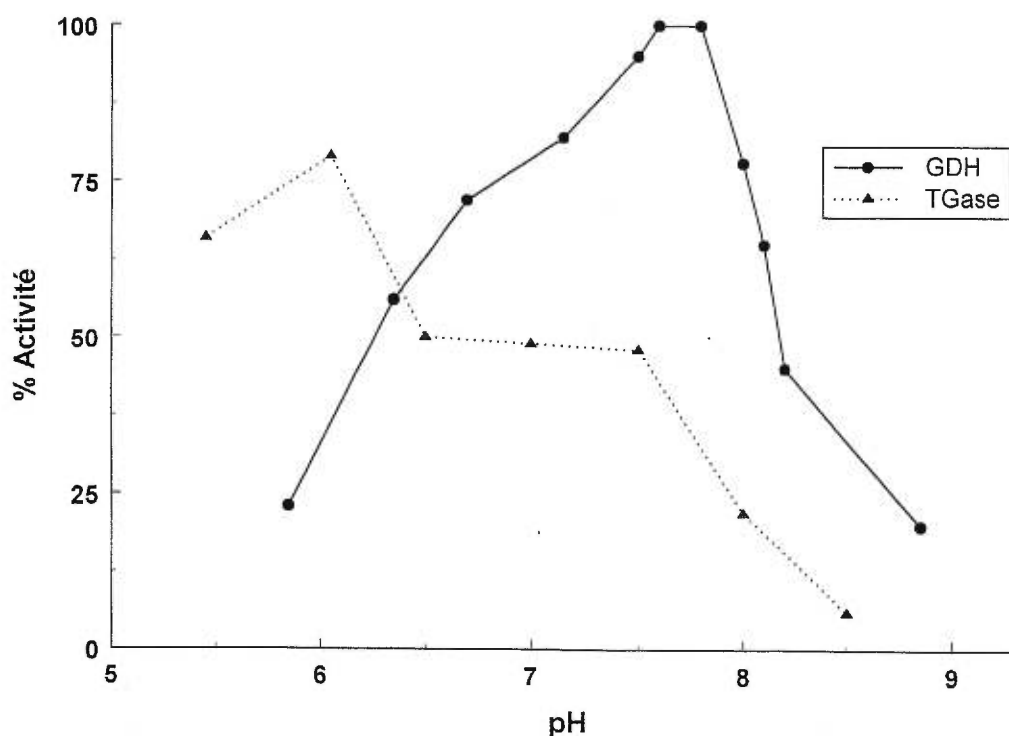
Tableau 13 : Facteur de correction pour études cinétiques à pH variés. Le facteur de correction est obtenu en divisant l'activité résiduelle correspondant au pH 7,5 par l'activité résiduelle à un pH donné.

pH	% d'activité résiduelle	Facteur de correction
5.5	66	0.682
6	79	0.570
6.5	50	0.900
7	45	1.000
7.5	48	0.938

5-2-2 – Effet du pH sur la stabilité de la GDH

En ce qui concerne la GDH, une expérience similaire avait déjà été faite et publiée (50). Dans ce cas-ci, l'enzyme semble être posséder un différent profil d'activité en fonction de pH que la TGase (**Figure 18**).

Figure 18: Effet du pH sur l'activité de la GDH et de la TGase. L'activité résiduelle de la GDH est mesurée en suivant l'oxydation de NADH en NAD^+ à de divers pH en présence de 0,011 M α -kétoglutarate, 0,1 M NH_4Cl , 210 μM NADH dans une solution tamponnée (50). L'activité résiduelle de la TGase est mesurée telle que décrite dans la section 5-2-1.



Tel qu'on peut voir dans la superposition de ces deux profils pH, la GDH semble être plus stable que la TGase pour toute solution cinétique possédant un pH supérieur à 6,3. Déjà, pour s'assurer qu'il y aurait toujours un excès de GDH par rapport à la TGase, un ratio d'environ 15:1 d'unités de GDH envers la TGase étaient utilisés (voir Chapitre 4). Mais, pour les études à pH 5,5 et 6,0, nous avons triplé la concentration de GDH pour qu'il y ait un ratio de 45:1. Ceci nous assurera que nous suivons bel et bien la réaction de la TGase et non celle de la GDH. Aucune précipitation de GDH n'a été observée dans ces conditions.

5-3 – Résultats et interprétation des profils pH

5-3-1 – Z-Gln-Gly

Pour débiter, nous avons fait le profil pH de la TGase avec de la Z-GlnGly comme substrat donneur acyle, et avec trois différents substrats accepteurs acyles: *N*-Ac-Lys-OMe, MeNH₂ et H₂O (hydrolyse). Les résultats cinétiques obtenus nous ont permis de construire trois profils: celui du K_M en fonction du pH (qui nous donnera une idée de l'affinité de l'enzyme pour la Z-Gln-Gly à chaque pH), celui du V_{max} en fonction du pH (qui nous donnera une idée de la vitesse de la réaction enzymatique pour la Z-Gln-Gly à chaque pH) et du rapport V_{max}/K_M en fonction du pH (qui nous donnera une idée de l'efficacité de la réaction à chaque pH) (**Figures 19-20-21**).

Figure 19: Effet du pH sur l'affinité de la TGase envers la Z-Gln-Gly. Les études sont faites dans un tampon MES (pH 5,5-6,0) ou MOPS (pH 6,5-7,5), en présence d'un accepteur acyle (méthylamine, *N*-acétyl-lysine méthyl ester ou de l'eau), à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les points sont reliés à l'aide de la fonction "spline" qui ne fait que de relier les points pour meilleure observation visuelle.

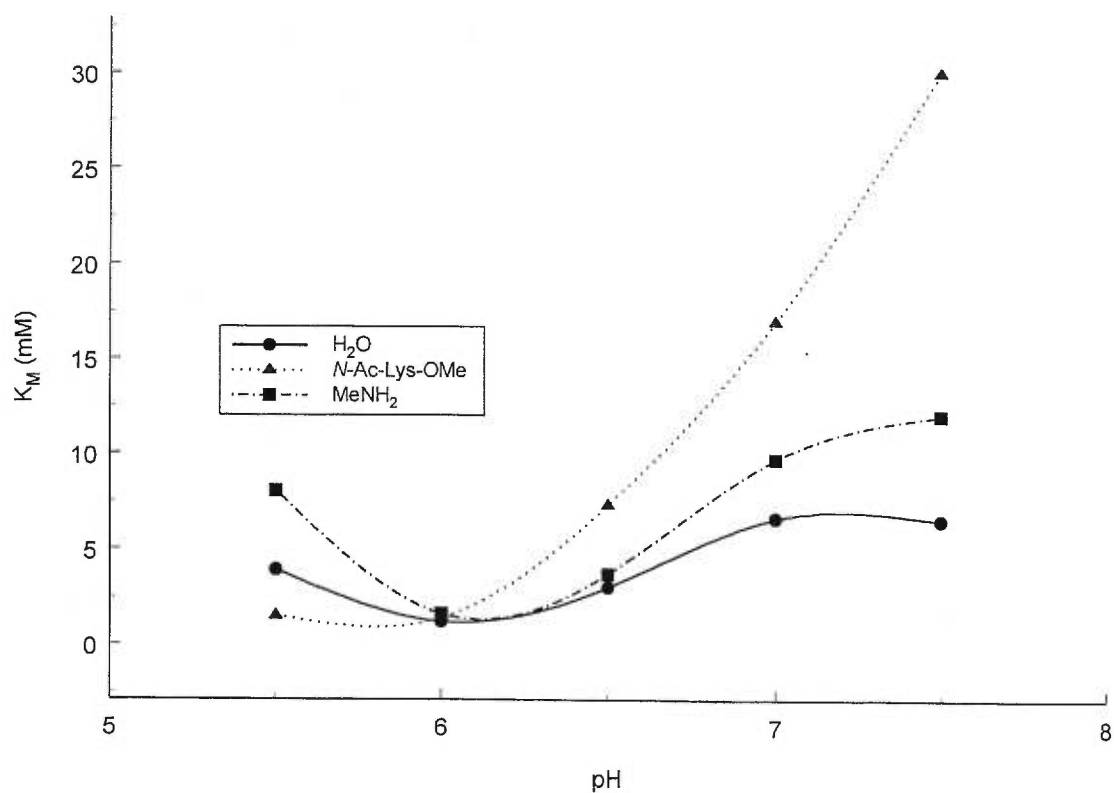


Figure 20: Effet du pH sur la vitesse de réaction de la TGase avec la Z-Gln-Gly. Les études sont faites dans un tampon MES (pH 5,5-6,0) ou MOPS (pH 6,5-7,5), en présence d'un accepteur acyle (méthylamine, *N*-acétyl-lysine méthyl ester ou de l'eau), à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les valeurs de vitesse obtenues sont corrigées par le facteur de correction trouvé dans le tableau 12. Les points sont reliés à l'aide de la fonction "spline" qui ne fait que de relier les points pour meilleure observation visuelle.

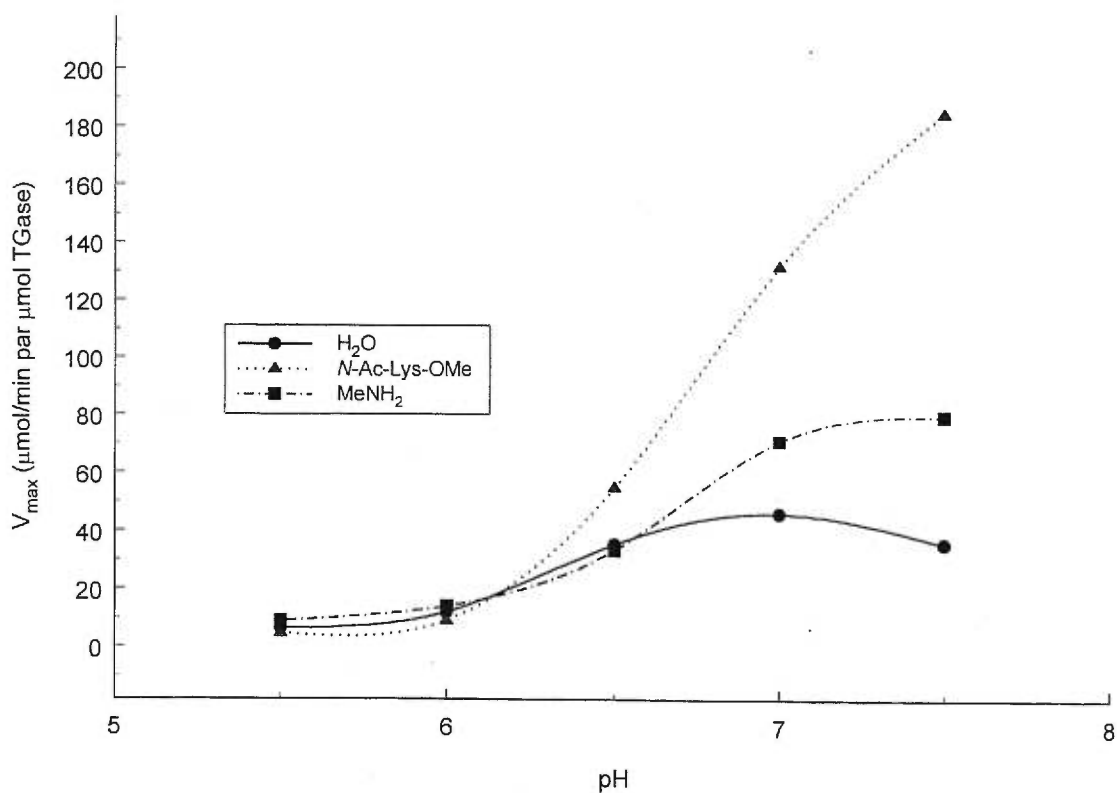
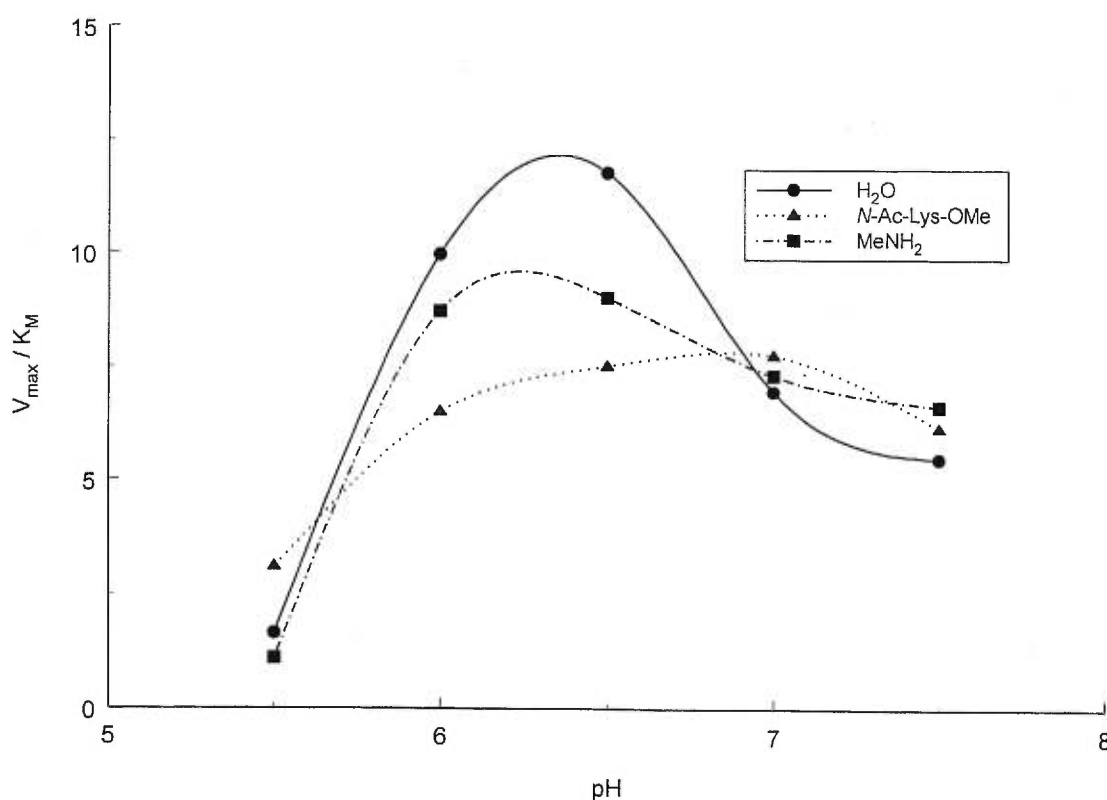


Figure 21: Effet du pH sur l'efficacité de la réaction entre la TGase et la Z-Gln-Gly. Les études sont faites dans un tampon MES (pH 5,5-6,0) ou MOPS (pH 6,5-7,5), en présence d'un accepteur acyle (méthylamine, *N*-acétyl-lysine méthyl ester ou de l'eau), à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les valeurs de vitesse obtenues sont corrigées par le facteur de correction trouvé dans le tableau 12. Les points sont reliés à l'aide de la fonction "spline" qui ne fait que de relier les points pour meilleure observation visuelle. Le ratio V_{\max}/K_M est représenté en μmol d'ammoniac produit/minute par μmol de TGase utilisée par mM de Z-Gln-Gly utilisée.



Ces graphiques nous donnent une idée de ce qui se passe au niveau de la réaction entre la TGase et la Z-Gln-Gly lors d'une variation de pH. En regardant la **Figure 19**, nous pouvons observer qu'un changement de substrat accepteur acyle semble causer un changement au niveau de l'affinité de l'enzyme, à des pH supérieurs à 6,5, envers la Z-Gln-Gly. Il semblerait qu'en utilisant de la *N*-acétyl-lysine méthyl ester comme substrat accepteur acyle, l'affinité de la TGase envers la

Z-Gln-Gly diminue. Le même scénario est observé dans la **Figure 20**, en observant le changement de la vitesse de réaction en fonction du pH. Au niveau de l'efficacité de la réaction (**Figure 21**), l'enzyme semble mieux fonctionner entre pH 6,0 et 6,5 dans le cas des trois différents accepteurs acyles.

Quelles informations pouvons-nous tirer de ces graphiques? Dans le cas où l'étape d'acylation serait l'étape limitante du cycle enzymatique, en changeant le substrat accepteur acyle, nous devrions observer le même profil pH. Dans le cas où l'étape de désacylation serait l'étape limitante du cycle enzymatique, en changeant le substrat accepteur acyle, les profils pH devraient être différents. D'après nos graphiques, au niveau de la vitesse de réaction et de l'affinité de l'enzyme envers la Z-Gln-Gly, il y a des changements. Par exemple, sur le graphique de vitesse de réaction en fonction de pH (**Figure 20**), à pH 7,5, nous observons trois vitesses très différentes. Ceci nous mènerait à suggérer que l'étape de désacylation pourrait être l'étape limitante du cycle catalytique de la TGase.

5-3-2 – *N,N*-Diméthylcaséine

Pour bien s'assurer que les résultats obtenus correspondaient à l'enzyme et non aux substrats utilisés, nous avons utilisé des différents substrats accepteurs acyles. Tel qu'observé dans les graphiques présentés dans la section 5-3-1, les profils se ressemblent toujours, ce qui suggère fortement que les résultats observés sont ceux de l'enzyme ou bien du substrat donneur acyle (Z-Gln-Gly). Pour s'assurer que nous suivons bel et bien ce qui se passe à l'enzyme, nous avons répété l'expérience en utilisant un différent donneur acyle, de la *N,N*-diméthylcaséine, le même substrat utilisé pour les expériences contrôles avec la TGase du Chapitre 4. Si nous obtenons des profils différents que ceux obtenus avec la Z-Gln-Gly, il se peut que ce soit les effets d'ionisation sur celui-ci que nous observons dans la section 5-3-1. Par contre, si nous obtenons un profil similaire, nous pouvons faire l'assomption que nous observons le profil pH de la transglutaminase.

Cette fois-ci, nous avons fait le profil pH de la TGase avec de la *N,N*-diméthylcaséine comme substrat donneur acyle, et avec deux différents substrats accepteurs acyles: MeNH₂ et H₂O (hydrolyse). Les résultats cinétiques obtenus nous ont permis de construire trois profils: celui du K_M en fonction du pH, celui du V_{max} en fonction du pH et du rapport V_{max}/K_M en fonction du pH (**Figures 22-23-24**).

Figure 22: Effet du pH sur l'affinité de la TGase envers la *N,N*-diméthylcaséine. Les études sont faites dans un tampon MES (pH 5,5-6,0) ou MOPS (pH 6,5-7,5), en présence d'un accepteur acyle (méthylamine ou de l'eau), à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les points sont reliés à l'aide de la fonction "spline" qui ne fait que de relier les points pour meilleure observation visuelle.

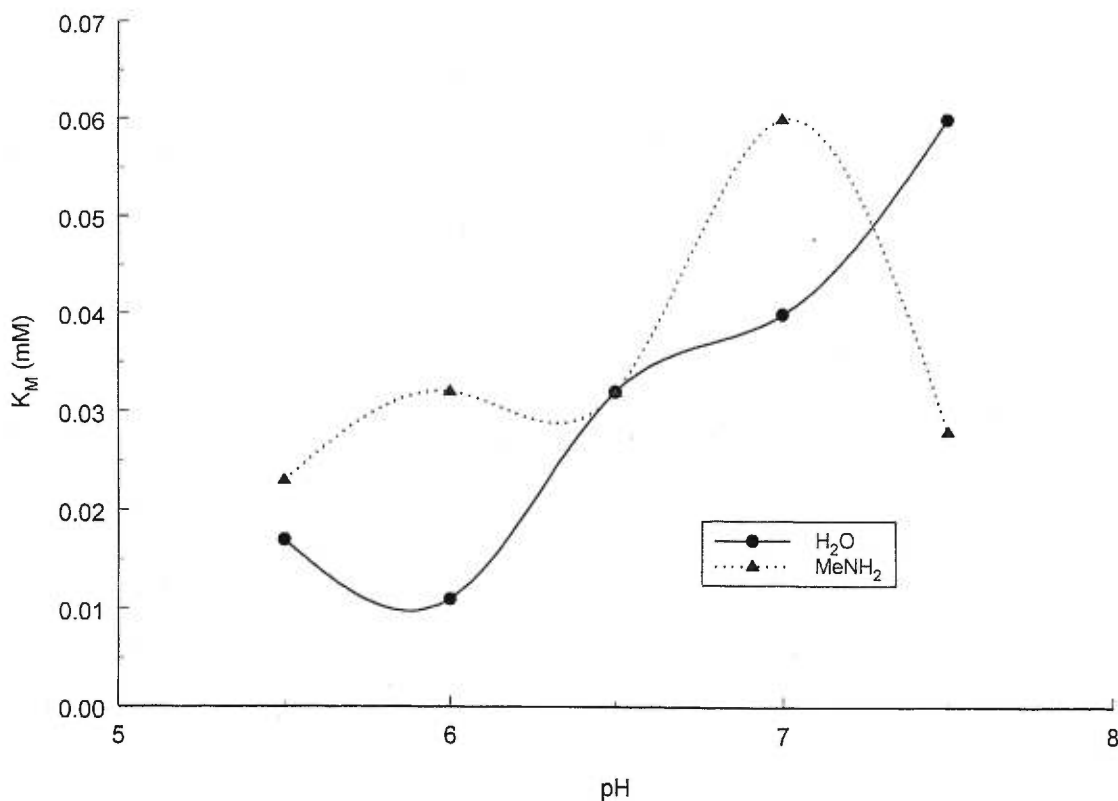


Figure 23: Effet du pH sur la vitesse de réaction de la TGase avec *N,N*-diméthylcaséine. Les études sont faites dans un tampon MES (pH 5,5-6,0) ou MOPS (pH 6,5-7,5), en présence d'un accepteur acyle (méthylamine ou de l'eau), à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les valeurs de vitesse obtenues sont corrigées par le facteur de correction trouvé dans le Tableau 13. Les points sont reliés à l'aide de la fonction "spline" qui ne fait que de relier les points pour meilleure observation visuelle.

