

UE Structures, Mécanismes et Fonctions des Protéines (D5CI538)

Coordinateur : Laurent SALMON

Première session d'examen (19 décembre 2019) – Durée : 3 h

Notes de cours et polycopiés autorisés

Durée des exercices donnée à titre indicatif

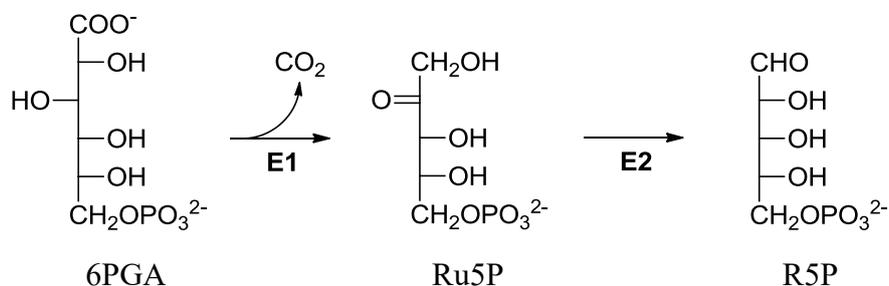
PARTIE A : Mécanismes enzymatiques I sans cofacteurs redox et Inhibition

Enzymatique

(120 MIN) - Cours de L. Salmon & J.-P. Mahy

EXERCICE 1 :

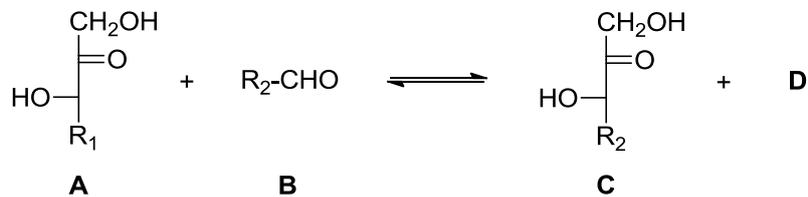
La transformation du 6-phospho-D-gluconate (6PGA) en 5-phosphate-D-ribulose (Ru5P) catalysée par l'enzyme E1 ne nécessite ni thiamine pyrophosphate (TPP), ni pyridoxal phosphate (PLP). Par ailleurs, l'enzyme incubée en présence du substrat et de borohydrure de sodium n'est pas inactivée. Par contre, selon sa source, elle peut être activée en présence d'un cation divalent.



1. Quel coenzyme est impliqué dans la transformation catalysée par l'enzyme E1 ?
2. Proposez un mécanisme pour cette transformation enzymatique en indiquant les éventuels produits intermédiaires formés et en montrant le rôle du cofacteur et du cation divalent.
3. Proposez la structure possible d'un inhibiteur analogue de substrat et celle d'un inhibiteur analogue d'intermédiaire de haute énergie pour cette enzyme.
4. *In vivo*, le produit Ru5P est ensuite isomérisé en 5-phosphate-D-ribose (R5P) par l'enzyme E2.
 - a. A quel type (ou famille) d'enzyme appartient E2 ?
 - b. Proposez un mécanisme pour cette deuxième transformation sachant qu'il est du même type que celui rapporté pour la phosphoglucose isomérase.
 - c. Proposez la structure possible d'un inhibiteur analogue de substrat et celle d'un inhibiteur analogue d'intermédiaire de haute énergie pour cette deuxième enzyme.

EXERCICE 2 :

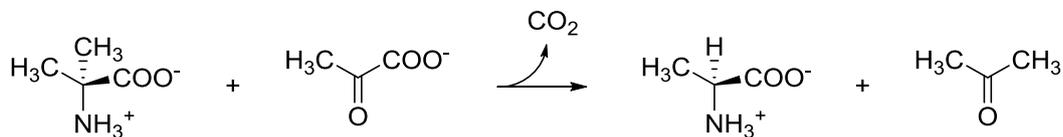
La trans-cétolase est une enzyme à thiamine pyrophosphate (TPP) qui catalyse ce type de transformation :



1. Quel est le composé **D** ?
2. Donnez le mécanisme de la réaction (vous préciserez quelle face *Re* ou *Si* de **B** est attaquée par l'énamine intermédiaire).
3. Le même composé **C** peut être obtenu en remplaçant le substrat **A** par de l'hydroxypyruvate $\text{HOCH}_2\text{-CO-COO}^-$.
 - a. Quel est alors le sous-produit de la réaction formé à la place de **D** (sans redonner le mécanisme) ?
 - b. Quel est l'avantage d'utiliser ce substrat pour la synthèse de **C** ?

