

UE Structures, Mécanismes et Fonctions des Protéines

Coordinateur : Laurent SALMON

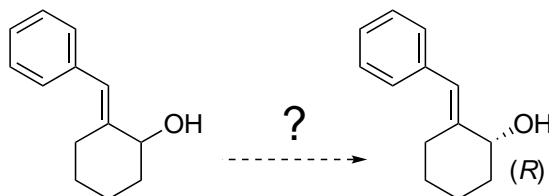
Première session d'examen (17 décembre 2020) – Durée : 3 h

Notes de cours et photocopiés autorisés

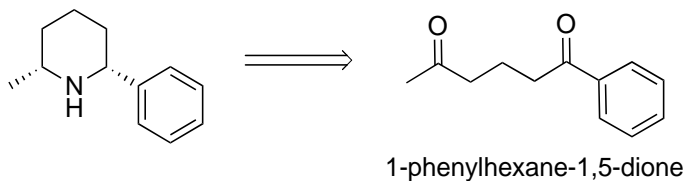
Durée des exercices donnée à titre indicatif

PARTIE A : Biocatalyse (6 POINTS) - Cours de A. Zaparucha

- I. Même si les enzymes sont des catalyseurs très spécifiques, elles peuvent parfois catalyser une réaction différente de leur réaction native, c'est la promiscuité catalytique.
- Sur quoi se fonde cette particularité ?
- II. Les alcools allyliques chiraux sont des intermédiaires dans la synthèse asymétrique de nombreux composés d'intérêt. Disposer de l'un ou l'autre des énantiomères avec une grande pureté optique est donc d'un grand intérêt.
- Proposer une méthode pour obtenir l'énantiomère (*R*) du dérivé alcool allylique ci-dessous à partir du mélange racémique. Détailler votre proposition étape par étape et justifier vos réponses.



- III. NADH et NADPH sont deux cofacteurs très répandus dans le métabolisme. Pour des raisons économiques et pouvoir être utilisables dans des procédés biocatalytiques, ils doivent être recyclés.
- Donner le principe du recyclage en précisant les avantages et les limites et illustrer par une méthode de recyclage du NADH.
- IV. Proposer une voie de synthèse biocatalytique de la piperidine disubstituée ci-dessous à partir de la 1-phenylhexane-1,5-dione. Détailler les étapes en précisant les conditions requises pour chacune des enzymes.

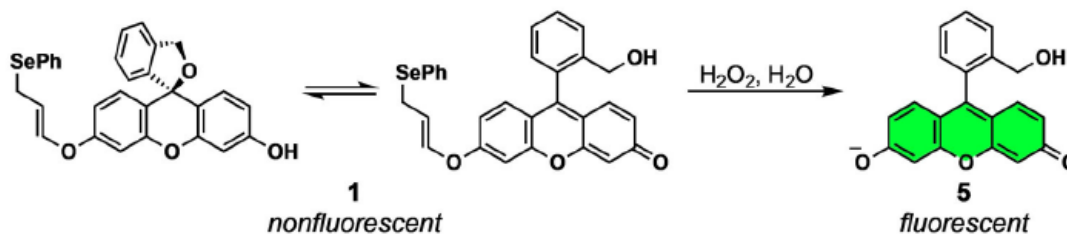


PARTIE B : Stress oxydant (6 POINTS) - Cours de Cécile Sicard et Marie Erard

L'examen proposé utilise les travaux publiés par Pham et al en 2020 dans Angew Chem Int Ed :

Fluorogenic Probe Using a Mislow–Evans Rearrangement for Real-Time Imaging of Hydrogen Peroxide

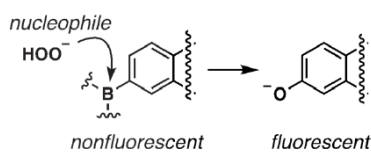
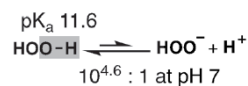
Les auteurs utilisent une sonde avec une amorce au sélénium pour détecter le peroxyde d'hydrogène qui est une alternative aux acides boroniques :