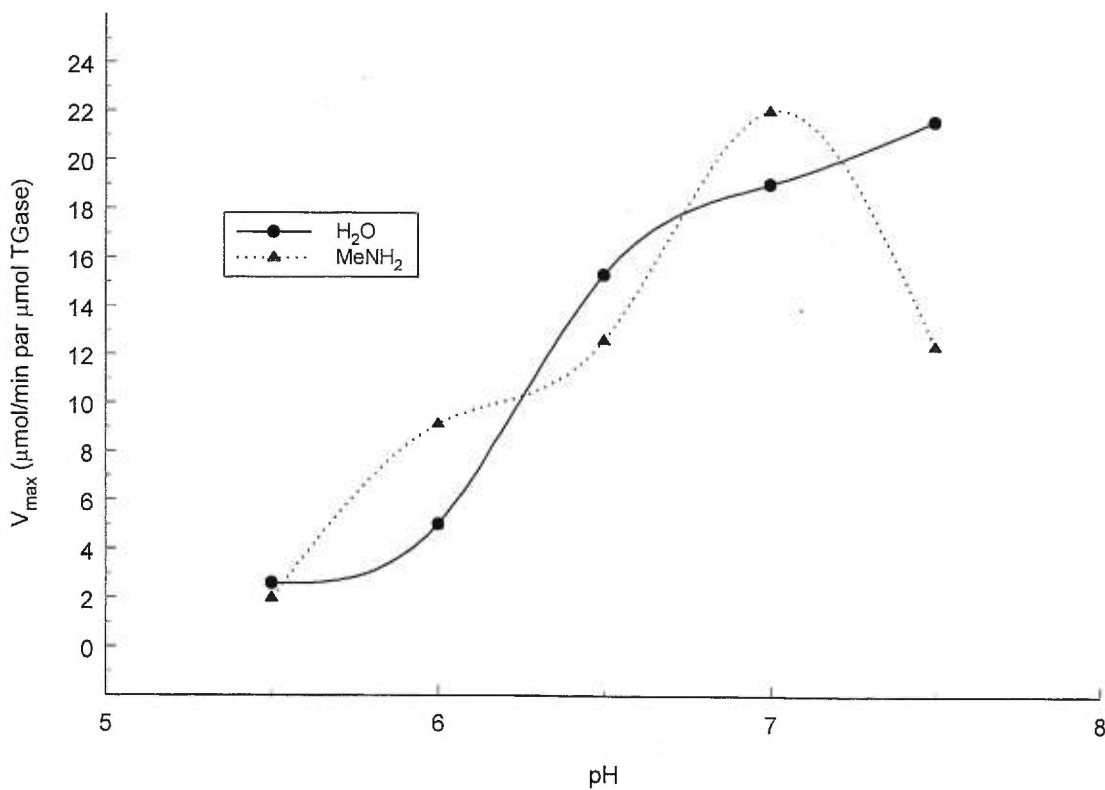
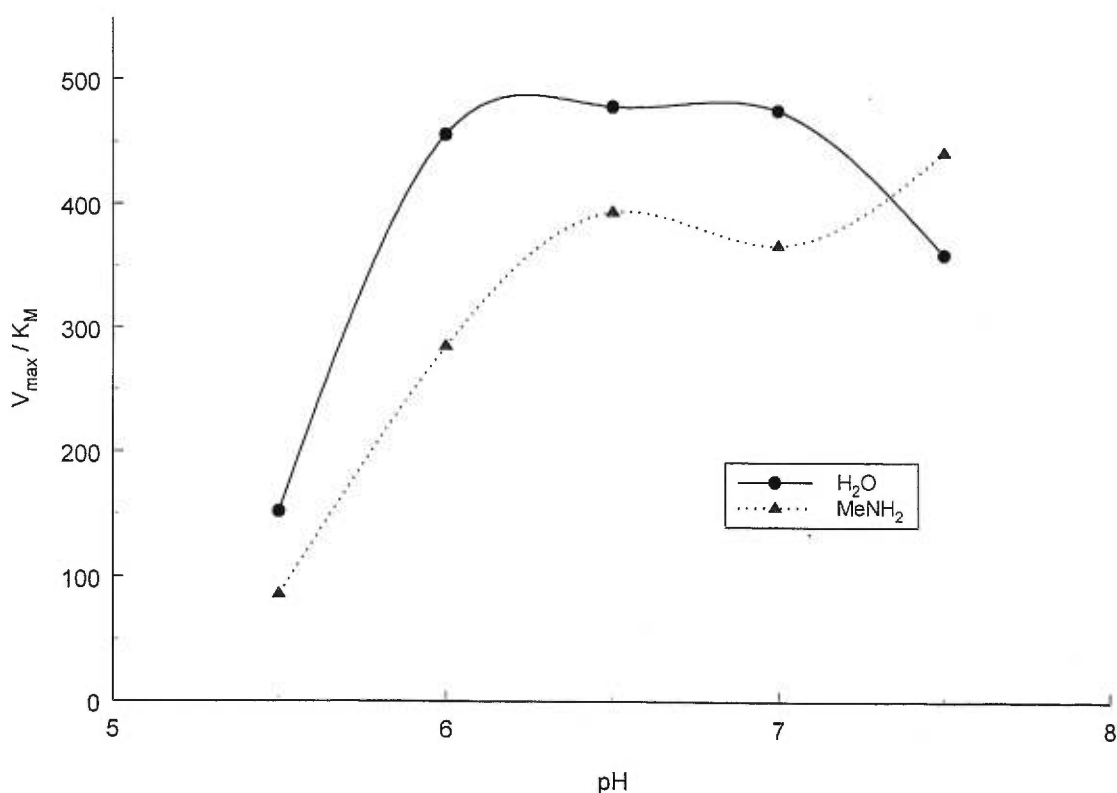


Figure 24: Effet du pH sur l'efficacité de la réaction entre la TGase et la *N,N*-diméthylcaséine. Les études sont faites dans un tampon MES (pH 5,5-6,0) ou MOPS (pH 6,5-7,5), en présence d'un accepteur acyle (méthylamine ou de l'eau), à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les valeurs de vitesse obtenues sont corrigées par le facteur de correction trouvé dans le Tableau 13. Les points sont reliés à l'aide de la fonction "spline" qui ne fait que de relier les points pour meilleure observation visuelle. Le ratio V_{\max}/K_M est représenté en μmol d'ammoniac produit/minute par μmol de TGase utilisée par mM de la *N,N*-diméthylcaséine utilisée.



Dans le premier graphique (**Figure 22**), soit celui du K_M en fonction du pH, nous voyons un profil qui porte des similarités aux tracés de la Z-Gln-Gly (**Figure 19**). Par contre, nous voyons un facteur d'environ 1000 entre les valeurs de K_M obtenues pour les deux substrats. Ceci est normal puisque nous regardons l'affinité de la TGase envers deux différents substrats. De même, dans le cas du profil pH de V_{\max} en fonction de pH (**Figure 23**), on observe encore des similarités. Une fois de

plus, on peut voir des différences entre les vitesses. Dans ce cas-ci, la similarité observée entre les profils obtenus pour chaque substrat nous suggère que nous observons les effets du pH sur l'enzyme et non sur les substrats (si les profils avaient été très différents, nous aurons pu suggérer que les effets de variation de pH observés étaient reliés à des ionisations des substrats). Cette similarité de profil se retrouve aussi au niveau du profil pH du $\log (V_{\max}/K_M)$ en fonction de pH (**Figure 24**). Par contre, dans le cas de la caséine, en variant le substrat accepteur acyle (méthylamine/eau) nous n'observons pas de différence entre les vitesses maximales obtenues (**Figure 23**) tel que nous avons observé dans le cas de la Z-Gln-Gly (**Figure 20**). Ceci nous mènerait donc à suggérer que l'étape d'acylation pourrait être l'étape limitante du cycle catalytique de la TGase, ce qui contredit ce que nous avons trouvé avec la Z-Gln-Gly. Il faudra donc raffiner notre analyse.

5-4 – Analyse et discussion des profils pH

Il est difficile de tirer des conclusions quantitatives des graphiques obtenus précédemment. De plus, il est plus facile de comparer des résultats lorsque nous regardons un graphique log-log (par exemple, $\log K_M$ en fonction de pH). De cette façon-ci, les résultats sont "compressés" et il est plus facile de pouvoir tirer des conclusions. À l'aide des formules cinétiques suivantes (voir Chapitre 10), nous avons pu tracer des courbes à travers les données obtenues pour déterminer les valeurs de pK_a des ionisations qui ont lieu:

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{ES}}}$$

et

$$K'_M = K_M \left[\frac{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_E} \right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ES}} \right)} \right]$$

où V'_{\max} et K'_M représentent les vitesses maximales et constantes d'affinité observées. En ce qui concerne le graphique $\log K_M$ en fonction de pH, nous n'avons pas pu déduire une courbe acceptable à partir des formules cinétiques. Nous avons donc essayé de déduire celles pour la vitesse de réaction (**Figure 25-26**).

Figure 25: Effet du pH sur le log de la vitesse de la réaction entre la TGase et la Z-Gln-Gly. Les études sont faites dans un tampon MES (pH 5,5-6,0) ou MOPS (pH 6,5-7,5), en présence d'un accepteur acyle (méthylamine, *N*-acétyl-lysine méthyl ester ou de l'eau), à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les valeurs de vitesse obtenues sont corrigées par le facteur de correction trouvé dans le Tableau 13. Les courbes sont tracées à partir des formules cinétiques trouvées dans le Chapitre 10. De plus, les valeurs de K_{ES} et de pK_a sont calculées à partir de cette même formule. Les points sont les valeurs observées tandis que les courbes sont les résultats calculés. (E-8 correspond à 10^{-8})

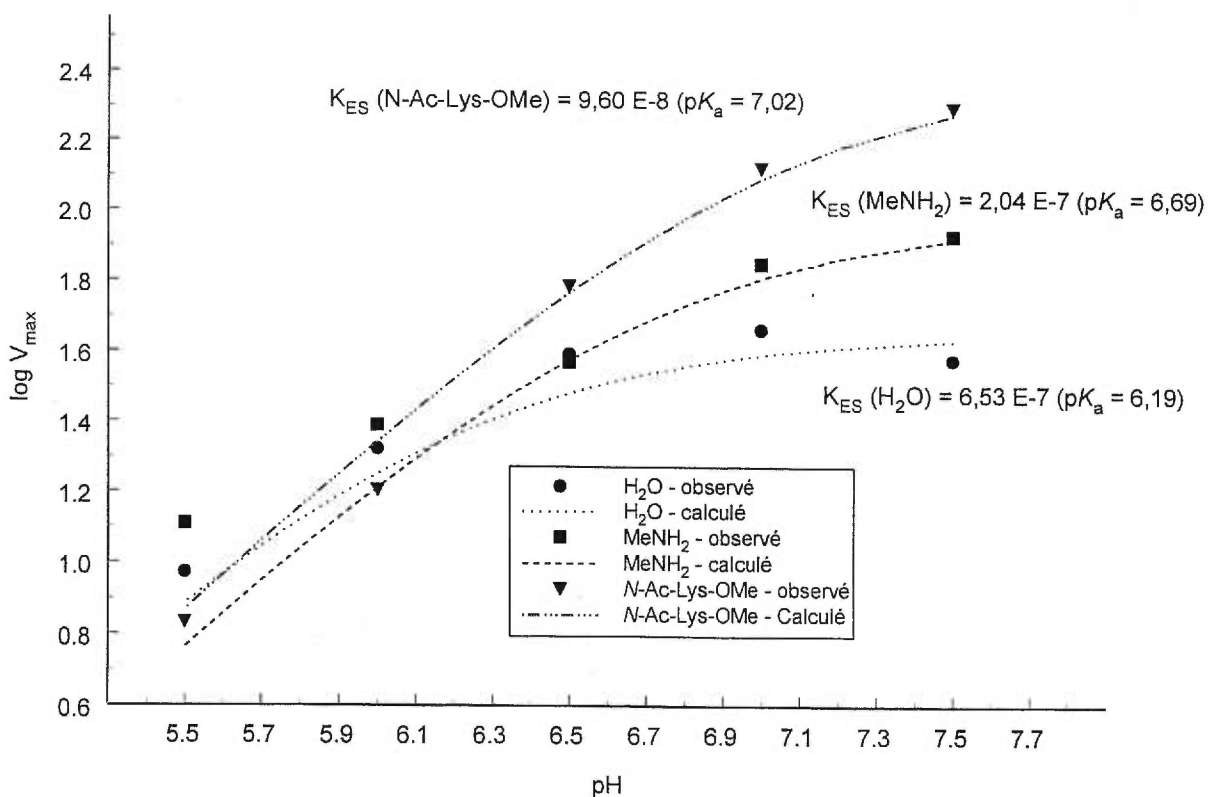
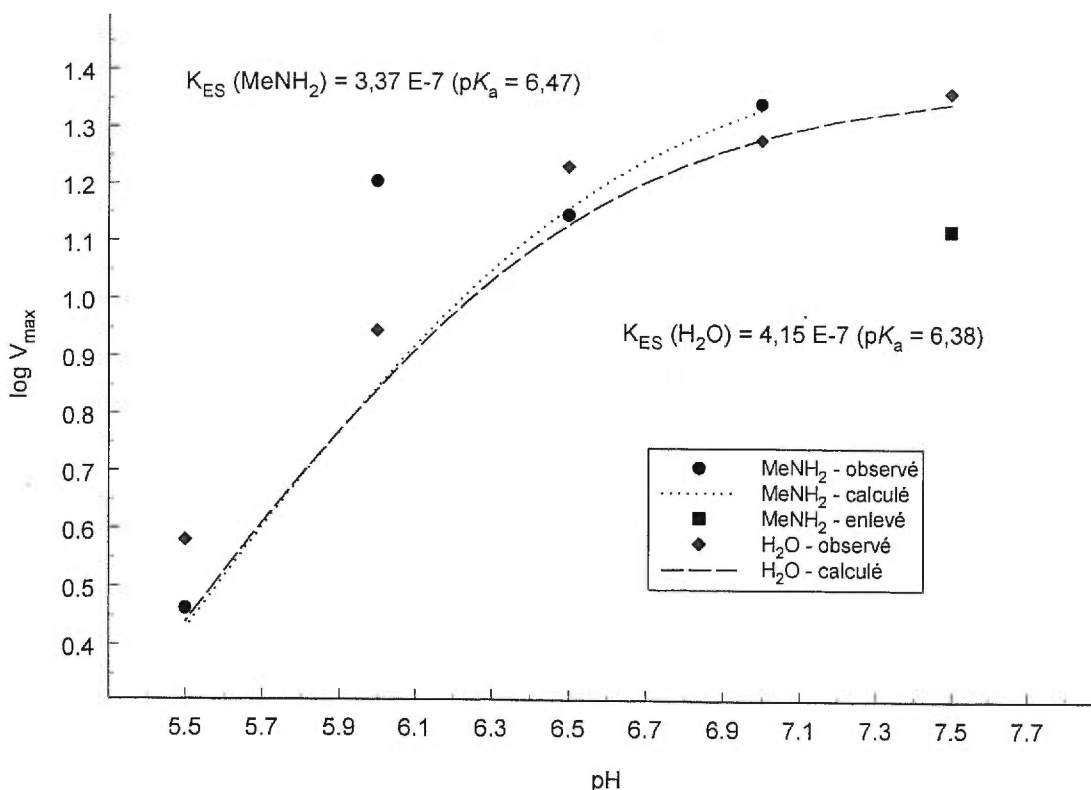


Figure 26: Effet du pH sur le log de la vitesse de la réaction entre la TGase et la *N,N*-diméthylcaséine. Les études sont faites dans un tampon MES (pH 5,5-6,0) ou MOPS (pH 6,5-7,5), en présence d'un accepteur acyle (méthylamine ou de l'eau), à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les valeurs de vitesse obtenues sont corrigées par le facteur de correction trouvé dans le Tableau 13. Les courbes sont tracées à partir des formules cinétiques trouvées dans le Chapitre 10. De plus, les valeurs de K_{ES} et de pK_a sont calculées à partir de cette même formule. Les points sont les valeurs observées tandis que les courbes sont les résultats calculés. Le point carré représente un point qui n'a pas été utilisé lors du calcul de la courbe. (E^{-7} correspond à 10^{-7})



Dans la section 5-3, nous avons trouvé deux possibilités en ce qui concerne le mécanisme enzymatique de la TGase. Une possibilité proposait que l'étape d'acylation était l'étape limitante du cycle catalytique, tandis que l'autre suggérait que l'étape de désacylation était l'étape limitante. Regardons ces deux possibilités

avec plus de détails.

Commençons en considérant que l'étape de désacylation est l'étape limitante du cycle catalytique, le cas des cinétiques avec la Z-Gln-Gly. Qu'est-ce que nous pouvons déduire? Premièrement, en variant les accepteurs acyles, on observe un changement dans la vitesse de la réaction. Par contre, la dépendance au niveau du pH semble demeurer la même (les profils se ressemblent). De plus, en regardant les données de vitesse provenant des cinétiques avec la Z-Gln-Gly (**Figure 25**), on peut observer qu'il y a un plateau qui semble commencer à se former. Puisque nous n'avons pas pu dépasser un pH de 7,5 durant nos études, nous ne pouvons pas confirmer ce plateau, ce qui nous préviendra de tirer une conclusion définitive au niveau des valeurs de pK_a obtenues (allant de 6,2 à 7,0). La moyenne des trois valeurs de pK_a observées nous donne $6,6 \pm 0,4$, ce qui suggèrerait que quelque chose se passe à ce pH pour influencer la vitesse de la réaction enzymatique. Est-ce que les valeurs de pK_a observées correspondraient aux pK_a des accepteurs acyles? Le pK_a de l'eau est de 15,7 (2), de la méthylamine 10,6 et de la *N*-acétyl-lysine méthyl ester, 10,5 (55,26). De plus, il est connu que l'environnement entourant une molécule peut affecter son pK_a (56,55). Par exemple, lorsqu'une molécule est liée au site actif d'une enzyme, la valeur de pK_a peut changer. Toutefois, les valeurs de pK_a observées se retrouvent dans le même écart, ce qui nous mènerait à croire que les valeurs observées ne sont pas celles des accepteurs puisqu'il serait fort improbable que trois différent pK_a diminuent d'un montant fixe pour se retrouver avec les mêmes pK_a que les autres.

Une explication plus probable pour cette valeur de pK_a observée est que c'est un pK_a d'un acide aminé présent dans le site actif de l'enzyme. Le pK_a d'une histidine est normalement de 6,5 (2), ce qui est exactement ce que nous avons trouvé. De plus, un spectre rayons-X du site actif de la TGase (Facteur XIIIa, le seul type de TGase qui a pu être cristallisé à date) a identifié trois histidines (54,7). D'après ce spectre, il y a un résidu de cystéine (Cys-312) et un résidu d'histidine (His-373) qui sont assez proches pour former le même ion thiolate-imidazolium qui est trouvé dans

les protéases à cystéine (57). Puisque celles-ci ressemblent énormément à la TGase (58), on peut suggérer que, dans le cas où l'étape limitante est la désacylation, le pK_a observé correspond à une histidine (His-373).

Considérons maintenant le cas où l'étape d'acylation est l'étape limitante du cycle catalytique, tout comme dans les études cinétiques de la *N,N*-diméthylcaséine. Qu'est-ce que nous pouvons déduire? Premièrement, en regardant les profils de la caséine (**Figure 26**), nous pouvons observer qu'en changeant le substrat accepteur acyle, il n'y a aucun changement au niveau de la vitesse observée et de l'allure du profil. Ceci est en accord avec un modèle où l'étape limitante est l'étape d'acylation. Dans ce cas, nous observons un pK_a moyen de $6,4 \pm 0,1$. Est-ce-que ce pK_a pourrait correspondre au pK_a de la caséine? Il est fort probable que non et que dans ce cas, tout comme dans le cas précédent, que le pK_a de $6,4 \pm 0,1$ correspond au pK_a d'un résidu d'histidine au site actif de l'enzyme. Par contre, en disant ceci, on suggère aussi qu'il y a une base générale impliquée dans le mécanisme de cette étape. Cependant, dans l'étape d'acylation, il se passe une attaque nucléophile par un thiolate (59). Ici, un acide général protone le NH_2 sur l'amide pour le rendre meilleur groupe partant (17). Un modèle impliquant une base générale ne se retrouverait donc pas dans cette étape. Par contre, il est possible que ce que nous observons dans la **Figure 26** n'est qu'une moitié d'un profil pH en forme de cloche et dans ce cas-ci, le pK_a de 6,4 correspondrait à une histidine (His-373). Cependant, il est impossible de confirmer ce fait puisque nous ne pouvons pas obtenir de données au delà de pH 7,5 avec la méthode que nous avons utilisée.