EXERCICE 3 :

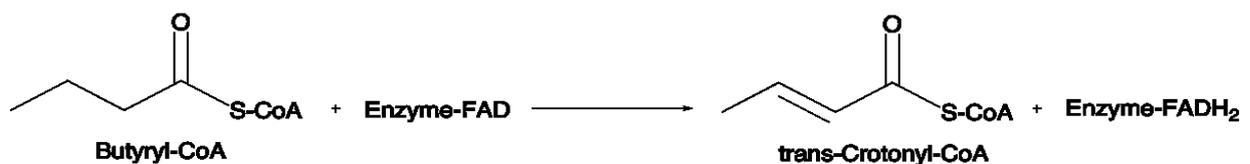
La dialkylglycine décarboxylase (*Dase*) est une enzyme qui catalyse la réaction suivante en présence de phosphate de pyridoxal (PLP) :



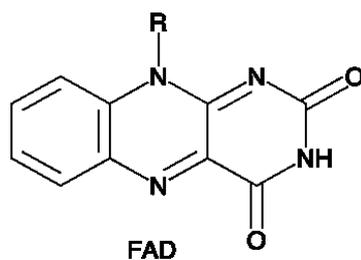
-Proposer un mécanisme vraisemblable pour cette réaction.

EXERCICE 4 : STEREOCHIMIE ET MECANISME DE LA BUTYRYL-COÀ DESHYDROGENASE.

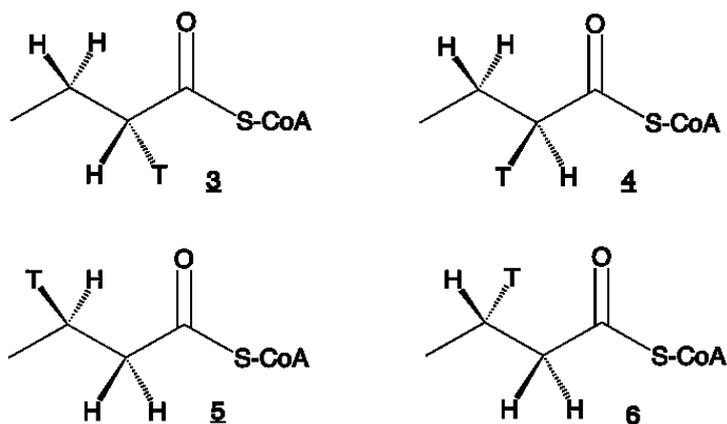
La butyryl-CoA (CoA = coenzyme A) déshydrogénase est une flavoprotéine qui catalyse la transformation du butyryl-CoA en trans-crotonyl-CoA :



Cette enzyme, qui est utilisée en quantité catalytique, contient un cofacteur FAD fortement lié à la protéine. La régénération de l'enzyme oxydée se fait grâce à un accepteur d'électrons présent dans le milieu d'incubation.



II-1. Afin d'étudier la stéréochimie de la réaction, plusieurs substrats tritiés (T = ^3H) ont été préparés :



Chaque substrat est totalement transformé en produit en présence d'enzyme et d'accepteur d'électrons. Après séparation de l'eau du reste des molécules présentes dans le milieu d'incubation, la radioactivité de l'eau est mesurée. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Substrat	Produit formé (%)	Radioactivité retrouvée dans l'eau (%)
<u>3</u>	100	100
<u>4</u>	100	0
<u>5</u>	100	100
<u>6</u>	100	0

II-1a. Quels sont les protons (proR ou proS) perdus lors de l'oxydation ?

II-1b. Quelle est la stéréochimie de l'élimination (syn ou anti) ? Justifier votre réponse par un schéma clair en convention de Cram.