- 1) Donner une définition du stress oxydatif.
- 2) A partir de quelle(s) molécule(s), H_2O_2 peut-il être produit de façon endogène au sein de la cellule ?
- 3) Peut-on considérer H_2O_2 comme une espèce oxydante nocive *in vivo* ? Justifier. Quelles sont les propriétés qu'une espèce oxydante doit posséder pour engendrer des dommages cellulaires ?
- 4) Certaines pathologies sont engendrées par des oxydations de protéines alors que d'autres viennent d'oxydations de l'ADN. La production d' H_2O_2 dans le cytoplasme peut-elle induire ces deux types de pathologies ? Justifier. Même question si HO^\bullet est produit dans le cytoplasme.

Les mécanismes sont présentés sur la figure 1

a Previous work



b This work

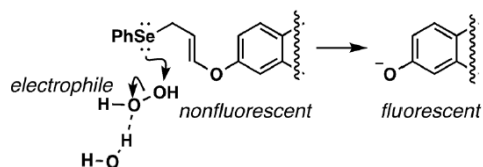


Figure 1. Comparison of a) boronate-based and b) selenium-based probes for hydrogen peroxide.

- 5) Le peroxyde d'hydrogène a un pKa de 11,6. Quelle est la forme acido-basique majoritaire à pH physiologique ? Quel est l'avantage en terme de réactivité de la sonde avec l'amorce au Sélénium par rapport aux amorces Boronates plus classiques ?

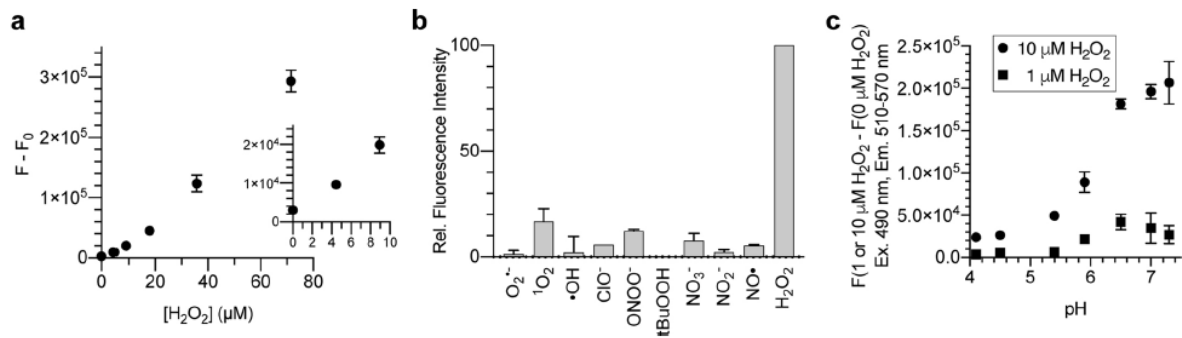


Figure 5. The fluorescence response of **1** (1 μM) at pH 7 (a) with increasing concentrations of H_2O_2 or (b) various ROS. a) 10 μM **1**, 0–71.5 μM H_2O_2 , 14.5:85.5 MeCN/50 mM phosphate pH 7, b) Data were normalized so that the reaction of **1** and H_2O_2 was set to 100. Excess ROS and RNS compared to **1** was used. c) The fluorescence response of **1** (10 μM) with H_2O_2 (0, 1, or 10 μM) at various pHs. 10 μM **1**, 1:9 MeOH/25 mM phosphate in water, 20 min. The y-axis shows (fluorescence intensity with 1 or 10 μM H_2O_2)—(fluorescence intensity with no H_2O_2).

- 6) D’après la Figure 5a pensez-vous que la sonde permette de mesurer quantitativement la quantité de H_2O_2 produit par les cellules ?
- 7) La Figure 5b met en évidence la spécificité de la sonde pour H_2O_2 . Quelle autre méthode permettrait de détecter une des autres espèces citées dans ce test. Expliquez simplement son principe.
- 8) Qu’est ce que les auteurs mettent en évidence Figure 5c ? Quelles sont les conséquences de ce résultat sur les conditions expérimentales à mettre en œuvre pour utiliser la sonde ?