5-5 – Conclusions

La méthode développée au Chapitre 4 et utilisée pour faire les profils pH dans ce chapitre pose des limitations: elle ne peut fonctionner qu'entre un pH de 5,5 et un

pH de 7,5. Ceci a posé un problème lors de la construction de nos profils pH puisque nous aurions pu proposer des conclusions au lieu de suggestions en ayant accès aux données cinétiques allant de pH 7,6 à 9,0.

D'après les valeurs de pK_a obtenues ($6,6 \pm 0,4$ et $6,4 \pm 0,1$), nous pouvons suggérer qu'une histidine (His-373, pK_a de 6,5 (2)), trouvée dans le site actif de l'enzyme, est impliquée dans la réaction catalytique. Nous ne pouvons cependant pas conclure sur l'identité de l'étape limitante du cycle catalytique. Une théorie intéressante à ce regard serait que la réaction enzymatique fonctionne également bien pour les étapes d'acylation et de désacylation. En variant les substrats utilisés (donneur et/ou accepteur acyle), la balance entre la vitesse de l'étape d'acylation et de désacylation peut être affectée, ce qui en tout changera l'identité de celle qui est limitante.

Il aurait été intéressant de faire l'étude d'autres combinaisons de donneurs/accepteurs, mais cette fois-ci, en regardant les V_{max} et les K_M *des deux composés* au lieu de seulement ceux du donneur (comme nous avons fait). De plus, une étude cinétique d'effets isotopiques en substituant l'eau utilisée avec du D_2O aurait été utile pour confirmer la présence d'une base générale.

Chapitre 6 – Études cinétiques de divers amides avec la transglutaminase

6-1 - Introduction

6-1-1 – Mise en situation

À l'aide de la méthode développée au cours des travaux décrit au Chapitre 4, nous étions finalement prêt à amorcer les études cinétiques sur les composés synthétisés dans le Chapitre 3. Dans le cas des composés fluorés, des études ont été faites pour déterminer s'ils pouvaient servir de substrat pour la TGase. Ensuite, pour les anilides, des études cinétiques (Huang et Keillor, observations non-publiées) avaient déjà été faites pour déterminer si elles servaient de substrat pour la TGase. Les résultats obtenus ont suggéré que non, ce qui nous a mené à essayer de déterminer si elles pouvaient se lier à l'enzyme et même possiblement agir comme inhibiteurs. Finalement, dans le cas de la *N-Z-L-glutamyl(5-N-méthylamide)glycine*, on voulait vérifier si elle servait de substrat pour l'enzyme ou, le cas échéant, si elle agissait comme inhibiteur sur l'enzyme.

La méthode développée dans le Chapitre 4 ne fonctionne que pour des substrats qui possèdent un amide primaire. Ceci est parce que la GDH a besoin d'ammoniac pour catalyser l'oxydation du NADH (que l'on observe à l'aide d'un spectrophotomètre). L'ammoniac provient de la réaction enzymatique de la TGase avec un amide primaire. Dans le cas d'un amide secondaire, la TGase libérera plutôt une amine primaire, qui ne réagit pas avec la GDH (51). Lors de nos études d'inhibition, nous avons utilisé un amide primaire comme substrat (Z-GlnGly) avec

des amides secondaires comme inhibiteurs (anilides). Donc, lors des ces études d'inhibition, on est certain de suivre la bonne réaction, soit celle de la Z-GlnGly. S'il y a une interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur, on ne verra qu'une diminution de la vitesse de la réaction d'acylation pour la Z-GlnGly.

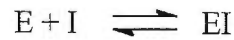
6-1-2 – Types d'inhibition

L'inhibition enzymatique peut se diviser en deux grosses catégories: l'inhibition réversible et l'inhibition irréversible. Dans le cas de l'inhibition réversible, l'inhibiteur réagit avec l'enzyme ou le complexe enzyme-substrat pour ralentir la réaction (où même l'arrêter entièrement). L'enzyme est toutefois encore fonctionnelle. Par contre, dans le cas de l'inhibition irréversible, l'enzyme est inactivée de façon permanente lorsqu'un groupe fonctionnel essentiel à la catalyse est modifié par l'inhibiteur (3).

Il existe trois types majeurs d'inhibition réversible: l'inhibition compétitive, l'inhibition non-compétitive et l'inhibition incompétitive. Ces trois types d'inhibition peuvent être distingués lors de l'analyse des données expérimentales d'une étude cinétique en présence de substrat et d'inhibiteur.

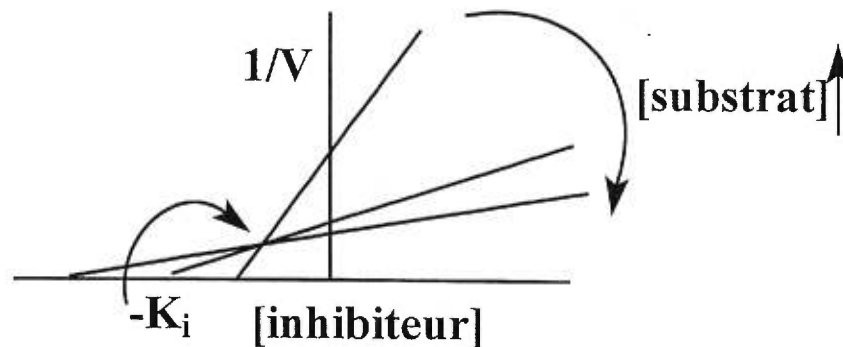
Lors de l'inhibition compétitive (**Figure 27**), l'inhibiteur réagit avec l'enzyme libre (au site actif) pour former un complexe enzyme-inhibiteur, analogue au complexe enzyme-substrat, qui est incapable de réagir avec le substrat. Expérimentalement, on observe une baisse en inhibition pour une concentration fixe de substrat lorsque l'on augmente la concentration de substrat (3). L'inhibiteur fait donc une compétition directe pour le site actif de l'enzyme libre avec le substrat ce qui résulte en l'augmentation du K_M de l'enzyme pour ce dernier tout en laissant le V_{max} intact. Sur un graphique de type Dixon (**Figure 27**), on observe des droites qui s'intersectent au $-K_i$ (constante d'inhibition) (**Équation 3**) (1).

Équation 3: Constante d'inhibition pour inhibition compétitive



$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Figure 27: Graphique de type Dixon d'un exemple théorique d'inhibition compétitive.



Lors de l'inhibition non-compétitive (**Figure 28**), l'inhibiteur réagit ou bien avec l'enzyme libre pour former un complexe enzyme-inhibiteur, ou bien avec le complexe enzyme-substrat. Il interfère donc avec les deux. La plupart du temps, un inhibiteur non-compétitif va se lier à un site autre que le site actif pour causer une déformation au niveau du site actif ce qui empêche au substrat de se lier avec l'enzyme. Cet effet ne peut pas être renversé en augmentant la concentration de substrat. Dans ce type d'inhibition, le V_{\max} observé pour le substrat diminue (3). Sur un graphique de type Dixon (**Figure 28**), on observe des droites qui s'intersectent au $-K_i$ (constante d'inhibition), soit sur l'axe des X (1) (**Équation 4**).

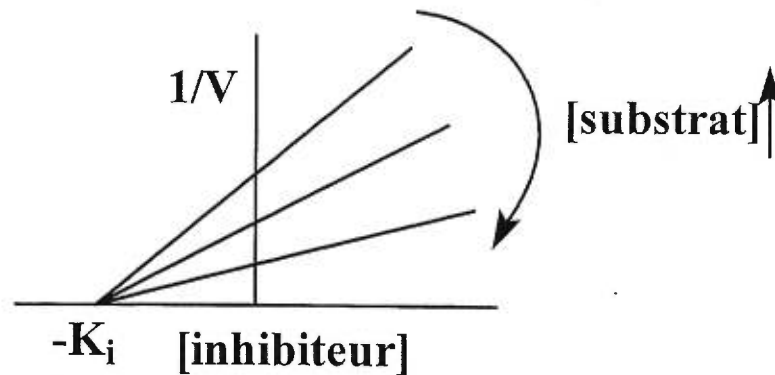
Équation 4: Constante d'inhibition pour inhibition non-compétitive. Il existe deux possibilités pour la constante.



$$K_i^{EI} = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$K_i^{ESI} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Figure 28: Graphique de type Dixon d'un exemple théorique d'inhibition non-compétitive.



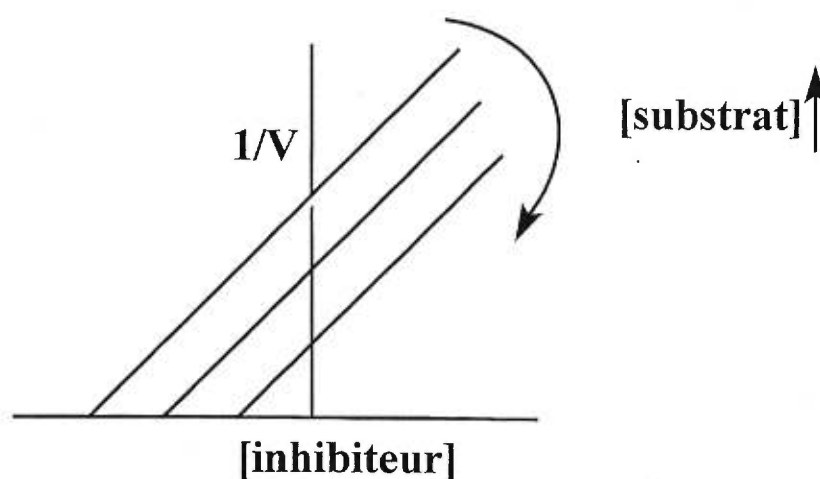
Finalement, il y a le cas de l'inhibition incompétitive. Lors de ce type d'inhibition (**Figure 29**), l'inhibiteur réagit seulement avec le complexe enzyme-substrat, prévenant la réaction. Dans ce type d'inhibition, le K_M observé et le V_{max} observé pour le substrat diminuent (3). Sur un graphique de type Dixon (**Figure 29**), on observe des droites parallèles qui ne s'intersectent pas. Il y a donc, pour ce type d'inhibition, une constante d'inhibition pour chaque concentration d'inhibiteur (l'intercepte des X correspond à $-K_i$) (1) (**Équation 5**).

Équation 5: Constante d'inhibition pour inhibition non-compétitive



$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Figure 29: Graphique de type Dixon d'un exemple théorique d'inhibition incompétitive.



6-2 – Composés fluorés

6-2-1 – Mise en situation

Les composés fluorés étudiés comprenaient du pentafluoropropionamide ($\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CONH}_2$), du 2,2-difluoropropionamide ($\text{CH}_3\text{CF}_2\text{CONH}_2$) et du 2-fluoropropionamide ($\text{CH}_3\text{CHFCONH}_2$). Du propionamide a été utilisé comme substrat de référence puisque des résultats cinétiques avaient déjà été publiés à son regard (35). Les composés ont été étudiés en suivant la relâche d'ammoniac lors de la réaction entre les propionamides et la TGase à l'aide de la méthode à enzyme

couplée TGase-GDH (détaillée dans le chapitre 10). Lors de cette étude, nous avons utilisé du MOPS (pH 7,0) comme tampon et de la méthylamine comme accepteur acyle. La Z-GlnGly a été substituée par les propionamides et les mêmes procédures ont été employées.

6-2-2 – Étude des propionamides

Pour déterminer la concentration de chaque composé à utiliser, on s'est basé sur les résultats cinétiques publiés pour la propionamide (35), soit un K_M de 900 mM et un V_{max} de 2,0 $\mu\text{mol}/\text{min}$ par μmol de TGase. À des concentrations aussi élevées que celles-ci, il fallait s'assurer qu'il n'y aurait aucune variation de pH lors de l'ajout du substrat à la solution tamponnée. Ceci a été vérifié en mesurant le pH de la solution cinétique avant et après l'ajout de chaque composé. Aucune variation significative de pH n'a été observée.

Des essais cinétiques ont ensuite été faits et les résultats obtenus ont démontrés que la réaction enzymatique était plus ou moins équivalente à la réaction de fond: la vitesse de la réaction de fond était tellement élevée qu'aucune réaction enzymatique n'était visible (**Tableaux 14 et 15, Figures 30 et 31**). En fait, si la réactivité de ces substrats avec l'enzyme avait été plus élevée, la réaction de fond élevée n'aurait pas causée trop de problèmes. De ces observations, on peut donc conclure qu'aucun de ces composés ne fonctionne comme substrat pour l'enzyme.

Tableau 14: Études cinétiques du propionamide avec la TGase. Les cinétiques sont faites à 37 °C dans un tampon MOPS (pH 7,0) à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. La colonne nommée "Réaction enzymatique" représente les vitesses observées pour le mélange cinétique *incluant* la TGase, et la colonne nommée "Hydrolyse" représente les vitesses observées pour la réaction de fond (mélange cinétique *sans* TGase). L'erreur expérimentale dans ces valeurs tirées des résultats de trois expériences identiques est estimée à $\leq 10\%$.

Concentration de substrat (mM)	Vitesse observée ($\mu\text{mol}/\text{minute}$ par μmol de TGase)		
	Réaction enzymatique	Hydrolyse	Différence
1500	27.99	26.99	1.00
1000	20.35	18.19	2.16
750	14.95	14.87	0.08
450	9.14	8.80	0.33
375	7.39	6.64	0.75
187.5	2.91	2.66	0.25

Tableau 15: Études cinétiques du pentafluoropropionamide avec la TGase. Les cinétiques sont faites à 37 °C dans un tampon MOPS (pH 7,0) à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. La colonne nommée "Réaction enzymatique" représente les vitesses observées pour le mélange cinétique *incluant* la TGase, et la colonne nommée "Hydrolyse" représente les vitesses observées pour la réaction de fond (mélange cinétique *sans* TGase). L'erreur expérimentale dans ces valeurs tirées des résultats de trois expériences identiques est estimée à $\leq 10\%$.

Concentration (mM)	Vitesse observée ($\mu\text{mol}/\text{minute}$ par μmol de TGase)		
	Réaction enzymatique	Hydrolyse	Différence
300	26.83	25.58	1.25
225	19.35	18.27	1.08
150	15.37	14.70	0.66
75	8.39	8.14	0.25
37.5	7.48	6.48	1.00

Figure 30: Études cinétiques du propionamide avec la TGase. Les cinétiques sont faites à 37 °C dans un tampon MOPS (pH 7,0) à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les valeurs utilisées sont la différence entre la réaction enzymatique et la réaction de fond.

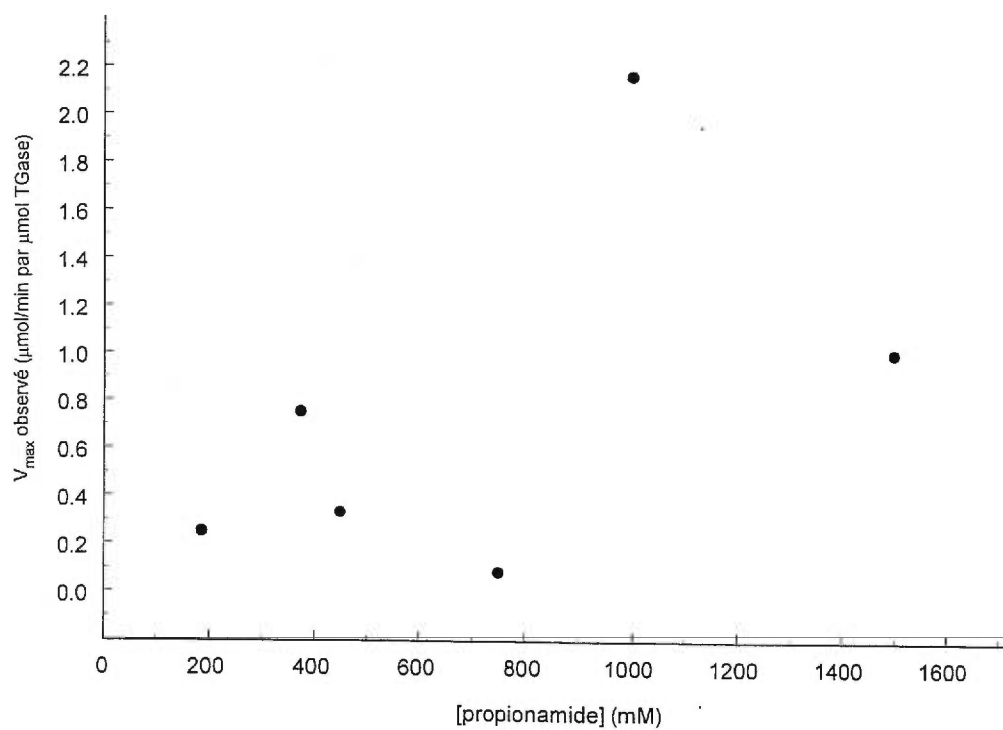
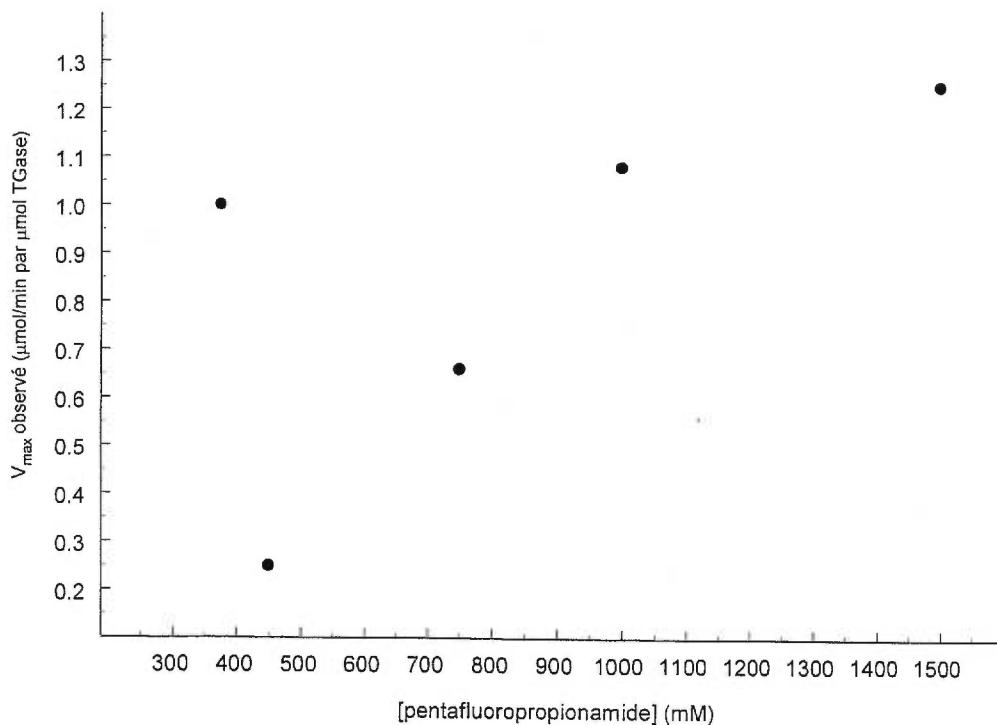


Figure 31: Études cinétiques du pentafluoropropionamide avec la TGase. Les cinétiques sont faites à 37 °C dans un tampon MOPS (pH 7,0) à l'aide de la méthode à enzyme couplée TGase-GDH. Les valeurs utilisées sont la différence entre la réaction enzymatique et la réaction de fond.



Lors de la construction d'un graphique Michaelis-Menten pour déterminer les constantes cinétiques d'un substrat avec une enzyme, on prépare un graphique de vitesse observée corrigée en fonction de la concentration de substrat. La vitesse observée corrigée est en fait la différence entre la réaction enzymatique observée et la réaction de fond. En fait, c'est la vitesse que l'on observe qui est due uniquement à l'enzyme et non à l'hydrolyse. En regardant les graphiques des valeurs obtenues pour les deux substrats (**Figures 30 et 31**), il est clair qu'on ne peut pas tirer de résultats cinétiques au niveau de la réaction de catalyse enzymatique puisque les graphiques ne sont pas du tout de type Michaelis-Menten. En fait, les graphiques ne semblent

pas suivre aucun modèle cinétique de base. Il y a tellement de fluctuation entre les valeurs de vitesse de réaction allant d'une concentration à l'autre qu'il faut conclure que les résultats obtenus ne signifient rien au niveau cinétique avec la TGase. Les résultats présentés sont deux cas extrêmes, soit le propionamide (contenant aucun atome de fluor) et le pentafluoropropionamide (contenant cinq atomes de fluor), et sont typiques des résultats obtenus pour les autres composés.

