

## **CHAPITRE 2: Objectifs du travail**

## OBJECTIFS

---

Ce travail a pour but de comprendre le mécanisme d'activation du zymogène de l'allergène d'acarien Der p 1. Il s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire Macromolécules Biologiques de l'Université de Liège et le service l'Allergologie Expérimentale de l'Université Libre de Bruxelles. Ce travail est caractérisé, à la fois par son aspect fondamental lié à la compréhension du mécanisme d'activation présent chez toutes les protéases à cystéine active de la famille CA1, mais aussi par son aspect appliqué lié au développement d'une stratégie de production de l'allergène Der p 1 sous forme recombinante et active à des fins thérapeutiques, vaccinales et de diagnostic. En effet, par la structure unique de son propeptide, le zymogène de la protéase Der p 1 représente un candidat de choix pour étudier le mécanisme d'activation des protéases de la famille CA1. Par ailleurs, les propriétés d'allergènes majeurs de Der p 1, l'implication de son activité protéolytique dans le déclenchement de l'allergie et l'obligation de la présence de son propeptide pour obtenir un repliement correct du zymogène nécessitent le développement d'une stratégie permettant l'élimination du propeptide au terme de la production afin d'obtenir un allergène recombinant actif et correctement replié.

Ce travail est divisé en plusieurs objectifs. Chacun correspond à une étude différente relative à un aspect différent du processus d'activation.

### **Etude 1**

Plusieurs études montrent que la levure *Pichia pastoris* représente un hôte de choix pour l'expression du zymogène proDer p 1 et que ce dernier peut être ensuite activé par un traitement à pH acide. Dans ce contexte, le premier objectif de cette étude sera d'évaluer l'importance des deux sites potentiels de N-glycosylation présents dans le zymogène proDer p 1 dans le processus d'activation du précurseur exprimé en *P. pastoris* et dans l'interaction entre la protéase Der p 1 et son propeptide. Le second objectif sera d'étudier l'influence du pH sur le potentiel inhibiteur du propeptide ainsi que sur sa structure.

### **Etude 2**

Au vu des résultats de notre première étude, l'activation du zymogène proDer p 1 à pH acide est un compromis entre le maintien de l'activité de la protéase à pH acide et la perte du potentiel inhibiteur du propeptide liée à un changement de sa structure induit par le changement du pH. Le but de cette seconde étude sera d'identifier, dans le propeptide de Der p 1, les interactions stabilisatrices potentiellement influençables par le pH et d'étudier leurs effets sur la structure du propeptide et sur la modulation de l'activation à pH acide. Cette étude permettra de déterminer l'événement initial conduisant à l'activation du zymogène à pH acide et de cartographier quelles régions du propeptide sont impliquées dans cette première étape.

### **Etude 3**

Les résultats de deux premières études suggèrent que l'activation du zymogène proDer p1 soit un processus autocatalytique lié à un changement de la conformation du propeptide induit à pH acide. Ce processus se déroulerait en plusieurs étapes, conduisant à la formation d'au moins deux intermédiaires.

Le premier objectif de la troisième étude sera de déterminer la contribution des phénomènes de protéolyse intramoléculaires et intermoléculaires dans la formation des différents intermédiaires. Le second objectif sera d'évaluer l'influence du pH sur la spécificité protéolytique de Der p 1, ainsi que l'importance des résidus situés à l'extrémité C-terminale du propeptide dans le processus d'activation.

#### **Etude 4**

Le but de cette quatrième étude sera d'analyser et de comparer l'influence du pH sur la stabilité et la structure du zymogène proDer p 1 et de la protéase Der p 1. Cette étude sera rendue possible par l'absence de résidu tryptophane dans le propeptide permettant uniquement le suivi de ceux présents dans le domaine catalytique, que ce soit dans la protéase mature ou dans le zymogène. Cela permettra de déterminer si le propeptide influence ou non la stabilité du domaine catalytique à pH neutre et d'évaluer son impact sur le dépliement du zymogène en condition d'activation (pH 4).