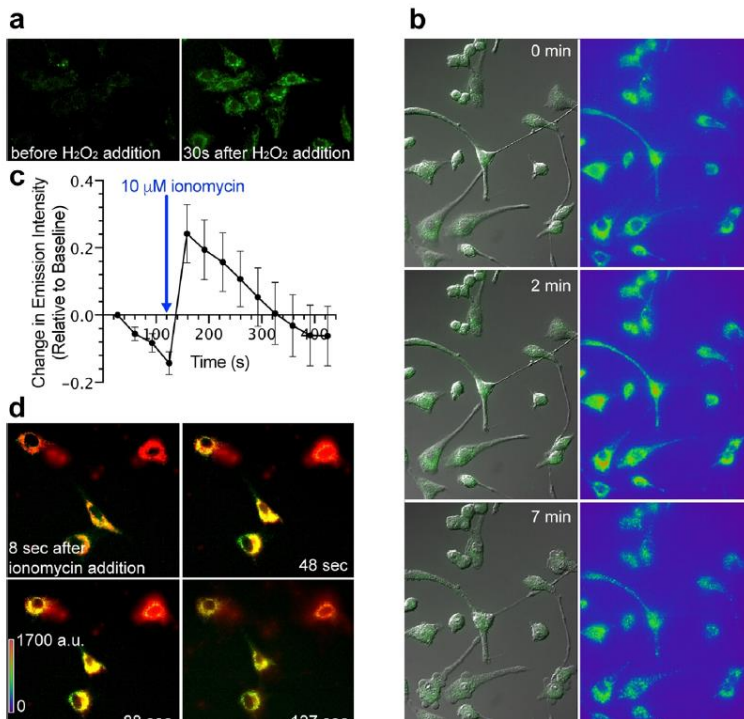


Figure 6. Cellular images using **1**.
 a) HeLa cells treated with **1** showed a significant fluorescence increase after the addition of an extracellular solution of H_2O_2 . Cells were loaded with **1** for 15 min and washed prior to imaging. H_2O_2 was added while imaging.
 b) RAW macrophages loaded with 0.5 μM **1** showed a significant response upon addition of ionomycin, a drug that trigger the production of H_2O_2 . Fluorescence channel (green) and pseudo-color shown. 3 examples of images at 0, 2 and 7 min.
 c) Quantification of the fluorescence intensities recorded in (b)

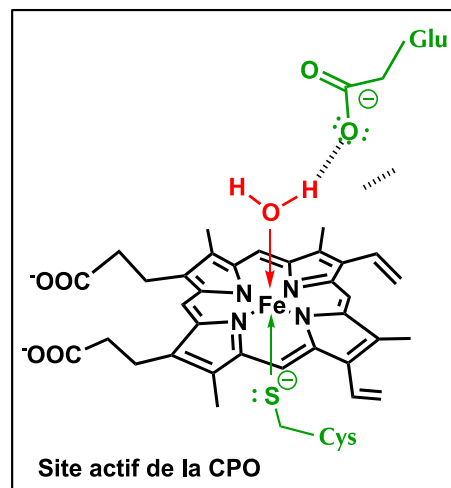
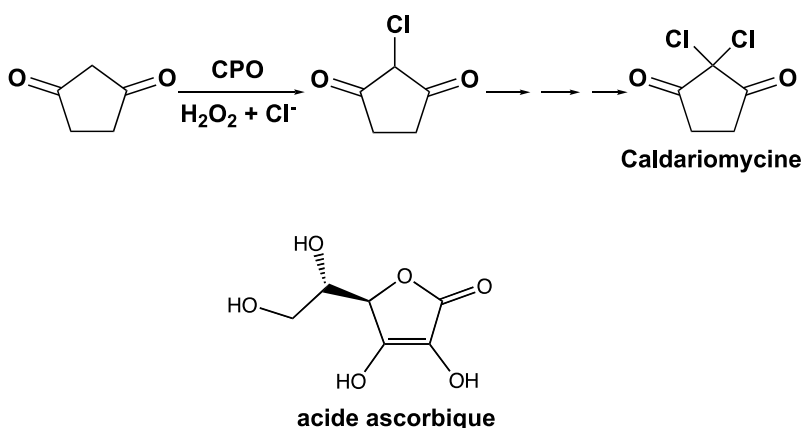
- 9) Qu’est-ce que les images de la Figure 6a permettent de prouver ?
- 10) Les figures 6b et 6c montrent la détection d’une production cellulaire de H_2O_2 déclenchée par l’ajout d’ionomycine. D’après le mode de fonctionnement de la sonde, comment expliquer les variations de la fluorescence cellulaire au cours du temps Figure 6c ?