6-2-3 – Conclusions

La série de propionamides n'est donc pas une bonne série de substrats pour la TGase. Il est possible que dû au fait que le carbonyle est devenu plus électrophile à cause des groupes fluorés qui l'entourent, il soit subséquemment plus susceptible à une attaque nucléophile. Les études cinétiques se sont passées dans un milieu aqueux, ce qui voudrait dire que le carbonyle aurait pu subir une attaque nucléophile par les molécules d'eau du milieu. Le K_M publié (35) était très élevé (900 mM) pour le propionamide ce qui pourrait suggérer que l'enzyme a simplement une faible affinité envers le composé. Aucun détail sur l'élucidation de cette valeur n'a été donnée dans l'article. Nous n'avons pas trouvé de réactivité pour ce composé. Il est cependant intéressant de mentionner que la limite de solubilité du propionamide est d'environ 1,5 M, ce qui met en doute la valeur obtenue par Folk (35) puisqu'il est certain qu'ils n'auraient pas pu achever des concentrations assez élevées pour bien déterminer le K_M . Ceci suggère que le propionamide n'était probablement pas un substrat pour la TGase.

6-3 – Anilides

6-3-1 – Mise en situation

Pour le cas des anilides, on savait que ces composés fonctionnaient pauvrement comme substrats pour la TGase (Huang et Keillor, observations non-

publiées), un fait que l'on avait de la difficulté à croire étant donné que le squelette de ces composés était le même que la Z-Gln-Gly. De plus, la présence d'un phényl ester (un bon groupe partant), aurait dû, d'après nous, augmenter la réactivité de la molécule. Donc, serait-il possible qu'ils se lient quand même à l'enzyme sans réagir? Se pourrait-il qu'ils agissent comme inhibiteurs? Pour répondre à ces questions, nous avons fixé une concentration de substrat pour l'enzyme, la Z-GlnGly (5 mM, 10 mM ou 15 mM), tout en variant la concentration d'anilide pour voir s'il y avait un effet d'inhibition. Le tampon utilisé pour ces études d'inhibition était le MOPS (pH 7,0) et l'accepteur acyle utilisé était la méthylamine. Dans une cuvette spectrophotométrique, nous avons rajouté du tampon MOPS (pH 7,0), du CaCl_2 , du EDTA, du β -NADH, du α -kétooglutarate, de la Z-Gln-Gly, de la GDH (2,4 unités), de l'anilide (en concentration variée, dans la même région de concentration que le K_M de la Z-Gln-Gly, soit de 5 mM) et de la méthylamine (comme accepteur acyle). La réaction est initiée en ajoutant de la TGase (0,14 unités) et le tout est suivi sur le spectrophotomètre à 340 nm.

Nous avons choisi les concentrations d'anilides à utiliser en se basant sur les études faites sur la Z-Gln-Gly dans le Chapitre 4. Puisqu'on faisait une étude d'inhibition, une bonne place à commencer serait d'utiliser des quantités équivalentes d'inhibiteur et de substrat. Ensuite, une variation de diverses concentrations autour de cette valeur pourrait nous donner les résultats cinétiques nécessaires (vitesses à différentes concentrations d'inhibiteur et de substrat, où l'inhibiteur est l'anilide et le substrat est la Z-Gln-Gly) pour construire un graphique de Dixon. À partir de ce graphique, nous pourrions obtenir de l'information sur le type d'inhibition qui se produit.

Nous avons mesuré la vitesse (V) de la réaction entre la TGase et la Z-Gln-Gly en présence de diverses concentrations d'anilide. S'il y a un effet d'inhibition, nous observerons une diminution dans la vitesse de la réaction lors d'une augmentation de la concentration d'anilide. Les valeurs de ces vitesses sont ensuite utilisées pour construire un graphique de l'inverse de la vitesse en fonction de la

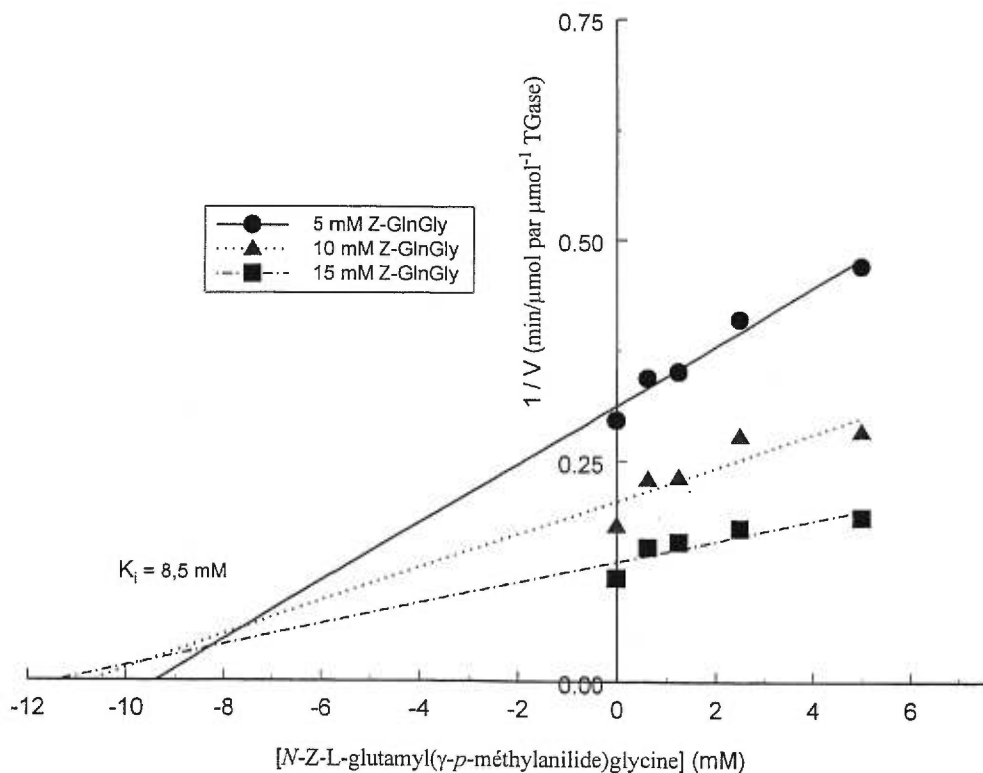
concentration d'inhibiteur (anilide) que l'on nomme un graphique de Dixon (*I*). À partir de ce graphique, nous pouvons déterminer le type d'inhibition ainsi que la constante d'inhibition, K_i , pour le composé.

6-3-2 – Étude de la *N-Z-L-glutamyl(γ-p-méthylanilide)glycine*

Pour débiter, nous avons utilisé de la *N-Z-L-glutamyl(γ-p-méthylanilide)glycine* comme inhibiteur envers la TGase en présence de Z-Gln-Gly (**Figure 32**). Nous avons varié la concentration d'anilide tout en gardant la concentration de Z-Gln-Gly fixe. Comme on peut voir, les pentes intersectent, mais pas sur l'axe des X, ce qui signifie que c'est une inhibition de type compétitive. Il fait donc une compétition directe pour le site actif de l'enzyme libre avec le substrat (Z-Gln-Gly) ce qui résulte en l'augmentation du K_M de l'enzyme pour ce dernier tout en laissant le V_{max} intact. On dit que c'est une inhibition réversible puisque l'addition d'une grande quantité de substrat pourrait conquérir l'effet de l'inhibiteur. Du graphique, on peut tirer le K_i de cet anilide, soit de 8,5 mM.

Dans ce cas-ci, il est fort possible que l'anilide se lie en entier ou bien à une partie du centre actif de l'enzyme, mais n'est pas orientée de façon à réagir. Elle possède un squelette qui ressemble fortement à celui de la Z-Gln-Gly, qui fonctionne très bien comme substrat, mais diffère au niveau de l'amide de la glutamine. Ceci est possiblement dû à la présence du gros groupe phényle qui pourrait prévenir la molécule à rentrer complètement dans la cavité enzymatique. Elle bloque ainsi l'accès à la Z-Gln-Gly de venir réagir avec l'enzyme.

Figure 32: Graphique de type Dixon pour l'inhibition de la TGase par de la *N-Z-L*-glutamyl(γ -*p*-méthylanilide)glycine. Dans ce cas-ci, la réaction enzymatique entre la TGase et la *Z*-Gln-Gly est inhibée par l'anilide. La valeur de K_i de 8,5 mM est prise de la moyenne des valeurs obtenues aux intersection des pentes (soit à -7,6, -8,2 et -9,6 mM).

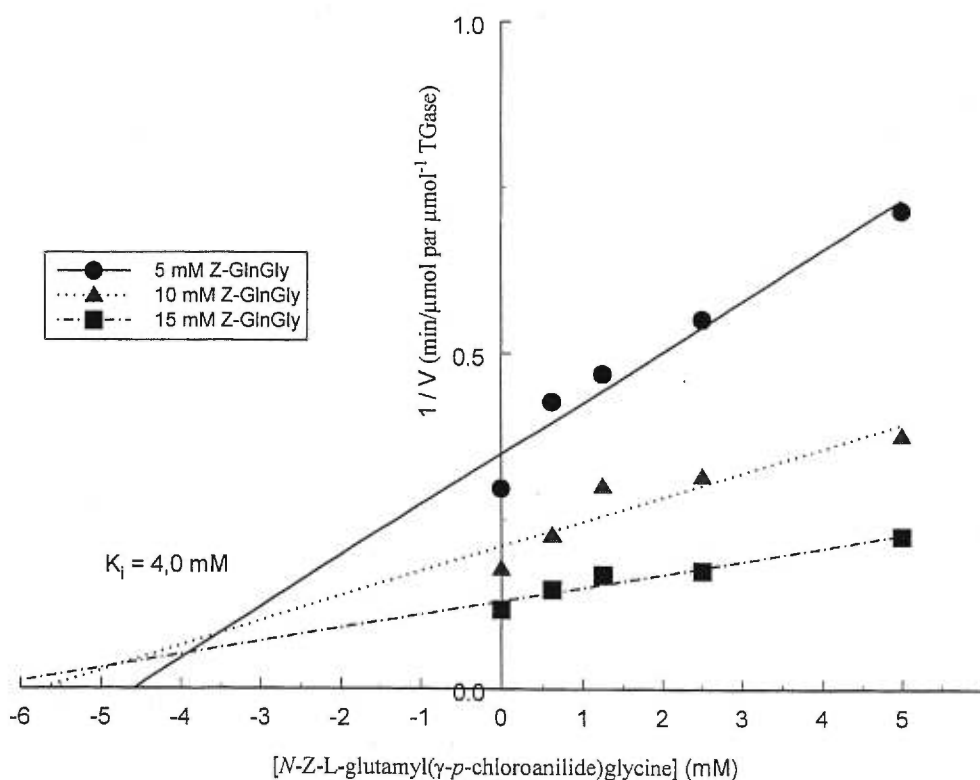


6-3-3 – Étude de la *N-Z-L*-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine

Ensuite, nous avons fait l'étude de *N-Z-L*-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine (**Figure 33**). Tout comme la *N-Z-L*-glutamyl(γ -*p*-méthylanilide)glycine, les pentes intersectent, mais pas sur l'axe des X, ce qui signifie que c'est encore une inhibition de type compétitive. Une fois de plus, nous pouvons dire que, tout comme son analogue, l'anilide interagit avec l'enzyme libre pour causer l'inhibition en faisant

une compétition directe pour le site actif de l'enzyme libre avec le substrat (Z-Gln-Gly) ce qui résulte en l'augmentation du K_M de l'enzyme pour ce dernier tout en laissant le V_{max} intact. Encore une fois, la raison pourquoi l'anilide ne fonctionne pas comme substrat est possiblement dû à la présence du gros groupe phényle qui pourrait prévenir la molécule à rentrer complètement dans la cavité enzymatique.

Figure 33: Graphique de type Dixon pour l'inhibition de la TGase par de la *N*-Z-L-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine. Dans ce cas-ci, la réaction enzymatique entre la TGase et la Z-Gln-Gly est inhibée par l'anilide. La valeur de K_i de 4,0 mM est prise de la moyenne des valeurs obtenues aux intersection des pentes (soit à -3,9, -3,4 et -4,7 mM).



Du graphique, nous pouvons aussi extraire le K_i de cet anilide de $-4,0$ mM en prenant la moyenne de l'intersection des trois lignes. Ce dernier semble donc être un meilleur inhibiteur que son analogue puisqu'il possède un plus petit K_i . Mais pourquoi est-ce que cet anilide serait meilleur que l'autre? Les deux ont pourtant une forme plus ou moins identique. Il se pourrait que ce soit à cause des groupes substituants sur le phényl. Dans le cas du substituant Cl, ce dernier est un groupe polaire, tandis que dans le cas du substituant CH_3 , le groupe substituant est un groupe non-polaire. Il semblerait donc, d'après les résultats obtenus, que le groupe polaire aurait une meilleure chance d'interagir avec un groupe au site actif de l'enzyme, introduisant une interaction favorable (par exemple, une interaction dipole-dipole) ce qui en tour abaissera son K_i .

6-3-4 – Conclusions

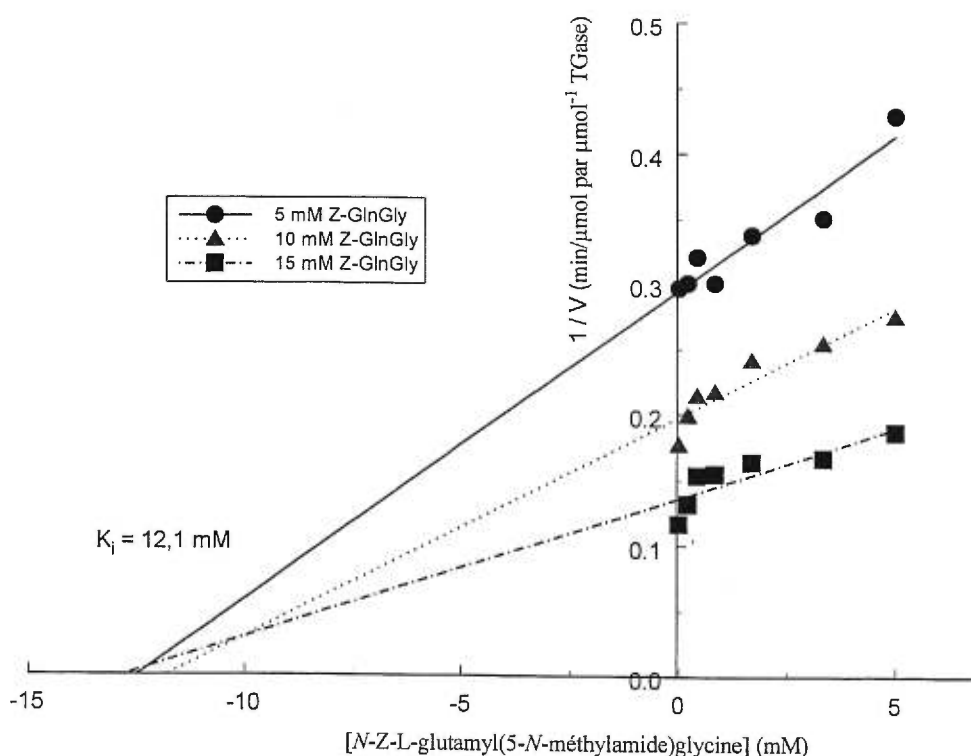
Les deux anilides fonctionnent pauvrement comme substrats. Ceci est possiblement dû à la présence d'un groupe phényle qui pourrait prévenir la molécule à rentrer complètement dans la cavité enzymatique. En fait, ce qui est important est le fait qu'ils semblent être reconnus par le site actif de l'enzyme. En fait, les deux semblent fonctionner comme inhibiteurs compétitifs. Il semblerait que la *N-Z-L-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine* fonctionnerait comme meilleur inhibiteur que la *N-Z-L-glutamyl(γ -*p*-méthylanilide)glycine* en se basant sur les constantes d'inhibition obtenues. Ceci pourrait être dû au fait que la *N-Z-L-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine* possède un groupe substituant polaire capable de former une interaction favorable dans le site actif de l'enzyme. De plus, leurs K_i de $4,0$ mM et de $8,5$ mM (*N-Z-L-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine* et *N-Z-L-glutamyl(γ -*p*-méthylanilide)glycine*, respectivement) sont comparables à la valeur de K_M de la *Z-Gln-Gly* qui est de $8,3 \pm 2,0$ mM (49). Ceci est intéressant puisque nous parlons de molécules qui possèdent le même squelette, mais qui diffèrent au niveau que deux

des molécules possèdent un groupe phényle de plus. Nous pourrions donc suggérer qu'il se passe de l'inhibition stérique, causée par le groupe phényle, au niveau du site actif de l'enzyme.

6-4 – *N-Z-L-glutamyl(5-N-méthylamide)glycine*

Les anilides n'ayant pas fonctionné comme substrat mais plutôt comme inhibiteurs, nous voulions déterminer s'il se pouvait que ceci soit dû à la présence du groupe phényle. Les anilides étaient reconnus, liés mais ne semblaient pas réagir. Nous avons donc synthétisé une nouvelle molécule, similaire aux anilides mais en substituant la partie aniline de la molécule pour un méthylamine. Pour faire ceci, les mêmes procédures qui ont été employées pour les anilides ont été utilisées et les données ont été interprétées de la même façon à l'aide d'une courbe de Dixon (**Figure 34**). Dans ce cas-ci, les pentes intersectent plutôt avec l'axe des X, environ au même endroit. Ceci signifie que c'est une inhibition de type non-compétitive, un type d'inhibition trouvé fréquemment dans les systèmes enzymatiques impliquant deux substrats comme celle de la TGase. Ceci veut dire que la *N-Z-L-glutamyl(5-N-méthylamide)glycine* interagit avec l'enzyme libre pour causer l'inhibition en formant un complexe enzyme-inhibiteur qui est analogue au complexe enzyme-substrat et en se liant autrepart sur l'enzyme de manière à bloquer l'accès du substrat au site actif (3). Ceci résulte normalement en une baisse du V_{\max} de la réaction entre l'enzyme et le substrat tout en laissant le K_M intact.

Figure 34: Graphique de type Dixon pour l'inhibition de la TGase par de la *N-Z-L*-glutamyl(5-*N*-méthylamide)glycine. Dans ce cas-ci, la réaction enzymatique entre la TGase et la *Z*-Gln-Gly est inhibée par la *N-Z-γ*-(*N*-méthyle) glutamyle glycine. La valeur de K_i de 12,1 mM est prise de la moyenne des valeurs obtenues aux intersection des pentes avec l'axe des X (soit à -11,7 et -12,5 mM).



En substituant un groupement phényle par un petit groupe alkyle sur cette molécule, on passe d'une inhibition de type compétitive à une inhibition de type non-compétitive. Ceci pourrait suggérer que la présence du groupe phényle contribue au placement de la molécule pour bloquer le site actif de l'enzyme (qui est très encombré) (Figures 35 et 36). De plus, nous avons suggéré précédemment (Chapitre 5) que le site actif comprenait un complexe His-imidazole (présent sous forme

d'imidazolium) dans le site actif qui sert à protoner le groupe γ -carboxamide de la glutamine lors de la réaction enzymatique. Il serait donc possible que la présence du groupe phényle affecte la conformation de la molécule, prévenant ainsi cette protonation.

Figure 35: Modèle de type ruban du site actif de la TGase (type Facteur XIIIa) basé sur les résultats d'une étude cristallographique (57). On voit un résidu His-373 à 3,7 Å du thiol du résidu Cys-314 du site actif.