II-2. Le tableau suivant résume les résultats obtenus pour des incubations en présence de l'enzyme mais sans accepteur d'électrons. On rappelle que l'enzyme est utilisée en quantité catalytique.

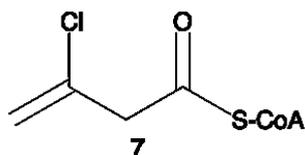
Substrat	Produit formé (%)	Radioactivité retrouvée dans l'eau (%)
<u>3</u>	0	100
<u>5</u>	0	0

De plus, en absence d'enzyme, on observe aucune apparition de radioactivité dans l'eau pour les substrats 3 et 5.

II-2a. Que suggèrent ces expériences ?

II-2b. Proposez un mécanisme ionique pour la réaction d'oxydation du butyryl-CoA. Expliquez pourquoi l'hydrogène en position 3 du butyryl-CoA se retrouve dans l'eau.

II-3. L'analogue 7 suivant est un inhibiteur irréversible de la butyryl-CoA déshydrogénase.



L'étude complète de l'inhibition a montré qu'un résidu glutamique était piégé lors de l'inactivation.

II-3a. Proposez un mécanisme d'inhibition et le rôle probable du résidu glutamique dans la catalyse.

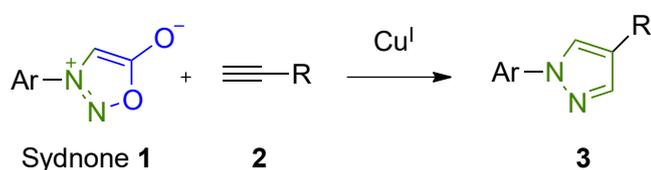
PARTIE B : Activation et étiquetage des protéines (60 MIN)

Cours de A. Alix & B. Vauzeilles

Cet examen s'appuie sur une stratégie et des résultats décrits dans la publication '**Controlled Release of Micelle Payload via Sequential Enzymatic and Bioorthogonal Reactions in Living Systems**', Karine Porte *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 6366-6370 :

Cet article décrit une nouvelle stratégie permettant de libérer de manière contrôlée le chargement moléculaire d'une nanoparticule micellaire.

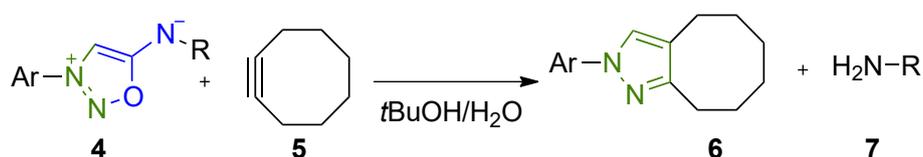
1. Les sydnones sont des composés mésoioniques qui réagissent avec les alcynes terminaux, en présence de Cuivre (I), pour donner un produit de ligation. Ce produit est obtenu par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire suivie d'une réaction de rétro-Diels Alder.



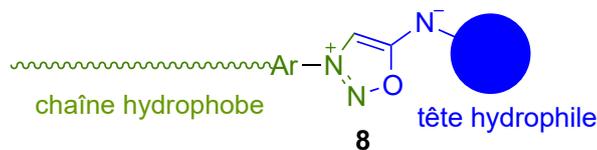
Décrivez une autre réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire impliquant les alcynes terminaux et catalysée par le Cuivre (I). Pour cela, vous donnerez l'équation-bilan et les conditions classiques de cette réaction.

2. Proposez un schéma réactionnel décrivant la réaction entre une sydnone **1** et un alcyne terminal **2**. Représentez l'espèce intermédiaire issue de la première cycloaddition. Quel est le sous-produit libéré ?