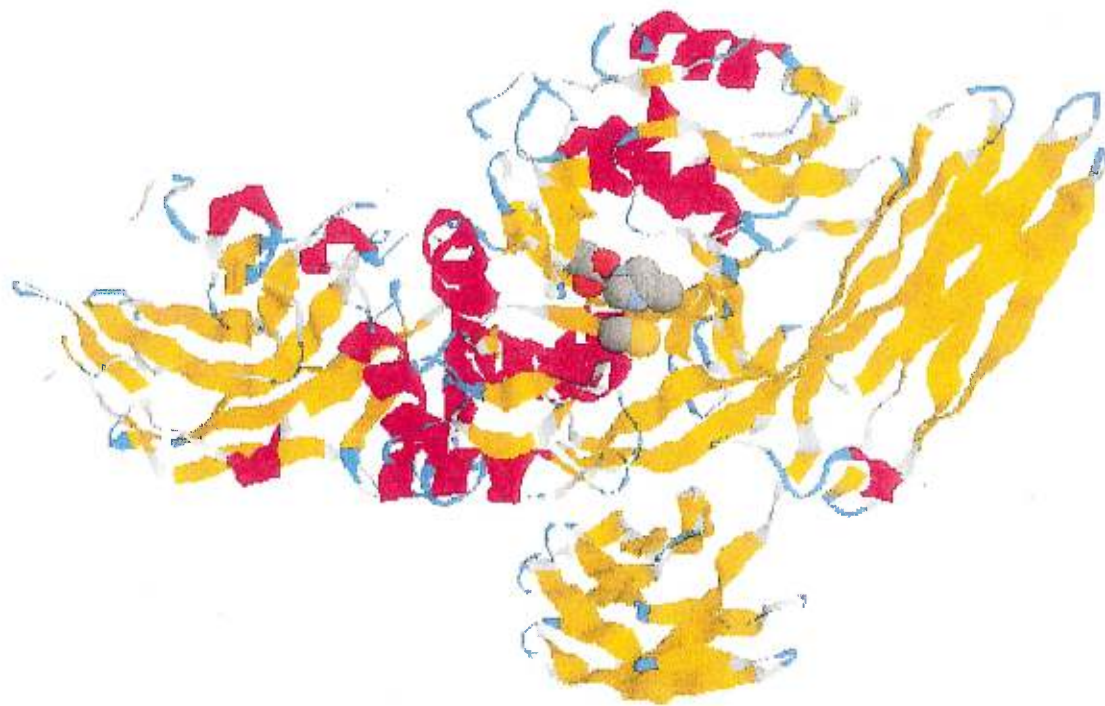
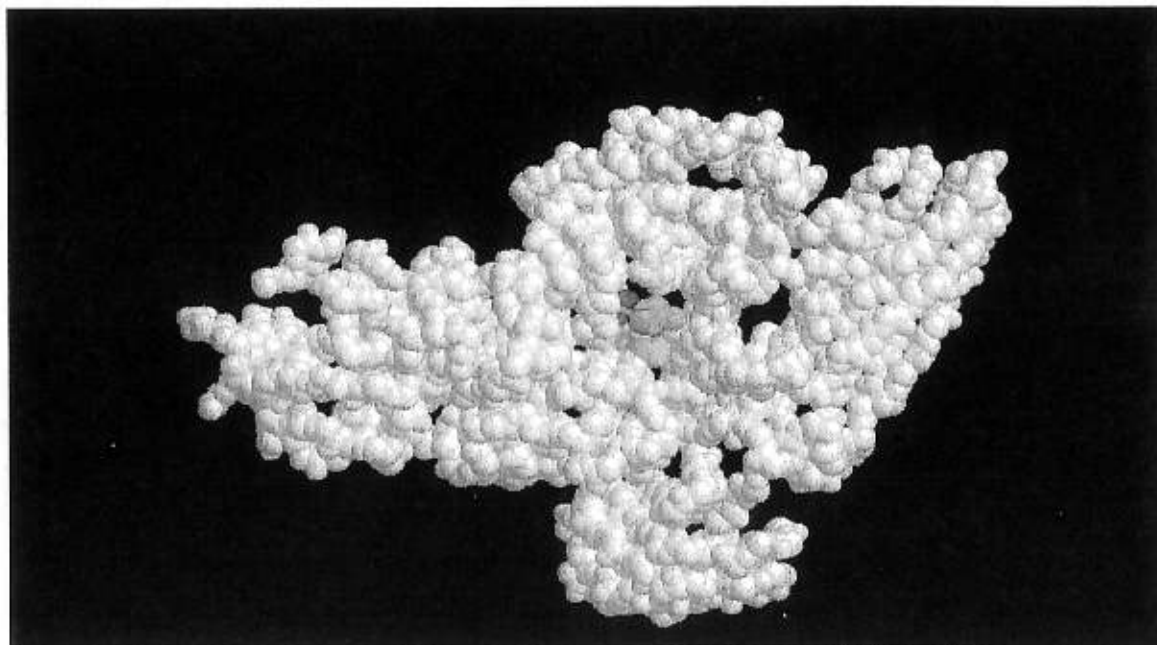


Figure 36: Modèle de type “space-fill” du site actif de la TGase (type Facteur XIIIa) basé sur les résultats d’une étude cristallographique (57). On voit un résidu His-373 à 3,7 Å du thiol du résidu Cys-314 du site actif. Comme on peut bien voir, le site actif est très encombré. Les seules chaînes auxiliaires démontrées sont celles des résidus du site actif. Les autres atomes démontrés appartiennent au squelette peptidique.



Chapitre 7 - Conclusion

Les objectifs principaux qui avaient été posés lors de l'introduction semblent tous être accomplis. Toute la recherche effectuée au cours de ces études a contribué à l'avancement de la recherche dans le domaine de l'étude mécanistique des transglutaminases.

La méthode existante de purification de TGase a été améliorée. En modifiant le type de support solide utilisé lors des colonnes de purification et en modifiant les procédures, nous avons pu améliorer le rendement, ainsi que la pureté de l'enzyme obtenue. Notre méthode produit maintenant de l'enzyme en plus grosse quantité et de plus haute activité que les autres méthodes publiées à date. De plus, nous avons pu résoudre le problème d'entreposage de l'enzyme en la lyophilisant. L'enzyme purifiée et lyophilisée, conservée au congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, maintient son activité pour plusieurs mois. Ceci permettra aux futurs chercheurs de pouvoir purifier plus d'enzyme à la fois et de l'entreposer pour faire plus d'études cinétiques avant d'avoir besoin de faire une autre purification d'enzyme.

Une nouvelle méthode à enzyme couplée a été développée pour suivre des études cinétiques de l'étape d'acylation de la TGase. La méthode est rapide, simple et ne requiert pas beaucoup de travail. Du moment qu'un amide primaire est utilisé (puisque'il doit y avoir une libération de NH_3), la méthode n'a presque pas de limitations au niveau des substrats donneurs acyles utilisés. Au niveau de substrats accepteurs acyles, n'importe quelle amine primaire peut fonctionner, à l'exception de l'hydroxylamine (puisque'elle peut se décomposer et relâcher de l'ammoniac). De plus, il y a la possibilité de faire des cinétiques à n'importe quel pH entre 5,5 et 7,5. Cette flexibilité rendra cette méthode un outil très utile pour des chercheurs voulant faire des études cinétiques de divers substrats avec la transglutaminase.

Les études cinétiques ont démontré que les anilides synthétisés fonctionnaient comme inhibiteurs compétitifs. La présence d'un groupe phényle semble porter une influence lors de la liaison au centre actif de l'enzyme: il semble y avoir une reconnaissance, mais aucune réaction. Ceci est probablement dû au fait que le site actif de l'enzyme, déjà très encombré, ne laisse pas rentrer le groupe phényle qui en tour bloque l'accès au site actif. Plus de recherche dans ce domaine pourra peut-être éventuellement céder un excellent inhibiteur.

Les études pH de l'enzyme nous ont donné un peu d'information sur le mécanisme enzymatique: les résultats suggèrent la présence d'un acide aminé impliqué dans la réaction catalytique, de l'histidine (pK_a obtenus de $6,6 \pm 0,4$ et $6,4 \pm 0,1$, possiblement His-373), dans le site actif de l'enzyme. Nous ne pouvons cependant pas conclure sur l'identité de l'étape limitante de ce cycle catalytique. Ces résultats ont été tirés de profils pH faits pour deux donneurs acyles (Z-Gln-Gly et *N,N*-diméthylcaséine) et trois accepteurs acyles (*N*-acétyl lysine méthyl ester, méthylamine et eau (hydrolyse)). La valeur de pK_a obtenue a été dérivée mathématiquement d'après un modèle proposé pour le fonctionnement de la transglutaminase.

En somme, les résultats de cette recherche ont contribué aux domaines de synthèse peptidique, de purification d'enzyme, de méthodes d'études cinétiques d'enzyme et d'enzymologie mécanistique. Les études effectuées ici serviront de bases pour des futures recherches qui un jour mèneront à l'élucidation du mécanisme complet de la transglutaminase.

Chapitre 8: Procédures pour la purification de la transglutaminase provenant du foie de cobaye

8-1 - Matériel utilisé

Les foies de cobaye frais utilisés ont été obtenus de deux endroits: par achat chez Rockland, Inc. (Gilbertsville, PA) ou par un don généreux du Dr. S. Rowland de Merck Frosst (Pointe-Claire/Dorval, PQ). L'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), le carbobenzyloxy-L-glutamylglycine, l'imidazole, le sucrose et le sulfate de zinc ont tous été achetés chez Aldrich. L'hydroxylamine HCl, l'acide trichloroacétique et le chlorure de potassium ont été obtenus chez Anachemia. Le chlorure de fer et l'acide acétique ont été obtenus de BDH. Le tampon Tris, la trousse de révélation de gels SDS-PAGE au bleu de Coomassie 250R, la trousse de dosage de quantité de protéines Bio-Rad D_C Protein Assay et les supports (gels) Macro-Prep DEAE et Bio-Gel A-0.5m ont tous été achetés chez Bio-Rad. Le sulfate de protamine (saumon, grade X), le sulfate d'ammonium (qualité SigmaUltra), l'albumine de sérum bovin (BSA, Fraction V) et le chlorure de calcium ont été obtenus de Sigma. Toutes les solutions aqueuses ont été préparées en utilisant de l'eau purifiée et déionisée par un système de purification Millipore BioCell.

8-2 - Procédures pour les méthodes de dosage utilisées

8-2-1 - Concentration de protéines

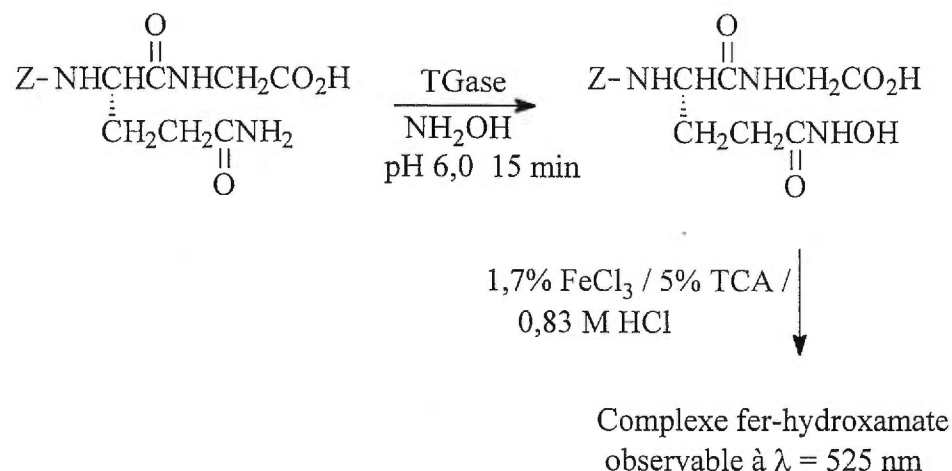
La concentration totale de protéines présentes en solution a été déterminée en utilisant le Bio-Rad D_C Protein Assay, une trousse de dosage basée sur la méthode créée par Lowry (60), en utilisant du BSA pour faire la courbe d'étalonnage. La

révélation colorimétrique a eu lieu sur une période de 15 minutes et les absorbances ont été mesurées avec un spectrophotomètre Milton-Roy Spectronic 1201. Les courbes d'étalonnage ont été faites le même jour. Cette technique a été employée à chaque étape de la purification à l'exception des fractions obtenues lors de la colonne d'exclusion de taille. Dans le cas de ces fractions, il est considéré que la TGase est purifiée, la concentration des protéines est déterminée utilisant le coefficient d'extinction de la TGase ($A_{280\text{ nm}}^{1\%} = 15,8$) (17).

8-2-2 - *Activité de la transglutaminase*

L'activité de la TGase est mesurée par le dosage colorimétrique de formation d'hydroxamate en présence de 30 mM de Z-Gln-Gly, 1 mM EDTA, 5 mM CaCl_2 et 0,1 M hydroxylamine dans du tampon 0,2 M Tris-acétate (pH 6,0) à 37 °C dans un volume final de 0,5 mL (28). Après une période de 10 minutes, la réaction est terminée et développée par l'addition de 0,5 mL d'une solution de 1,7 % FeCl_3 / 5 % TCA / 0,83 M HCl (faite en mélangeant 250 mL 15 % TCA, 250 mL 5 % FeCl_3 et 200 mL 2,5 M HCl). L'absorbance est ensuite prise sur un spectrophotomètre Milton-Roy à 525 nm. Le test témoin ("zéro") est fait en utilisant les mêmes conditions, mais sans TGase. La solution-mère de dosage d'activité est fraîchement préparée. L'activité est calculée de l'absorbance à partir du coefficient d'extinction molaire pour le complexe formé, la Z-L-glutamyl-(γ -hydroxamate)-glycine, qui est égal à $340\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (525 nm) (28) (**Schéma 16**).

Schéma 16: Test d'activité pour la TGase. Le produit formé, la Z-L-glutamyl(γ -hydroxamate)glycine, forme un complexe avec du fer et absorbe à 525 nm.



8-3 - Procédures pour la purification

Toutes les étapes ont été faites à 4 °C ou sur glace. Tous les tampons et les solutions sont fraîches du jour. Toutes les chromatographies ont été faites sur le système Bio-Rad Econo Chromatography System.

8-3-1 - Étape 1: Préparation du surnageant de foies

Les foies de cobayes frais sont immédiatement homogénéisés avec une solution de sucrose 0,25 M (2,2 mL/g de foie) à 15 000 rpm pour 1,5 minute à l'aide d'un homogénéiseur Polytron PT 3000 Homogenizer (Brinkmann Instruments). Des portions de 50 g de foie sont homogénéisées dans des cylindres en verre de 5 x 15 cm. L'homogénéisation doit avoir lieu dans les trois jours suivant la mort de l'animal pour pouvoir obtenir la plus haute activité possible. L'homogénat est ensuite centrifugé à 105 000 x g pour une période d'une heure (Beckman L-70 Centrifuge; rotor 45 Ti) et le surnageant est filtré à travers 8 couches de tissu fromage (Veratec). À ce point de

la purification, le surnageant filtré peut être congelé et entreposé à - 20 °C pour plusieurs mois sans perte importante d'activité.

8-3-2 - Étape 2: Chromatographie échangeuse d'ions

Deux fractions de 95 mL de surnageant, chacune correspondant à environ 70 g de foie, sont chargées l'une après l'autre (sur deux cycles) sur une colonne 2,5 x 5 cm contenant du gel Macro-Prep DEAE. Deux tampons sont utilisés lors de cette chromatographie: un tampon servant à équilibrer la colonne (Tampon A; Tris-Cl 5 mM, pH 7,5 avec 2 mM EDTA) et un tampon de gradient (Tampon B; Tris-Cl 5 mM, pH 7,5 avec 2 mM EDTA et 1 M NaCl). À un débit de 5 mL/minute, le système de chromatographie a été programmé comme suit: un lavage de la colonne avec 75 mL de tampon A, suivi du chargement des 95 mL de surnageant, qui est ensuite suivi par l'élution de la colonne par 500 mL d'un gradient de tampon B. Le gradient se déroule de cette façon: 100 mL de tampon A, 375 mL d'un gradient linéaire de 0 à 100 % de tampon B et finalement, un lavage avec 75 mL de 100 % de tampon B. L'étape finale du programme est une régénération de la colonne avec 100 mL de 100 % tampon A pour préparer la colonne à recevoir le prochain cycle. Des fractions de 5 mL sont récoltées durant le gradient, plus précisément dans l'intervalle de 20 à 60 % de tampon B. Les fractions riches en activité enzymatique éluent de la colonne entre 25 et 45 % du gradient de tampon B.

8-3-3 - Étape 3: Précipitation et extraction par sulfate de protamine

Les fractions obtenues durant l'étape 2 ayant une activité spécifique de 2,0 U/mg ou plus sont combinées. Une solution fraîche de sulfate de protamine 1 % (w/v) est préparée, en s'assurant que le tout est dissout. Goutte-à-goutte, sur une période de 15 minutes, un volume de cette solution correspondant à 13 % du volume total des fractions combinées y est ajouté tout en agitant. L'enzyme précipitée est ensuite récoltée par centrifugation (centrifugeuse Beckman L-70; rotor 45 Ti) à

14 600 × g pendant 15 minutes. Les précipités ainsi obtenus sont combinés et lavés avec 10 mL de tampon Tris-acétate 0,2 M (pH 6,0), en homogénéisant avec le Polytron PT 3000 pour 1 minute à 3000 rpm. Les suspensions sont subséquemment centrifugées (centrifugeuse Beckman GS-6R, rotor GH-3.8) à 2 500 × g pendant 2 minutes. Le précipité obtenu est ensuite transféré à un cylindre de 2,2 × 8 cm en verre pour subir une extraction. Chaque extraction comprend trois homogénéisations de 30 secondes (avec le Polytron à 4000 rpm) avec une intervalle d'une minute entre chacune pendant lequel l'homogénat est refroidi sur de la glace. Une extraction préliminaire est faite avec 10 mL d'une solution fraîche de sulfate d'ammonium 0,05 M dans du tampon A (Tris-Cl 5 mM, pH 7,5 avec 2 mM EDTA) grâce à l'homogénéisateur. L'homogénat est ensuite centrifugé (centrifugeuse Beckman GS-6R, rotor GH-3.8) à 2 500 × g pendant 2 minutes pour récupérer le précipité. Le surnageant riche en TGase est transféré dans un autre contenant, dosé pour l'activité et la concentration, et entreposé à 4 °C. Le précipité est, quant à lui, extrait une seconde fois, de la même façon que précédemment, en n'utilisant que 7 mL de la solution de sulfate d'ammonium. Une troisième extraction a été faite, mais a révélé que toute l'enzyme avait déjà été extraite. Les deux premières surnageants, ayant une activité spécifique au-delà de 8,0 U/mg, ont été combinés pour donner un volume final de 17 mL. Ce volume a été réduit par centrifugation en utilisant des tubes à concentration pour centrifugeuses (tubes Amicon Centri-Prep 30, filtres de masse moléculaire de 30 kDa) pour quelques heures, à 4 °C, à une vitesse maximale de 1 500 x g. Ceci permet d'obtenir un volume approprié pour la colonne d'exclusion de taille (soit entre 1 et 4 mL). Quelques heures ont été nécessaires pour réduire le volume à 3,3 mL.

8-3-4 - Étape 4: Chromatographie d'exclusion de taille

La suspension enzymatique est mise sur une colonne de 2,5 x 23 cm contenant comme support du Bio-Gel A-0.5m à fine mèche. L'élution, qui a lieu sur

une période de 336 minutes à un débit de 0,5 mL/min, se fait avec du tampon Tris-acétate 10 mM (pH 6,0) contenant 1 mM EDTA ainsi que 0,16 M KCl. Des fractions de 4 mL sont récoltées entre 67 et 246 minutes. La TGase sort de la colonne après un demi-volume d'élution. Les fractions correspondant à des concentrations élevées de protéines sur le chromatogramme, jugées par leur absorbance à 280 nm, sont testées pour l'activité spécifique. Les fractions possédant une haute activité spécifique ont été combinées pour donner un volume final de 21 mL avec une activité spécifique de 18,0 U/mg (cas spécifique). La solution a ensuite été divisée en 20 aliquots de 1,05 mL dans des tubes de micro-centrifugation Eppendorf. Ces aliquots sont ensuite placés dans de la glace sèche écrasée pendant 5 minutes. Enfin, ils sont lyophilisés pendant 6 heures en utilisant une centrifugeuse (Savant SC110) sous vide (0,25 Torr), puis entreposés à -20 °C.

8-4 - Analyses de l'enzyme purifiée par électrophorèse

8-4-1 - Électrophorèse

La séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) a été faite avec un système d'électrophorèse Bio-Rad Mini-Protean II suivant les procédures de Laemmli (61). Les gels utilisés ont été obtenus de Bio-Rad (minigels pré-fabriqués, 8 x 10 cm) et sont formés par un gel de résolution de Tris-HCl 12 %, un gel de concentration de 4 % et une concentration de "crosslinker" de 2,6 %. Le gel de concentration permet d'obtenir des bandes moins diffusées. Les bandes de protéines ont été révélées utilisant deux méthodes, soit la technique de révélation au bleu de Coomassie 250 R et la technique de révélation au zinc (34). Les marqueurs moléculaires utilisés étaient colorés à

l'avance (marqueurs moléculaires SDS-PAGE à grande échelle de Bio-Rad. Les marqueurs étaient les protéines suivantes: aprotinine ($M_r = 7,8$ kD), lysozyme ($M_r = 18,9$ kD), inhibiteur de trypsine de soya ($M_r = 28,5$ kD), anhydrase carbonique ($M_r = 33,3$ kD), ovalbumine ($M_r = 50,3$ kD), albumine du sérum bovin (BSA) ($M_r = 85,0$ kD), β -galactosidase ($M_r = 123,000$) et myosine ($M_r = 213,000$).

8-4-2 – Méthodes de révélation utilisées pour les gels

La méthode de révélation au bleu de Coomassie est une méthode classique de révélation de polypeptides sur gels PAGE et SDS-PAGE. Ces derniers forment un complexe avec du colorant Bleu de Coomassie R250 (aussi connu sous le nom de Bleu Acide 83), un colorant de textiles à base de triphénylméthane. Le gel est immergé dans une solution concentrée de colorant/méthanol/acide acétique glacial pendant trois à quatre heures. Ensuite, l'excès de colorant est enlevé par diffusion durant plusieurs étapes de décoloration jusqu'à ce que l'intensité désirée de couleur est achevée (8-12 heures). La coloration est permanente. La limite de détection est de l'ordre du μg de polypeptide. Le gel peut être séché et conservé (33).

Une autre méthode de révélation employée est la révélation négative au zinc. Cette méthode consiste en deux étapes qui peuvent être complétées dans moins de 10 minutes. La première comprend l'immersion du gel dans une solution d'imidazole pendant 2 minutes, et la seconde, un lavage avec une solution de sulfate de zinc pendant 30 secondes (ces deux étapes se font avec agitation). Le résultat obtenu est la formation d'un fond blanc opaque sur le gel avec les bandes de protéines qui sont transparentes. Lorsque le gel est regardé sur une surface foncée, les bandes transparentes, appartenant aux polypeptides révélés, sont facilement observées. Le gel révélé doit être photographié puisqu'il ne peut pas être séché et puisque la coloration disparaît après 8 heures (33). Cette technique permet de détecter des ng de protéines dans le gel et est donc beaucoup plus sensible que celle impliquant le bleu

de Coomassie.