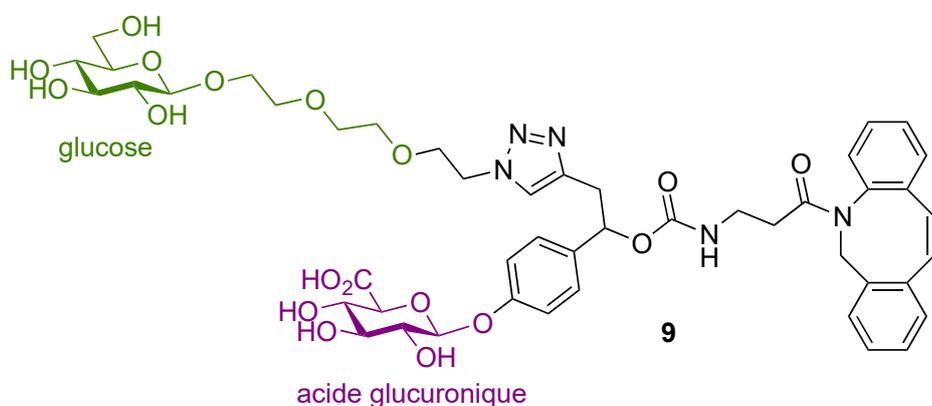
- En l'absence de catalyse, les sydnones **1** réagissent également avec les alcynes non-terminaux, mais cette réaction est lente à température ambiante. Elle est accélérée si on utilise un cyclooctyne **5**. Expliquez les raisons de cette accélération de réaction.
- Lorsque cette dernière réaction est effectuée sur une iminosydnone **4**, le bilan réactionnel peut être représenté ci-dessous. Expliquez cette réaction. Quel est, cette fois, le produit intermédiairement formé et le sous-produit de la réaction qui n'est pas représenté sur le schéma ?



- En plus de permettre la ligation, expliquez comment cette dernière réaction peut également permettre de libérer un composé fluorescent ou un principe actif (réaction de click-and-release).
- Dans l'article étudié, un amphiphile portant une iminosydnone **8** entre les têtes hydrophiles et les chaînes hydrophobes est synthétisé et utilisé pour former des micelles. Quel est l'impact attendu de l'ajout d'un cyclooctyne sur ces micelles ?



- Le composé **9** ci-dessous est trop polaire pour pénétrer dans les cellules. Par contre, une fois activé par une enzyme qui coupe le lien glycosidique de l'acide glucuronique, il libère un petit dérivé de type cyclooctyne qui pénètre dans les cellules et provoque la décomposition des micelles incorporées par ces mêmes cellules. Proposez un mécanisme conduisant à la libération de ce dérivé et indiquez sa structure.



8. Le schéma ci-dessous décrit la stratégie générale de l'article pour libérer un cyclooctyne à proximité de cellules tumorales qui auraient incorporé des micelles chargées d'un fluorophore (F). Décrivez brièvement cette stratégie. En quoi pourrait-elle être légèrement modifiée dans une visée thérapeutique ?

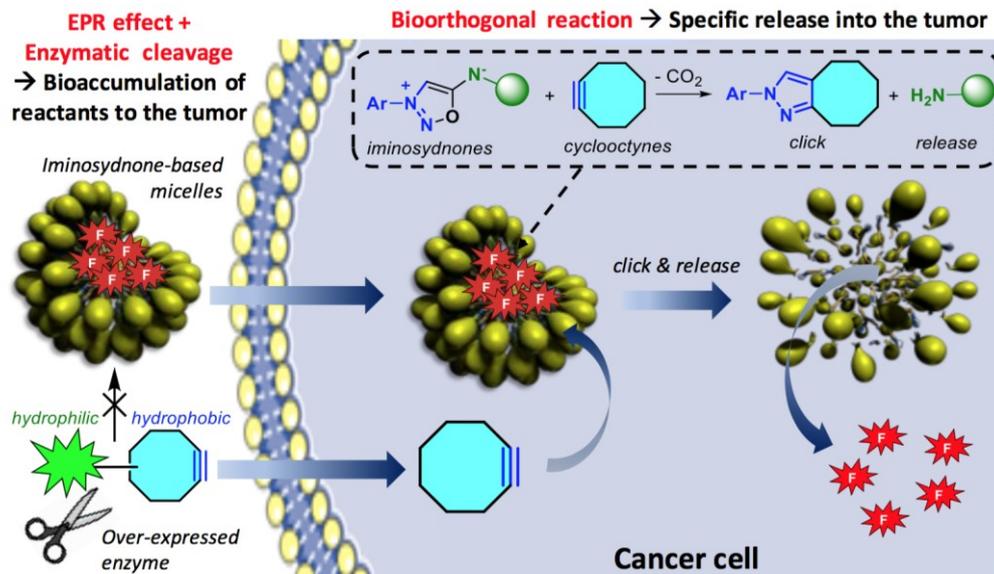
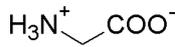