8-4-3 -Analyse des gels pour déterminer le degré de pureté

Pour déterminer le degré de pureté de la TGase isolée, un logiciel d'analyse de gels d'électrophorèse a été employé. Une courbe d'étalonnage a été préparée en chargeant 0,5, 1, 2,5, 5,0 et 7,5 μg de BSA dans 5 puits sur le gel SDS-PAGE. Deux autres puits ont été chargés avec de la TGase isolée, soit 5,0 μg dans un et 7,5 μg dans l'autre. Après électrophorèse, les bandes de protéines ont été révélées en utilisant deux méthodes, soit la technique de révélation au bleu de Coomassie 250 R et la technique de révélation au zinc. Une photographie a été prise du gel révélé au zinc, et le gel révélé au bleu de Coomassie a été séché entre de feuilles de cellulose. Ensuite, la photographie et le gel séché ont été numérisés en utilisant un numériseur d'images à une résolution de 400 dpi. Les images ont ensuite été analysées en utilisant le logiciel Scion Image for Windows (obtenu gratuitement en ligne à http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm). Ce dernier possède l'habileté d'analyser les images de gels d'électrophorèse d'une dimension et de quantifier la quantité de protéines dans chaque bande grâce à l'intensité de chacune d'elles.

Chapitre 9: Synthèse des substrats utilisés pour les études cinétiques avec la transglutaminase

9-1 - Généralités

9-1-1 – Origine des produits utilisés

Tous les produits chimiques utilisés pour les synthèses proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich Canada.

9-1-2 – Analyse des composés synthétisés

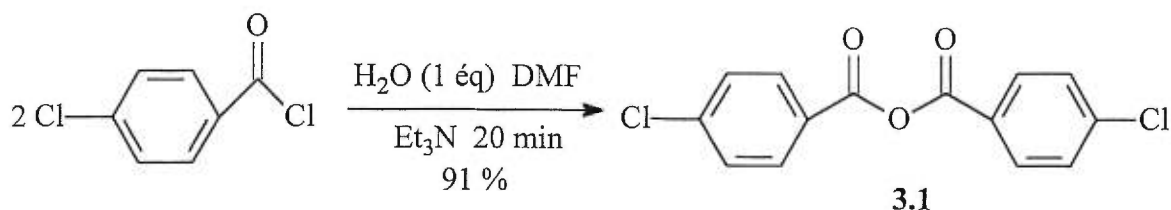
Les points de fusion des produits (recristallisés) ont été obtenus en utilisant un appareil de point de fusion par capillaire Thomas Hoover. Les températures obtenues n'ont pas été corrigées.

Les spectres de masse ont été pris utilisant soit le spectromètre AEI-MS 902, le Kratos MS-50 TCTA ou bien le Micromass 1212 par l'un des ces deux méthodes: Bombardement atomique rapide (FAB) ou bien ionisation chimique (CI). Les résultats ont été obtenus grâce au Centre de Spectrométrie de Masse de l'Université de Montréal.

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) a été faite en utilisant un des deux appareils suivants: un Bruker ADX-300 (^1H , 300 MHz; ^{13}C , 75 MHz) ou un Bruker ARX-400 (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100,4 MHz; ^{19}F , 382,2 MHz).

9-2 – Synthèse des composés

9-2-1 – Anhydride de l'acide *p*-chlorobenzoïque (3.1)

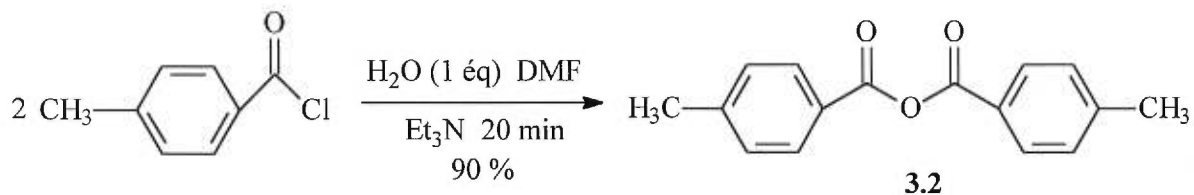


Dans un ballon sec de 50 mL, 10 mL de DMF sec, 13,2 mL de Et₃N sec (95,4 mmol, 6 éq.) et 288 µL de H₂O (16 mmol, 1 éq.) sont agités, suivi d'un ajout de 4,09 mL de chlorure de toluyle (31,8 mmol, 2 éq.). Après 20 minutes d'agitation, le contenu du ballon est ajouté à ~150 mL H₂O pour faire précipiter le produit. Le tout est filtré sous vide pour récupérer le produit, qui est bien séché au four sous vide avant de continuer. Le produit obtenu, l'anhydride de l'acide *p*-chlorobenzoïque (3.1), est un composé poudreux brun-beige.

Rendement: 4,26 g (90,8 %)

p.f. 192-195 °C [lit.(38) = 203 °C]

RMN: ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,20-7,70 (4H, m, Ar), 7,90-8,20 (4H, m, Ar)

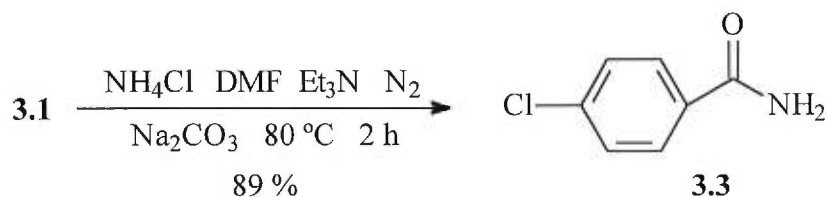
9-2-2 - Anhydride de l'acide *p*-toluique (3.2)

Dans un ballon de 25 mL sec, 5 mL DMF sec, 4,2 mL Et₃N sec (30 mmol, 6 éq.) et 90 µL H₂O (5 mmol, 1 éq.) sont agités, suivi d'un ajout de 1,33 mL toluyl chloride (10 mmol, 2 éq.). Après 20 minutes d'agitation, le contenu du ballon est ajouté à ~100 mL H₂O pour faire précipiter le produit. Le tout est filtré sous vide pour récupérer le produit, qui est bien séché au four sous vide avant de continuer. Le produit obtenu, l'anhydride de l'acide *p*-toluique (3.2), est un composé poudreux blanc.

Rendement: 1,14 g (89,5 %)

p.f. 93-95 °C [lit.(38) = 95 °C]

RMN: ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2,50-2,60 (6H, s, CH₃), 7,20-7,60 (4H, m, Ar), 7,80-8,20 (4H, m, Ar)

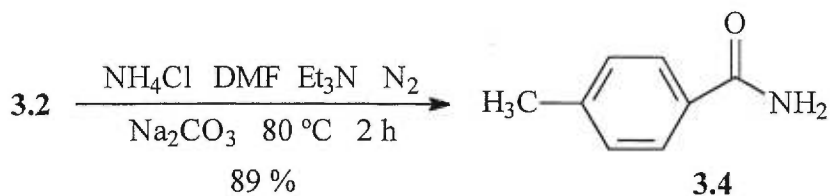
9-2-3 – *p*-Chlorobenzamide (**3.3**)

Dans un ballon de 25 mL sec, 0,3835 g **3.1** (1,3 mmol, 1,3 éq.), 0,0535 g NH₄Cl (1 mmol, 1 éq.), 10 mL DMF sec et 0,2 mL Et₃N (catalyseur) sont agités sous N₂, suivi d'un ajout de 0,318 g Na₂CO₃ (3 mmol, 3 éq.). Le tout est agité à 80 °C (sans reflux) pendant deux heures. Le produit est ensuite extrait en ajoutant de l'eau, puis avec de l'acétate d'éthyle. Le produit est trouvé dans la phase organique. Une fois extrait, une bonne partie du solvant est évaporée et une autre extraction est ensuite réalisée avec du NaHCO₃. La fraction organique contenant le produit est ensuite séché avec du MgSO₄ puis évaporée. Le produit obtenu, le *p*-chlorobenzamide (**3.3**), est un composé cristallin beige.

Rendement = 132,3 mg (88,5 %)

p.f. 168-172 °C [lit.(38) = 172-176 °C]

RMN: ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5,60-6,20 (2H, s, large, NH₂), 7,40-7,50 (2H, d, H *mé*ta par rapport à l'amide d'un benzène substitué *para*), 7,70-7,80 (2H, d, H *ortho* par rapport à l'amide d'un benzène substitué *para*).

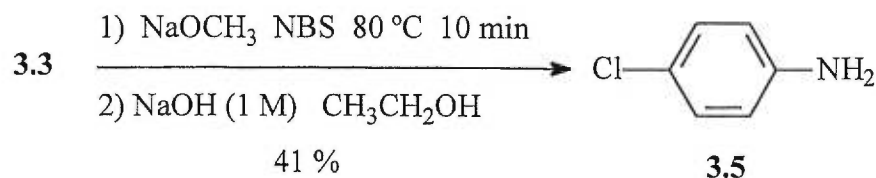
9-2-4 - *p*-Toluamide (3.4)

Dans un ballon de 25 mL sec, 0,3302 g d'anhydride **3.2** (1,3 mmol, 1,3 éq.), 0,0535 g NH₄Cl (1 mmol, 1 éq.), 4 mL DMF sec et 0,2 mL Et₃N (catalyseur) sont agités sous N₂, suivi d'un ajout de 0,220 g Na₂CO₃ (2 mmol, 2 éq.). Le tout est agité à 80 °C (sans reflux) pendant deux heures. Le produit est ensuite extrait en ajoutant de l'eau, puis en extrayant avec de l'acétate d'éthyle. Le produit est trouvé dans la phase organique. Une fois extrait, une bonne partie du solvant est évaporée et une autre extraction est ensuite réalisée avec du NaHCO₃. La fraction organique contenant le produit est ensuite séché avec du MgSO₄ puis évaporée. Le produit obtenu, le *p*-toluamide **3.4**, est un composé cristallin beige.

Rendement = 120,0 mg (88,9 %)

p.f. 158-160 °C [lit.(38) = 160 °C]

RMN: ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2,30-2,50 (3H, s, CH₃), 5,50-6,30 (2H, s, large, NH₂), 7,20-7,30 (2H, d, H *meta* par rapport à l'amide d'un benzène substitué *para*), 7,70-7,80 (2H, d, H *ortho* par rapport à l'amide d'un benzène substitué *para*).

9-2-5 – *p*-Chloroaniline (3.5)

Avec beaucoup de précaution, 0,288 g Na métallique (12,5 mmol) est dissout dans environ 15-20 mL méthanol dans un bécher de 50 mL. Quand le tout est dissout (un peu de méthanol peut être rajouté si nécessaire), la solution est ajoutée à un ballon de 50 mL contenant 156 mg (1 mmol) de l'amide synthétisé (*p*-chlorobenzamide (**3.3**)) et est agitée sous reflux à $\sim 80^\circ\text{C}$ pendant 10 minutes. Ensuite, 0,12 g NBS (3 x 0,12 g = 0,36 g, 20,2 mmol) est ajouté à chaque 3 minutes (donc, immédiatement au début, après 3 minutes, et après 6 minutes). Après 10 minutes, la fin de la réaction est vérifiée par CCM.

Le produit est isolé en évaporant 70 % du méthanol puis en ajoutant 150-200 mL d'acétate d'éthyle. La solution est ensuite rincée une fois avec 30 mL H₂O (pour enlever NaOCH₃ et NBS en excès) puis une fois avec 30 mL Na₂S₂O₃ (aq.) (pour enlever toute trace de NBS).

Avant de procéder à la prochaine étape, le produit est purifié en le mettant sur une colonne de gel de silice (remplie avec 100 % CH₂Cl₂) et en l'éluant en utilisant du 100 % CH₂Cl₂. Le produit sort de la colonne, tandis que les impuretés y restent. Dans le cas où le produit ne sort pas après avoir utilisé 250 mL d'éluant, un mélange de 20 % acétate d'éthyle / CH₂Cl₂ est utilisé. Les fractions contenant le produit sont combinées et évaporées.

Pour ensuite déprotéger et former l'amine, 20 mL d'éthanol et 20 mL NaOH 1M sont ajoutés au produit dans un ballon de 100 mL. Le tout est agité sous reflux à

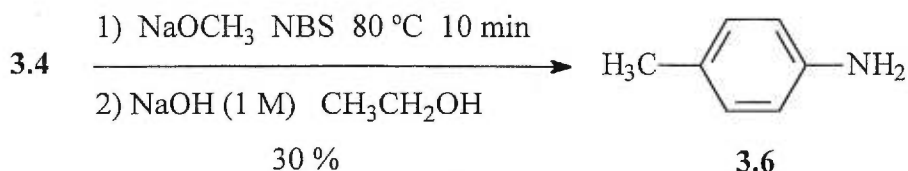
100 °C pendant 2h. Après avoir vérifié que la réaction est terminée par CCM, 50 % du solvant est évaporé.

Le produit est isolé en ajoutant 20 mL H₂O au mélange, puis en extrayant 3 fois avec du diéthyl éther (le produit, dans un milieu basique, sera insoluble dans H₂O mais soluble dans un solvant organique). Le produit est ensuite extrait (3 fois) avec 15-20 mL HCl 5 % (le produit devient un sel HCl soluble dans l'eau dans un milieu acide). La phase aqueuse contenant le produit est ensuite basifiée à un pH ~11-13 avec du NaOH solide, ce qui précipite le produit. Le tout doit refroidir à la température de la pièce avant d'extraire 3 fois avec 30 mL diéthyl éther (le produit est trouvé en phase organique). Pour mettre l'amine sous forme stable de sel HCl, 3-4 gouttes de HCl concentré sont ajoutées et le solvant est évaporé. Le produit obtenu, le sel de la *p*-chloroaniline (**3.5**), est un composé poudreux cristallin blanc.

Rendement: 66,5 mg (40,5 %)

p.f. 70,5 °C (amine libre) (sel = 190 °C_(déc.)) [lit.(38) = 72,5 °C (amine libre)]

RMN: ¹H (300 MHz, D₂O): δ (ppm) 7,30-7,40 (2H, d, H *ortho* par rapport à l'amine d'un benzène substitué *para*), 7,50-7,60 (2H, d, H *meta* par rapport à l'amine d'un benzène substitué *para*)

9-2-6 - *p*-Toluidine (3.6)

Avec beaucoup de précaution, 0,288 g Na métallique (12,5 mmol) est dissout dans environ 15-20 mL méthanol dans un bécher de 50 mL. Quand le tout est dissout (un peu de méthanol peut être rajouté si nécessaire), la solution est ajoutée à un ballon 50 mL contenant 135 mg (1 mmol) de l'amide synthétisée (*p*-toluamide (3.4)) et est agitée sous reflux pendant 10 minutes. Ensuite, 0,12 g NBS ($3 \times 0,12 \text{ g} = 0,36 \text{ g}$, 20,2 mmol) est ajouté chaque 3 minutes (donc immédiatement au début, après 3 minutes, et après 6 minutes). Après 10 minutes, la fin de la réaction est vérifiée par CCM.

Le produit est isolé en évaporant 70 % du méthanol puis en ajoutant 150-200 mL d'acétate d'éthyle. La solution est ensuite rincée une fois avec 30 mL H₂O (pour enlever NaOCH₃ et NBS en excès) puis une fois avec 30 mL Na₂S₂O₃ (aq.) (pour enlever toute trace de NBS). Avant de procéder à la prochaine étape, le produit est purifié en le mettant sur une colonne de gel de silice (remplie avec 100 % CH₂Cl₂) et en l'éluant en utilisant du 100 % CH₂Cl₂. Le produit sort de la colonne, tandis que les impuretés y restent. Dans le cas où le produit ne sort pas après avoir utilisé 250 mL d'éluant, un mélange de 20 % acétate d'éthyle / CH₂Cl₂ est utilisé. Les fractions contenant le produit sont combinées et évaporées.

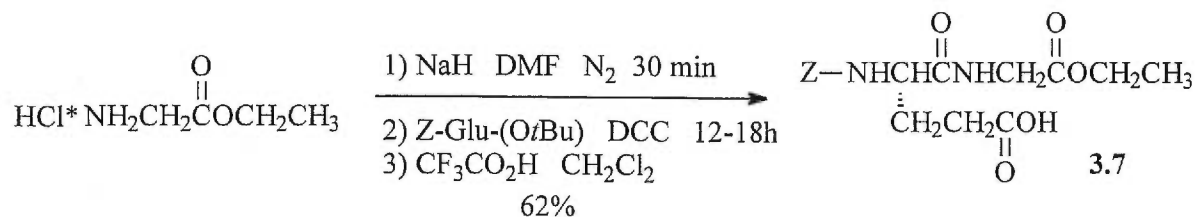
Pour ensuite déprotéger et former l'amine, 20 mL d'éthanol et 20 mL NaOH 1M sont ajoutés au produit dans un ballon de 100 mL. Le tout est agité sous reflux à 100 °C pendant 2h. Après avoir vérifié que la réaction est terminée par CCM, 50 % du solvant est évaporé.

Le produit est isolé en ajoutant 20 mL H₂O au mélange, puis en extrayant 3 fois avec du diéthyl éther (le produit, dans un milieu basique, sera insoluble dans H₂O mais soluble dans un solvant organique). Ensuite, il faut extraire 3 fois avec 15-20 mL HCl 5 % (le produit devient un sel HCl soluble dans l'eau dans un milieu acide). La phase aqueuse contenant le produit est ensuite basifiée à un pH ~11-13 avec du NaOH solide, ce qui précipite le produit. Le tout doit refroidir à la température de la pièce avant d'être extrait 3 fois avec 30 mL diéthyl éther (le produit est trouvé en phase organique). Pour mettre l'amine sous forme stable de sel HCl, 3-4 gouttes de HCl concentré sont ajoutées et le solvant est évaporé. Le produit obtenu, le sel de la *p*-toluidine (**3.6**), est un composé cristallin jaune pâle.

Rendement: 43,0 mg (30,0 %)

p.f. 187 °C (déc.) [lit.(38) = 243 °C]

RMN: ¹H (300 MHz, D₂O): δ (ppm) 2,40-2,50 (3H, s, CH₃), 7,30-7,40 (2H, d, H *ortho* par rapport à l'amine d'un benzène substitué *para*), 7,40-7,50 (2H, d, H *meta* par rapport à l'amine d'un benzène substitué *para*)

9-2-7 - *N*-Z-glutamylglycine éthyl ester (3.7)

À 0,85 g glycine éthyl ester (sel HCl, 6 mmol, 2 éq.) dans ~15 mL DMF sec, 0,217 g NaH (5,4 mmol, ~2 éq.) est ajouté sous N₂. Après 30 minutes, 0,931 g DCC (4,5 mmol, 1,5 éq.) et 0,998 g Z-Glu-(O-*t*Bu) (3 mmol, 1 éq.) sont ajoutés et le tout est agité durant 12-18h. Après l'agitation, 10 gouttes d'acide acétique glacial sont ajoutées (pour éliminer toutes les traces de DCC). La solution est ensuite agitée pendant 30 minutes. Le précipité (urée) est enlevé par filtration sous vide, puis le produit est extrait du liquide en utilisant trois portions de 50-100 mL CH₂Cl₂, puis une portion de 50 mL H₂O, 50 mL HCl 1M et 50 mL NaHCO₃. Le produit est dans la phase organique, qui est séchée avec du MgSO₄, puis évaporée. La pompe à vide est utilisée pour évaporer le DMF.

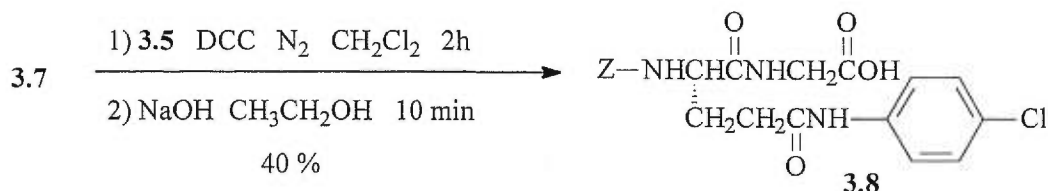
Le dipeptide est déprotégé en ajoutant 10 mL CF₃COOH et 10 mL CH₂Cl₂ au produit puis en agitant à la température de la pièce pendant 2 h. Le produit est isolé en ajoutant 100 mL d'acétate d'éthyle au produit puis en extrayant avec 1 x 50 mL H₂O et 3 x 50 mL NaHCO₃ (aq.). La phase aqueuse contenant le produit est ensuite acidifiée à un pH ~1 avec du HCl concentré. Le précipité (produit) est récupéré par filtration sous vide. Le produit est dissout dans de l'acétate d'éthyle, lavé avec de l'eau, séché avec du MgSO₄ puis le solvant est évaporé. Du NaCl_(aq.) est utilisé durant la dernière étape pour faciliter l'extraction. Le produit obtenu, la *N*-Z-glutamylglycine éthyl ester (3.7), est un composé poudreux blanc.

Rendement: 0,683 g (62,2 %)

p.f. 120-122 °C [lit.(62) = 115-117 °C]

RMN: ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1,30 (3H, t, $J = 7$ Hz), 1,90-2,08 (m, 1H), 2,10-2,24 (m, 1H), 3,92-4,14 (m, 2H), 4,20 (2H, q, $J = 7$ Hz), 4,42-4,58 (b, 1H), 5,10 (s, 2H), 5,75-5,88 (b, 1H), 7,12-7,22 (b, 1H), 7,28-7,40 (m, 5H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 171,9, 171,2, 169,9, 156,4, 138,0, 128,8, 128,3, 128,1, 127,8, 61,5, 54,1, 41,1, 33,4, 29,2, 14,0.

9-2-8 - *N-Z-L-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine (3.8)*

Il faut préparer la *p*-chloroaniline (**3.5**) pour le couplage en la transformant de sel HCl en amine libre, tout en la purifiant. Pour faire ceci, le sel est dissout dans de l'eau et la solution est acidifiée avec du HCl concentré. Il faut extraire une fois avec du CH₂Cl₂ pour enlever les impuretés. La phase aqueuse est ensuite basifiée avec du NaHCO₃ solide. Le produit est isolé en extrayant trois fois avec du CH₂Cl₂. La phase organique (qui contient le produit) est ensuite séchée avec du MgSO₄, puis évaporée. L'amine libre est maintenant prête à réagir.

Dans un ballon de 50 mL sec, 116,3 mg *N-Z*-glutamylglycine éthyl ester (**3.7**) (0,317 mmol, 1,1 éq.), 119,5 mg DCC (0,576 mmol, 2 éq.) et 37,0 mg *p*-chloroaniline (**3.5**) (0,288 mmol, 1 éq.) sont ajoutés sous N₂. Ensuite, 10 mL CH₂Cl₂ sec est ajouté et le tout est mélangé sous N₂ pendant 1h. Une fois que la réaction est terminée (vérification par CCM), il faut ajouter 150 mL CH₂Cl₂ sec et puis transférer la solution à une ampoule d'extraction de 250 mL. La solution est lavée avec 20 mL H₂O, 20 mL HCl 5 % (pour enlever toute trace de toluidine) et 20 mL NaHCO₃ (aq.). La phase organique (contenant le produit) est ensuite séchée avec du MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié par colonne pipette: La pipette pasteur est remplie de gel de silice puis lavée avec 40 mL CH₂Cl₂. Le produit est introduit dans la colonne,

et la colonne est lavée avec 20 mL CH₂Cl₂. Il faut faire ensuite passer 10 mL 10 % acétate d'éthyle/CH₂Cl₂, 10 mL 20 % acétate d'éthyle/CH₂Cl₂, 10 mL 30 % acétate d'éthyle/CH₂Cl₂, 20 mL 50 % acétate d'éthyle/CH₂Cl₂ puis 20 mL 70 % acétate d'éthyle/CH₂Cl₂. Les fractions pures sont trouvées par CCM, combinées et évaporées. Le produit est un composé poudreux beige/blanc.

Rendement: 96,3 mg (70,1 %)

p.f. 144-146 °C

RMN: ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,30 (t, 3H, J = 7 Hz), 2,05-2,30 (m, 2H), 2,44-2,60 (m, 2H), 3,95-4,10 (m, 2H), 4,22 (q, 2H, J = 7 Hz), 4,30 (q, 1H, J = 7 Hz), 5,10(s, 2H), 5,85 (bd, 1H, J = 7 Hz), 6,88 (bs, 1H), 7,22-7,40 (m, 7H), 7,47-7,56 (m, 2H), 8,36 (bs, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 174,8, 173,3, 171,2, 158,4, 138,7, 138,0, 129,9, 129,7, 129,5, 129,0, 128,9, 122,5, 67,9, 62,4, 55,9, 42,1, 33,9, 29,0, 14,5.

Dans le ballon contenant les 96,3 mg de produit, 15 mL d'éthanol 95 % est introduit, suivi de 0,333 mL NaOH 1M. Le tout est agité et le progrès de la réaction est suivi par CCM. Après 7 minutes, 0,266 mL NaOH 1M est ajouté. Après 5 minutes (temps total depuis le début: 12-13 minutes), le progrès de la réaction est vérifié par CCM. La réaction est vite et devrait être terminée. *Il est important de ne pas laisser le produit réagir avec le NaOH trop longtemps car ce dernier pourra hydrolyser le dipeptide AU COMPLET, au lieu de l'ester seulement.* Quelques gouttes de HCl 5 % sont ajoutées jusqu'à ce que le pH de la solution soit d'environ 4. Tout le solvant est ensuite évaporé. De l'acétate d'éthyle est ensuite ajouté, et le tout est passé à travers un papier filtre pour enlever toute trace de NaCl solide. Le solvant est ensuite évaporé. Le produit est ensuite transféré dans un ballon de 50 mL et séché sous vide. Une fois sec, il faudra y ajouter, en agitant, 10 mL NaHCO_{3(aq.)}. Le tout est agité 10-15 minutes (le précipité est de l'urée). Le liquide est ensuite transféré à une ampoule à extraction de 60 mL. L'urée est enlevée, dans ce cas-ci, en extrayant trois

fois avec 30 mL d'acétate d'éthyle. Le produit (dipeptide) reste dans la phase aqueuse, qui est ensuite acidifiée à un pH ~3. Il faut attendre 12-18h pour la cristallisation du produit. Les cristaux sont filtrés sous vide, tout en les lavant avec de l'eau pour enlever toute trace de NaCl. Les cristaux sont ensuite bien séchés dans un dessiccateur sous vide. Le produit obtenu, la *N-Z-L*-glutamyl(γ -*p*-chloroanilide)glycine (**3.8**), est un composé cristallin blanc.

Rendement: 51,7 mg (40,0 %)

p.f. 213-215 °C

RMN: ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 1,94-2,10 (m, 1H), 2,10-2,26 (m, 1H), 2,48 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 3,85 (d, 1H, $J = 13$ Hz), 3,95 (d, 1H, $J = 13$ Hz), 4,16-4,26 (m, 1H), 5,02 (s, 2H), 7,18-7,32 (m, 7H), 7,45-7,55 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 174,6, 173,3, 172,9, 158,4, 138,7, 138,0, 129,9, 129,7, 129,5, 129,0, 128,9, 122,5, 67,9, 55,9, 41,9, 34,0, 29,1.

Rendement: 218 mg (92,5 %)

p.f. 160-162 °C.

RMN: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1,30 (t, 3H, $J = 7\text{Hz}$), 2,08-2,28 (m, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,50-2,62 (m, 2H), 3,98-4,10 (m, 2H), 4,18-4,42 (m, 3H), 5,08 (s, 2H), 5,95 (bs, 1H), 7,00 (bs, 1H), 7,06-7,20 (m, 2H), 7,22-7,48 (m, 7H), 8,10 (bs, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 174,8, 173,2, 171,2, 158,4, 138,0, 137,2, 134,9, 130,2, 129,5, 129,0, 128,9, 121,4, 67,8, 62,3, 46,0, 42,1, 34,0, 29,2, 20,9, 14,5.

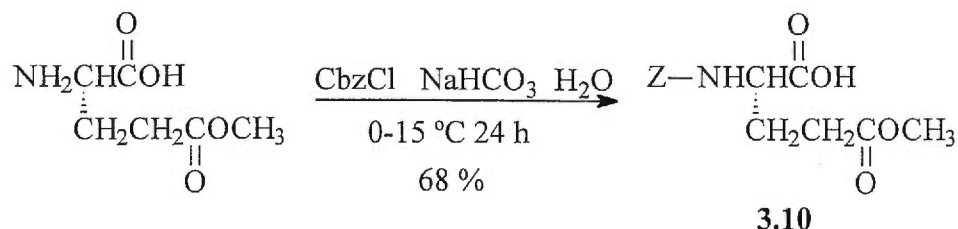
Dans le ballon contenant les 217,5 mg de produit, 15 mL d'éthanol 95 % est introduit, suivi de 0,333 mL NaOH 1M. Le tout est agité et le progrès de la réaction est suivi par CCM. Après 7 minutes, 0,266 mL NaOH 1M est ajouté. Après 5 minutes (temps total depuis le début: 12-13 minutes), le progrès de la réaction est vérifié par CCM. La réaction est vite et devrait être terminée. *Il est important de ne pas laisser le produit réagir avec le NaOH trop longtemps car ce dernier pourra hydrolyser le dipeptide AU COMPLET, au lieu de l'ester seulement.* Quelques gouttes de HCl 5 % sont ajoutées jusqu'à ce que le pH de la solution soit d'environ 4. *Il est important de ne pas trop acidifier la solution car ceci peut cliver certaines parties du dipeptide.* Le solvant est ensuite évaporé. De l'acétate d'éthyle est ajouté et le tout est passé à travers un papier filtre pour enlever toute trace de NaCl solide. Le solvant est ensuite évaporé. Le produit est transféré dans un ballon de 50 mL et séché sous vide. Une fois sec, il faut y ajouter, en agitant, 10 mL $\text{NaHCO}_3(\text{aq.})$. Le tout est agité 10-15 minutes (le précipité est de l'urée). Le liquide est ensuite transféré à une ampoule à extraction de 60 mL. L'urée est enlevée en extrayant trois fois avec 30 mL d'acétate d'éthyle. Le produit (dipeptide) reste dans la phase aqueuse, qui est ensuite acidifiée à un pH ~ 3 . La solution est mise au réfrigérateur pour 12-18h pour aider à la cristallisation. Les cristaux sont filtrés sous vide, en les lavant avec de l'eau pour enlever toute trace de NaCl. Les cristaux sont ensuite bien séchés dans un dessiccateur sous vide. Le produit obtenu, *N-Z-L-glutamyl(γ -*p*-méthylanilide)glycine (3.9)*, est un composé cristallin blanc.

Rendement: 85,9 mg (38,9 %)

p.f. 157-159 °C

RMN: ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 1,96-2,08 (m, 1H), 2,12-2,26 (m, 1H), 2,30 (s, 3H), 2,44-2,54 (m, 2H), 3,78-4,04 (m, 2H), 4,16-4,28 (m, 1H), 5,06 (s, 2H), 7,00-7,12 (m, 2H), 7,20-7,44 (m, 7H).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 178,8, 176,3, 175,0, 160,1, 139,6, 138,8, 136,6, 131,9, 130,7, 130,6, 123,1, 69,6, 57,7, 44,3, 35,7, 30,9, 22,6.

9-2-10 - *N*-Z-acide L-glutamique-5-méthyl ester (3.10)

Dans un ballon de 500 mL, 31,25 g de NaHCO₃ (0,37 mol, 12 éq.) est dissout dans 250 mL d'eau distillée. Une fois que tout est dissout, 5,00 g de L-acide glutamique-5-méthyl ester (31 mmol, 1 éq.) est dissout. Le tout est agité 20 minutes à température ambiante avant de mettre le ballon dans un bain à 4 °C pour 10 minutes. Ensuite, 6,61 mL de Cbz-Cl (7,9 g, 46,5 mmol, 1,5 éq.) est ajouté goutte à goutte, tout en agitant. Le tout est agité sur glace pour environ 2 heures, puis ensuite à température ambiante pour 24 h.

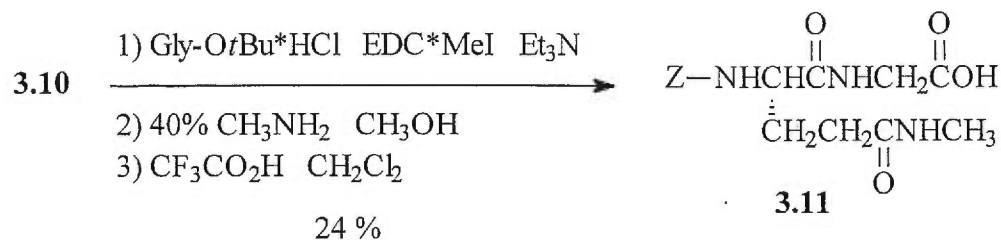
Le produit est isolé par extraction en lavant deux fois avec 50-75 mL de diéthyl éther. La phase aqueuse est ensuite acidifiée à un pH d'environ 1 pour donner une suspension blanche et opaque. Le tout est transféré dans une ampoule d'extraction et le produit est extrait de la phase aqueuse avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée une fois avec 50 mL d'eau, séchée avec MgSO₄ puis évaporée pour donner une huile. L'huile est placée sous vide pour 48 h pour donner un solide cristallin blanc, la *N*-carbobenzyloxy-acide L-glutamique-5-méthyl ester (3.10).

Rendement: 6,23 g (68,1 %)

p.f. 102-104 °C [lit.(38) = 107 °C]

RMN: ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,95-2,15 (1H, m); 2,20-2,35 (1H, m); 2,40-2,65 (2H, m); 3,60-3,70 (3H, s); 4,35-4,50 (1H, m); 5,10-5,20 (2H, s); 5,55-5,65 (1H, d, *J* = 8 Hz); 7,30-7,45 (5H, m); 8,85-9,45 (1H, s, large).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 171,5, 169,2, 157,4, 138,1, 129,4, 128,3, 127,5, 61,3, 53,4, 41,7, 32,6, 29,3.

9-2-11 - *N-Z-γ*-(5-méthyl) glutaminyl glycine (3.11)

Dans un ballon de 50 mL sous atmosphère inerte (N₂), 295 mg *N-Z*-acide L-glutamique-méthyl ester (3.10) (1 mmol, 1 éq.), 184 mg glycine *t*-Bu ester HCl (1,1 mmol, 1,1 éq.) et 386 mg EDC*MeI (1,3 mmol, 1,3 éq.) sont dissous dans 10 mL de CH₂Cl₂ distillé. Pour rendre la glycine sous sa forme libre, 155 µL de triéthylamine (1,1 mmol, 1,1 éq.) sont rajoutés et le tout est laissé sous agitation pendant 12 h. Le produit est isolé en évaporant le CH₂Cl₂ puis en solubilisant le résidu dans de l'acétate d'éthyle. Ce dernier est ensuite lavé trois fois avec une solution diluée de NaHCO₃ (pour enlever le produit de départ), trois fois avec une solution 5 % d'acide citrique (pour enlever la glycine et le EDC), séché avec du MgSO₄ puis le solvant est évaporé.

À ce résidu, 1 mL de méthanol est rajouté avec 0,5 mL d'une solution aqueuse de 40 % méthylamine (afin de faire le méthylamide sur la chaîne latérale de l'acide glutamique). Le mélange est agité à température ambiante pour 12 h. Après vérification par CCM pour s'assurer que la réaction est terminée, le méthanol et l'eau sont évaporés. Le résidu jaunâtre est ensuite dissout dans 30 mL d'acétate d'éthyle où un précipité se forme. Le liquide (contenant le produit) est isolé par filtration sur verre poreux et placé dans un ballon à fond rond de 25 mL avec 7,5 mL CH₂Cl₂ et 0,75 mL de CF₃CO₂H (pour déprotéger l'acide). Ce mélange est agité à température ambiante pour 60 minutes et le produit est isolé par extraction acide-base pour donner un solide cristallin blanc, la *N-Z-γ*-(5-méthyl) glutaminyl glycine (3.11).

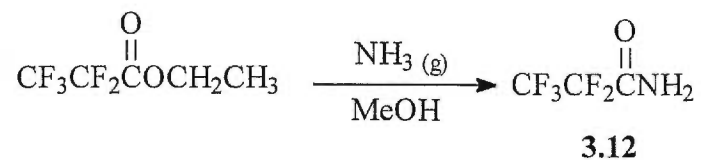
Rendement: 82,0 mg (23,8 %)

p.f. 134-136 °C

RMN: ^1H (400 MHz, D_2O): δ (ppm) 1,95-2,05 (1H, m); 2,10-2,20 (1H, m); 2,35-2,45 (2H, t); 2,70-2,80 (3H, s); 3,80-3,90 (2H, s); 4,10-4,20 (1H, m); 5,15-5,25 (2H, s); 7,35-7,50 (5H, m).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 171,7, 171,4, 169,3, 156,9, 137,8, 129,1, 128,5, 127,9, 61,2, 53,1, 41,6, 35,5, 32,9, 29,7.

9-2-12 - 2,2,3,3,3-Pentafluoropropionamide (3.12)



Dans un ballon de 50 mL sec, 350 μL de pentafluoropropionate d'éthyle (450 mg, 2,37 mmol, 1 éq.) est dissout dans 15 mL de méthanol et du NH_3 gazeux y est barbotté pendant 10 minutes. Le ballon est bouché et le tout est agité 18 h à température ambiante. La réaction est suivie par CCM (1:1 acétate d'éthyle/ CH_2Cl_2 , révélation au Br_2). Le solvant est évaporé et pompé à sec pour donner un solide cristallin blanc/beige. Le produit est ensuite recristallisé dans du CHCl_3 pour donner des cristaux blanc de pentafluoropropionamide (3.12).

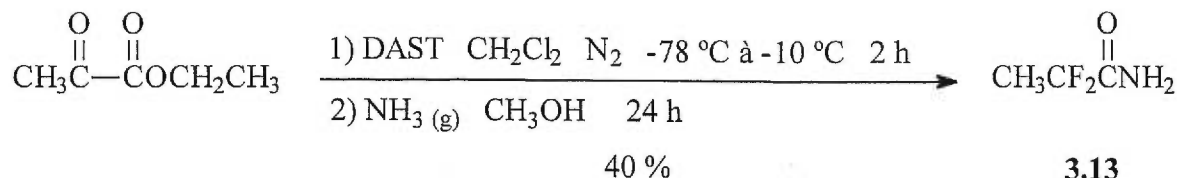
Rendement: 196 mg (50,6 %)

p.f. 91-94 °C [lit.(38) = 98 °C]

RMN: ^{13}C (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 161,7 (t, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $J = 25$ Hz); 119,5 (qt, CF_3 , $J = 287$ Hz, 33 Hz); 110,0 (tq, CF_2 , $J = 266$ Hz, 33 Hz).

^{19}F (382 MHz, CD_3OD): δ (ppm) -82,5 (3F, s, CF_3); -121,9 (2F, s, CF_2).

9-2-13 - 2,2-Difluoropropionamide (3.13)



Dans un ballon de 50 mL sec, 396 μL de pyruvate d'éthyle (420 mg, 3,62 mmol, 1 éq.) est dissout dans 10 mL de CH_2Cl_2 sec, sous N_2 , dans un bain à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$. Par la suite, 496 μL de trifluorure de diéthylaminosulfure (DAST) (3,8 mmol, 605 mg, 1,05 éq.) sont ajoutés à la solution, sous N_2 , goutte à goutte. Le tout est agité pour 0,5 h à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$, puis ensuite, est mis au congélateur à $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ pour 3 jours. La réaction est suivie par CCM (1:1 hexane/ CH_2Cl_2 , révélation au Br_2). Une fois que le produit de départ a disparu selon le CCM, 20 mL d'eau froide et 15 mL CH_2Cl_2 sont ajoutés et le tout est agité. La phase organique est séparée, lavée avec de l'eau froide, séchée avec du MgSO_4 et évaporée sous pression atmosphérique (pour éviter de faire sublimer le produit) pour donner une huile jaune/brun (qui peut être utilisée sans purification).

Dans un ballon de 50 mL, l'huile est dissoute dans 15 mL de méthanol. Du NH_3 gazeux y est barbotté pendant 10 minutes. Le ballon est bouché et le tout est agité pendant 48h à température ambiante. Le solvant est évaporé pour donner un résidu brun, qui est dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 . Le produit est purifié par chromatographie flash (gel de silice) de la manière suivante: la colonne est chargée, lavée avec 200 mL CH_2Cl_2 , puis le produit est élué avec du 1:1 CH_2Cl_2 /acétate d'éthyle. Les fractions contenant le produit sont combinées et le solvant évaporé pour donner un produit cristallin jaune pâle/orange. Le produit est ensuite recristallisé dans de l'hexane pour donner des cristaux blanc de 2,2-difluoropropionamide (3.13).

Rendement: 161 mg (40,8 %)

p.f. 68-70 °C [lit.(63) = 78 °C]

Masse molaire: 109 g/mol

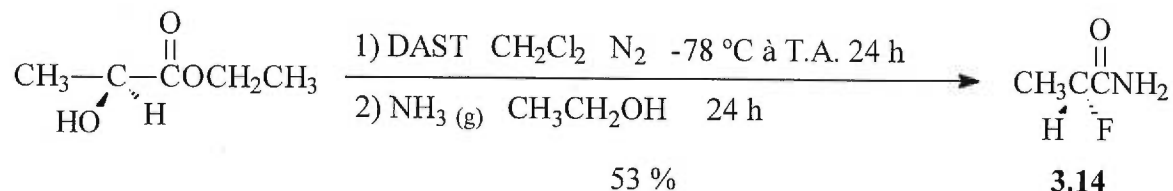
Spec. de masse: (FAB) 109,0 g/mol

RMN: ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1,75-1,92 (3H, t, CH_3 , $J = 18$ Hz); 5,70-6,60 (2H, d, large, NH_2).

^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 167,4 (t, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $J = 30$ Hz); 116,8 (t, CF_2 , $J = 250$ Hz); 20,7 (t, CH_3 , $J = 25$ Hz).

^{19}F (382 MHz, CDCl_3): δ (ppm) -101 (2F, q, CF_2 , $J = 20$ Hz).