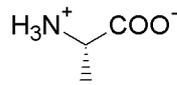
Figure 1. Strategy for double targeted delivery in tumors. Our approach takes advantage of the bioorthogonal click-and-release Strain-Promoted Iminosydnone-Cycloalkyne Cycloaddition (SPICC) reaction to deliver the content of nanoparticles by a chemical stimulus.

ANNEXE :

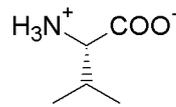
Aminoacides



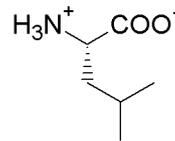
glycine
Gly (G)



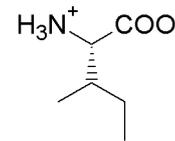
alanine
Ala (A)



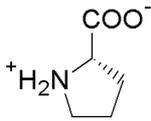
valine
Val (V)



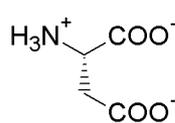
leucine
Leu (L)



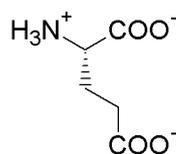
isoleucine
Ile (I)



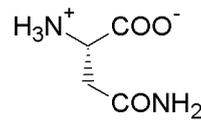
proline
Pro (P)



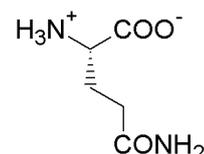
aspartate
Asp (D)



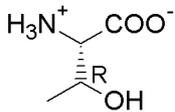
glutamate
Glu (E)



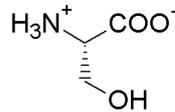
asparagine
Asn (N)



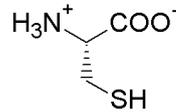
glutamine
Gln (Q)



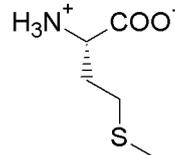
thréonine
Thr (T)



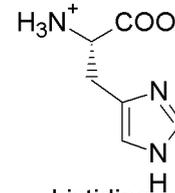
sérine
Ser (S)



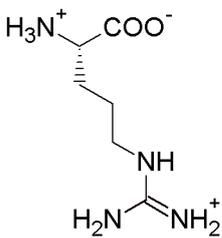
cystéine
Cys (C)



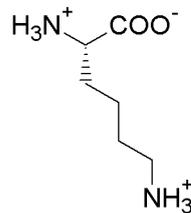
méthionine
Met (M)



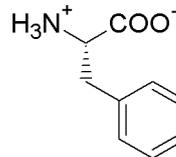
histidine
His (H)



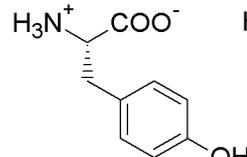
arginine
Arg (R)



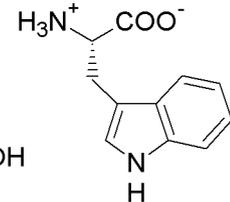
lysine
Lys (K)



phénylalanine
Phe (F)

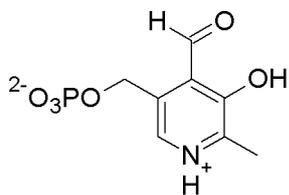


tyrosine
Tyr (Y)

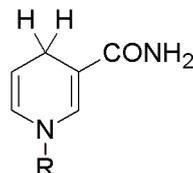


tryptophane
Trp (W)

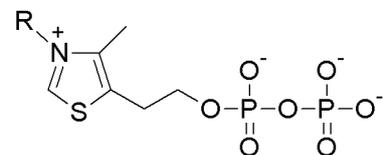
Cofacteurs



phosphate de pyridoxal
PLP



nicotinamide adénine
dinucléotide (phosphate)
NAD(P)H



pyrophosphate de
thiamine