9-2-14 - 2-Fluoropropionamide (3.14)



Dans un ballon de 50 mL sec, 374 μL de *S*-(-) lactate d'éthyle (390 mg, 3,3 mmol, 1 éq.) est dissout dans 10 mL de CH_2Cl_2 sec sous N_2 dans un bain à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$. Par la suite, 523 μL de trifluorure de diéthylaminosulfure (DAST) (638 mg, 3,96 mmol, 1,05 éq.) sont ajoutés à la solution, sous N_2 , goutte à goutte. Le tout est agité pour 0,5h à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$, puis ensuite, à température ambiante pour 1 h. La réaction est suivie par CCM (1:2 hexane/ CH_2Cl_2 , révélation au Br_2). Une fois que le produit de départ a disparu du CCM, 20 mL d'eau froide et 15 mL CH_2Cl_2 sont ajoutés et le tout est agité. La phase organique est séparée, lavée avec de l'eau froide, séchée avec du MgSO_4 et évaporée sous pression normale (pour éviter la sublimation du produit) pour donner une huile jaune/brun (qui peut être utilisée sans purification).

Dans un ballon de 50 mL, l'huile est dissoute dans 15 mL d'éthanol. Du NH_3 gazeux y est barbotté pendant 10 minutes. Le ballon est bouché et le tout est agité 48 h à température ambiante. Le solvant est évaporé et pompé à sec pour donner un résidu brun, qui est dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 . Le produit est purifié par chromatographie flash (gel de silice) de la manière suivante: la colonne est chargée avec 100 % hexane, lavée avec 100 mL CH_2Cl_2 , puis le produit est élué avec du 1:1 CH_2Cl_2 /acétate d'éthyle. Les fractions contenant le produit sont combinées et le solvant évaporé pour donner un produit cristallin beige avec des traces de jaune pâle. Le produit est ensuite recristallisé dans de l'hexane pour donner des aiguilles blanches de 2-fluoropropanamide (3.14).

Rendement: 160 mg (53,3 %)

p.f. 88-90 °C [lit.(64) = 94 °C]

RMN: ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,55-1,75 (3H, dd, CH₃, *J* = 24 Hz, 6 Hz); 4,90-5,20 (1H, qd, CH, *J*=48 Hz, 6 Hz); 5,40-6,70 (2H, d, large, NH₂).

¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 163,5 (d, C(O)NH₂, *J* = 32 Hz); 107,2 (d, CHF, *J* = 240 Hz); 22,1 (d, CH₃, *J* = 24 Hz).

¹⁹F (382 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -95,3 (1 F, m, CHF).

Chapitre 10: Méthode spectrophotométrique continue à enzyme couplée pour suivre les cinétiques de la transglutaminase

10-1 - Généralités

10-1-1 – Origine des produits utilisés

La transglutaminase utilisée pour ces expériences a été obtenue de foies de cobayes tel que décrit dans le Chapitre 8. La glutamate déshydrogénase (GDH) provenant de foies de bovins et possédant une activité spécifique de 26 unités/mg a été obtenue de Sigma. Les composés β -nicotinamide-adénine dinucléotide (β -NADH), α -kétoglutarate, Z-Gln-Gly, MOPS, TRIS, MES, Na₄EDTA, *N*-acétyl-L-lysine méthyl ester, méthylamine (solution aqueuse 10 %), monodansylcadavérine (MDC), *N,N*-diméthylcaséine et le chlorure de calcium ont tous été obtenus de Sigma-Aldrich Chemical Company. L'eau utilisée pour toutes les expériences est de l'eau déionisée, purifiée par un système de purification Millipore BioCell.

10-1-2 – Instruments utilisés

Un spectrophotomètre Varian Cary 100 avec thermostat a été utilisé pour faire les cinétiques. Des ordinateurs de type PC avec un logiciel d'analyse graphique (Axum 4,0) ont été utilisés pour analyser et extraire de l'information des données cinétiques.

10-1-2 – Définition d'une unité (U) d'activité de GDH

Une unité de GDH est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la réduction de 1,0 μmol de α -kétoglutarate en acide L-glutamique par minute, à 25 °C, avec la présence d'ammoniac et de l'agent réducteur β -NADH.

10-2 - Procédures

Un test typique va comme suit: dans un volume final de 480 μL , il faut préincuber dans la cuvette pendant 3 minutes à 37 °C une solution de 200 mM tampon MOPS (pH 7,0), 5 mM CaCl_2 , 1 mM EDTA, 500 μM β -NADH, 10 mM α -kétoglutarate, 2,4 unités de GDH, des concentrations variantes de Z-Gln-Gly (0,6 mM à 15 mM) et une concentration fixe d'un substrat accepteur acyle (3,34 mM *N*-acétyl lysine méthyl ester, 1 mM méthylamine ou de l'eau).

La réaction enzymatique est initiée en ajoutant 0,14 unités de TGase (dans un volume de 20 μL) pour donner un volume final de 500 μL . La cuvette est placée dans le spectrophotomètre, à 37 °C, et la diminution de l'absorbance est suivie. Pour le test témoin correspondant, le 20 μL de TGase est remplacé par de l'eau.

Les essais ont été faits dans une cuvette en quartz de 1 mL avec un trajet optique de 1 cm. Le spectrophotomètre, fixé à une longueur d'onde de 340 nm, nous permet de suivre la diminution en absorbance dûe à l'oxydation de β -NADH en NAD^+ . Cette diminution, qui correspond à la pente linéaire négative du graphique d'absorbance en fonction du temps, se réalise à une vitesse proportionnelle à la consommation de substrat par la TGase et peut être transformée en valeur de vitesse à l'aide du coefficient d'extinction molaire du β -NADH de $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (43). Il faut noter que la pente du graphique est prise après une période d'induction de quelques minutes, durant laquelle une concentration suffisante d'ammoniac est produite pour

saturer la GDH. Dans cette période, la pente du graphique est nulle ou faiblement négative.

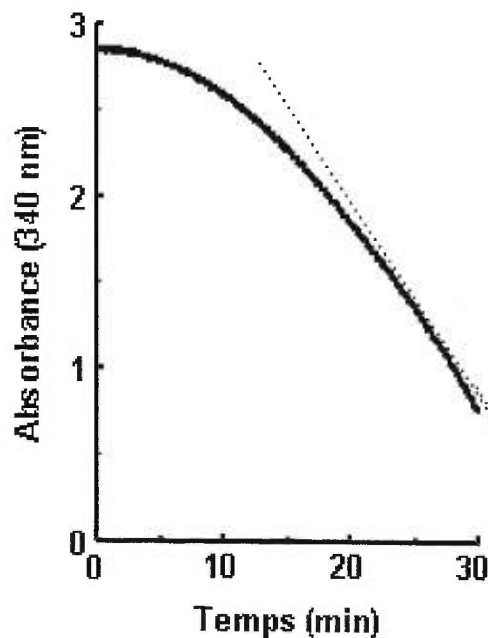
Pour les expériences à des pH autres que 7,0, les tampons suivants ont été utilisés:

- pH 5,45 – 6,05 : 200 mM tampon MES
- pH 6,5 – 7,5 : 200 mM tampon MOPS
- pH 8,0 – 8,5 : 200 mM tampon TRIS

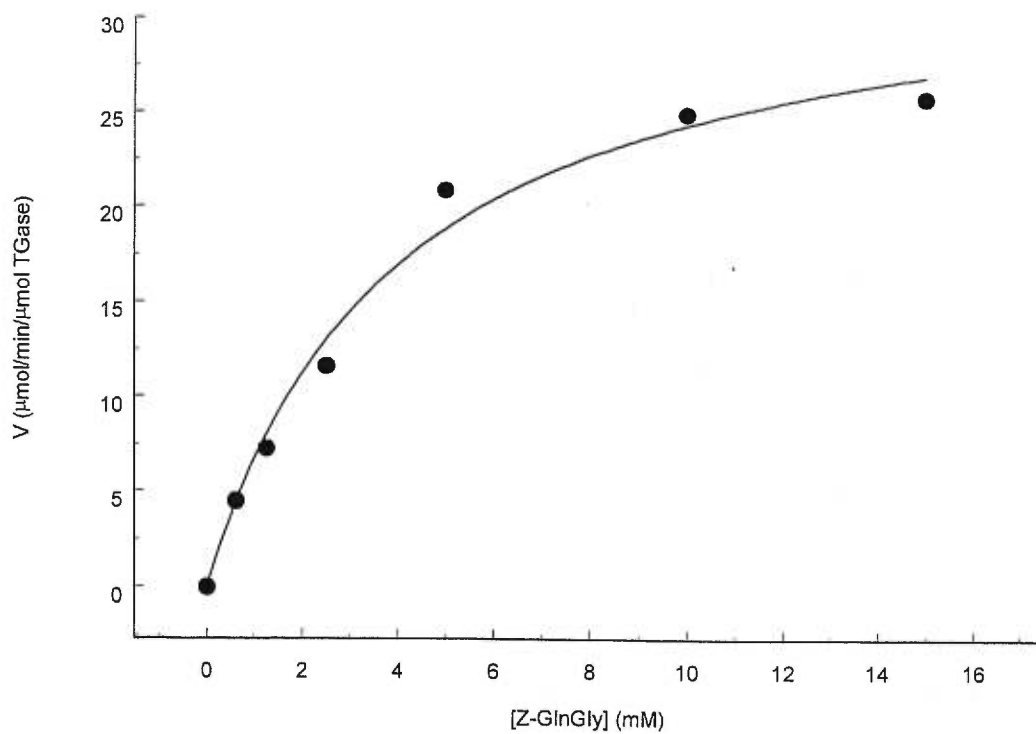
10-3 – Interprétation des résultats

Pour obtenir de l'information cinétique des résultats obtenus, il faut suivre trois étapes:

- 1) La pente est prise de la courbe obtenue du spectrophotomètre en 10-2. Cette pente est équivalente à la vitesse (V) de la réaction. La ligne pointillée représente la section utilisée pour calculer la pente (qui est choisie aléatoirement en prenant la ligne la plus droite après que la période d'induction a terminé).



- 2) Après avoir répété les études cinétiques avec différentes concentrations de Z-Gln-Gly (environ 5-6 concentrations) jusqu'à l'apparition d'un plateau, les vitesses et les concentrations associées sont introduites dans un logiciel d'analyse de données (Axum 4,0) et sont utilisées pour tracer un graphique de type Michaelis-Menten. Chaque point sur le graphique représente donc une vitesse obtenue à une concentration précise de Z-Gln-Gly. Le graphique suivant est un exemple des résultats typiques obtenus:



3) L'ordinateur calcule automatiquement la valeur de K_M^{app} et de V_{max} selon les équations suivantes (49):

- Réaction d'aminolyse:

$$V = (V_{ab}AB) / (K_{ah}K_{bt} + K_{at}B + K_{bt}A + AB)$$

où $A = [Z\text{-Gln-Gly}]$, $B = [\text{substrat accepteur acyle}]$, $K_M^{app} = K_{at}$ et $V_{max} = V_{ab}$.
Les valeurs de K_{ah} et de K_{bt} varient selon le substrat utilisé. Dans le cas de la $Z\text{-Gln-Gly}$, $K_{ah} = 2,0$ mM et $K_{bt} = 1,8$ mM. K_{ah} représente le K_M d'hydrolyse et K_{bt} représente le K_M de l'amine primaire (accepteur acyle).

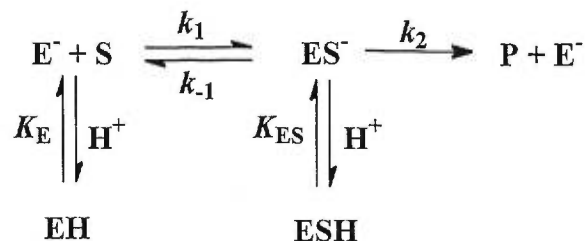
- Réaction d'hydrolyse:

$$V = (V_{max}A) / (K_M^{app} + A)$$

où $A = [Z\text{-Gln-Gly}]$.

10-4 - Interprétation des profils pH

L'effet du pH sur la vitesse de la réaction enzymatique de la TGase lors d'une simple ionisation suit le modèle suivant (53,1):



Puisque nos profils pH-vitesse montent avec le pH, nous cherchons $[\text{ES}^-]$, ce qui représente la fraction d'enzyme ionisée. L'enzyme libre est représentée par E^- . De plus, EH représente la fraction de l'enzyme libre qui est protonnée et E^- , l'enzyme ionisée qui est prête à se lier avec le substrat S . Pour déduire les valeurs de pK_a d'un profil pH, nous devons utiliser une équation mathématique. K_{ES} représente le K_a de l'ionisation et $[\text{ES}]_{\text{total}}$, la quantité d'enzyme totale en solution.

$$\text{K}_{\text{ES}} = \frac{[\text{ES}^-] [\text{H}^+]}{[\text{ESH}]}$$

$$[\text{ESH}] = \frac{[\text{ES}^-] [\text{H}^+]}{\text{K}_{\text{ES}}}$$

$$\begin{aligned}
 [\text{ES}]_{\text{total}} &= [\text{ESH}] + [\text{ES}^-] \\
 &= \frac{[\text{ES}^-] [\text{H}^+]}{\text{K}_{\text{ES}}} + [\text{ES}^-] \\
 &= [\text{ES}^-] \underbrace{\left(\frac{[\text{H}^+]}{\text{K}_{\text{ES}}} + 1 \right)}_{f_2}
 \end{aligned}$$

$$[\text{ES}^-] = \frac{[\text{ES}]_{\text{total}}}{f_2}$$

De la même façon,

$$f_1 = \frac{[H^+]}{K_E} + 1$$

Ce que l'on peut déterminer comme suit:

$$K_E = \frac{[E^-][H^+]}{[EH]}$$

$$[EH] = \frac{[E^-][H^+]}{K_E}$$

$$\begin{aligned} [E]_{\text{total}} &= [EH] + [E^-] \\ &= \frac{[E^-][H^+]}{K_E} + [E^-] \\ &= [E^-] \underbrace{\left(\frac{[H^+]}{K_E} + 1 \right)}_{f_1} \end{aligned}$$

D'après Voet et Fersht (53,1),

$$V'_{\text{max}} = \frac{V_{\text{max}}}{f_2}$$

$$K'_M = K_M \left(\frac{f_1}{f_2} \right)$$

Donc,

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{ES}}}$$

$$\text{et } K'_M = K_M \left[\frac{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_E} \right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ES}} \right)} \right]$$

où V'_{\max} et K'_M représentent les vitesses maximales et constantes d'affinité observées.

Références

1. Voet, D. and Voet J.G. (1990) in *Biochemistry* pp 316-354, John Wiley & Sons, New York City.
2. Stryer, L. (1981) in *Biochemistry* pp 103-129, W.H. Freeman & Co., New York.
3. Lehninger, A. L. (1975) in *Biochemistry* pp 183-216, Worth Publishers Inc., New York.
4. Lorand, L. and Conrad, S. M. (1984) *Mol. Cell. Biochem.* 58, 9-35.
5. Folk, J. E. (1983) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Bio.* 54, 1-56.
6. Mosher, D. F. (1978) *Annals of the New York Academy of Sciences* 312, 38-42.
7. Aeschlimann, D. and Paulsson, M. (1994) *Thrombosis and Haemostasis* 71, 402-415.
8. Achyuthan, K. E., Slaughter, T. F., Santiago, M. A., Enghild, J. J. and Greenberg, C. S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 21284-21292.
9. Abe, T., Chung, S. I., DiAugustine, R. P. and Folk, J. E. (1977) *Biochemistry* 16, 5495-5501.
10. Borth, W., Chang, V., Bishop, P. and Harpel, P. (1991) *J. Biol. Chem.* 268, 18149-18153.
11. Jensen, P. H., Sorensen, E. S., Petersen, T. E., Gliemann, J. and Rasmussen, L. K. (1995) *Biochem. J.* 310, 91-94.
12. 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. and Sollid, L. M. (1998) *Nature Medicine* 4, 713-717.
13. Groenen, P. J. T. A., Grootjans, J. J., Lubsen, N. H., Bloemendal, H. and de Jong, W. W. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 831-833.
 14. Cooper, A. J. L., Sheu, K. R., Burke, J. R., Onodera, O., Strittmatter, W. J., Roses, A. D. and Blass, J. P. (1997) *J. Neurochem.* 69, 431-434.
 15. Schroeder, W. T., Thacher, S. M., Stewart-Galetka, S., Annarella, M., Chema, D., Siciliano, M. J., Davies, P. J. A., Tang, H.-Y., Sowa, B. A. and Duvic, M. (1992) *J. Invest. Dermatol.* 99, 27-34.
 16. Folk, J. E. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 3707-3713.
 17. Folk, J. E. and Chung, S. I. (1985) *Methods Enzymol.* 113, 358-375.
 18. Leblanc, A., Day, N., Ménard, A. and Keillor, J. W. (1999) *Prot. Exp. Purif.* 89-95.
 19. Huang, X., Day, N., Luo, X., Seid, M. and Keillor, J. W. (1999) *J. Pept. Res.* 53, 126-133.
 20. Barnes, A. R. and Sugden, J. K. (1990) *Pharm. Acta Helv.* 65, 258-261.
 21. Day, N. and Keillor, J. W. (1999) *Anal. Biochem.* 141-144.
 22. Wilhelm, B., Seitz, J. and Meinhardt, A. (1996) *J. Chromato. B* 684, 163-177.
 23. Lee, K. N., Arnold, S. A., Birckbichler, P. J., Patterson, M. K., Jr., Fraij, B. M., Takeuchi, Y. and Carter, H. A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1202, 1-6.
 24. Dietrich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O. and Schuppan, D. (1997) *Nature Medicine* 3, 797-801.
 25. Gorman, J. J. and Folk, J. E. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9007-9010.
 26. Leblanc, A. Mémoire de Maîtrise. 1999. Université de Montréal.

27. Brookhart, P. P., McMahon, P. L. and Takahashi, M. (1983) *Anal. Biochem.* 128, 202-205.
28. Folk, J. E. and Cole, P. W. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 5518-5525.
29. Connellan, J. M., Chung, S. I., Whetzel, N. K., Bradley, L. M. and Folk, J. E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1093-1098.
30. Ikura, K., Sakurami, H., Okurama, K., Sasaki, R. and Chiba, H. (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49, 3527-3531.
31. Folk, J. E. and Chung, S. I. (1973) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 38, 109-191.
32. Croall, D. E. and DeMartino, G. N. (1986) *Cell Calcium*, 7, 29-39.
33. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) in *Molecular cloning: A laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
34. Fernandez-Patron, C., Castellanos-Serra, L. and Rodriguez, P. (1992) *Biotechniques* 12, 564-573.
35. Gross, M. and Folk, J. E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1301-1306.
36. Dugas, H. (1997) in *Principes de base en modélisation moléculaire*, Librairie de l'Université de Montréal, Montréal.
37. Hudlicky, M. (1988) in *Organic Reactions* pp 513-637, John Wiley&Sons Inc, New York.
38. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 63ed. (1982) (Weast, R. C., Ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida.
39. Huang, X. and Keillor, J. W. (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 313-316.
40. Folk, J. E. (1983) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 54, 1-56.

41. Sheng, S., Kraft, J. J. and Shuster, S. M. (1993) *Anal. Biochem.* 211, 242-249.
42. Thompson, G. A. and Meister, A. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6792-6798.
43. Kun, E. and Kearney, E. B. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Lund, P., Ed.)) pp 1802-1806, Academic Press, New York.
44. Strecker, H. J. (1955) *Methods Enzymol.* 2, 220-225.
45. Scopes, R. K. (1988) in *Protein Purification: Principles and Practice* pp 243-244, Springer-Verlag, New York.
46. Schrode, J. and Folk, J. E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 653-661.
47. Gorman, J. J. and Folk, J. E. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 419-427.
48. Achyuthan, K. E. (1998) *J. Biolumin. Chemilumin.* 13, 1-11.
49. Gross, M., Whetzel, N. K. and Folk, J. E. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4648-4655.
50. Olson, J. A. and Anfinsen, C. B. (1953) *J. Biol. Chem.* 202, 841-856.
51. Gore, M. G., Greenwood, C. and Holbrook, J. J. (1972) *Biochem. J.* 127, 30p-31p.
52. Cleland, W. W. (1977) in *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* (Meister, A., Ed.)) pp 273-387, Interscience Publishers Inc., New York.
53. Fersht, A. (1985) in *Enzyme Structure and Mechanism*, W.H. Freeman and Company, New York.
54. Folk, J. E. and Cole, P. W. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 122, 244-264.
55. Isaacs, N. (1995) in *Physical Organic Chemistry*, Longman Scientific and Technical, Essex, England.
56. Allen, K. G. D., Stewart, J. A., Johnson, P. E. and Wettlaufer, D. G. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 575-582.

57. Yee, V. C., Pedersen, L. C., LeTrong, I., Bishop, P. D. and Stenkamp, R. E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7296-7300.
58. Hettasch, J. M. and Greenberg, C. S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 28309-28313.
59. Adalsteinsson, H. and Bruice, T. C. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 3440-3447.
60. Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
61. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
62. Gross, M. and Folk, J. E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3021-3025.
63. Bloschitsa, F.A., Burmakov, A.I., Kunshenko, B.V., Alekseeva, L.A., Bel'ferman, A.L., Pazderskii, Y.A. and Yagupol'skii, L.M. (1981) *Zh. Org. Khim.* 17 (7), 1420-1429.
64. Middleton, W.J. (1975) *J. Org. Chem.* 40, 574-578.