PARTIE C : Mécanismes enzymatique avec métal redox (8 POINTS) - Cours de Jean-Pierre Mahy et Frédéric Banse

Exercice 1 (J.-P. Mahy, 4 points) :

Dans une publication dans la revue Science en 2010, J. Rittle et M. T. Green ont réussi à caractériser pour la première fois un complexe de type fer-oxo appelé composé I qui intervient dans le cycle catalytique de la chloroperoxydase de *Caldariomyces fumago* (CPO-I).

Cette hémoprotéine dont le ligand axial du fer provenant de la protéine est un cystéinate comme dans les P450s, catalyse la chloration de liaisons C-H activées par Cl^- et H_2O_2 . De telles réactions interviennent dans la biosynthèse de la caldariomycine :



Le spectre Mössbauer (à 4 K) du complexe CPO-I est caractérisé par des valeurs de déplacement isomérique ($\delta = 0,11 \text{ mm/s}$) et d'éclatement quadrupolaire ($\Delta E_q = 0,90 \text{ mm/s}$). Le spectre RPE (à 7 K) du complexe CPO-I montre un signal centré autour de $g = 2$.

- 1- En vous aidant du cours, expliquer comment ces résultats indiquent une structure électronique de ces complexes faisant intervenir une espèce Fe(IV)=O ($S=1$) couplée de façon antiferromagnétique avec un radical ($S = 1/2$) dérivant des ligands du fer.
Proposer une structure électronique possible pour ces complexes.

La CPO catalyse aussi bien l'oxydation de substrats classiques des peroxydases, comme l'acide ascorbique, que des réactions de type P450, comme l'époxydation d'alcènes et l'hydroxylation de liaisons C-H benzyliques par H_2O_2 , toutes ces réactions faisant intervenir le complexe CPO-I.

- 2- Proposer un mécanisme détaillé pour la formation de l'intermédiaire CPO-I par réaction de la CPO avec H_2O_2 , sachant que, dans la CPO native, une molécule d' H_2O occupe la sixième position de coordination du fer et que cette molécule d' H_2O forme une liaison hydrogène avec un glutamate du site actif.
- 3- Proposer un mécanisme pour les diverses réactions d'oxydation utilisant H_2O_2 comme oxydant catalysées par la CPO qui sont indiquées ci-dessous :
 - Oxydation de l'acide ascorbique,
 - Epoxydation,
 - Hydroxylation de liaisons CH benzyliques.
- 4- Proposer un mécanisme pour la chloration de la 1,3-cyclopentanedione intermédiaire dans la synthèse de la caldariomycine.

Exercice 2 (F. Banse, 4 points) : **Oxygénases non hémiques à réductase ou cofacteur redox.**

1. Le potentiel redox standard du couple O_2/H_2O est $E^\circ = 1,23 \text{ V}$ (vs NHE). Pour quelle raison le dioxygène n'oxyde-t-il pas spontanément les molécules organiques stables (alcanes par exemple) ?
2. Les mono- et dioxygénases utilisent O_2 pour oxyder sélectivement leur substrat en conditions physiologiques. Indiquez quelle stratégie générale elles suivent pour y parvenir.
3. La figure 1 représente le cycle catalytique de deux enzymes dinucléaires à fer, la méthane monooxygénase (MMO) et l'aldehyde deformylating oxygenase (ADO), ainsi que leur équation-bilan.

Indiquez la nature des espèces P et Q de la MMO, et des espèces B, C, D, E et F dans l'ADO : *il est demandé de préciser la nature des ligands des ions Fe issus de O_2* (atomes représentés en rouge). Quelles différences importantes entre ces deux enzymes pouvez vous relever après examen de la figure ?

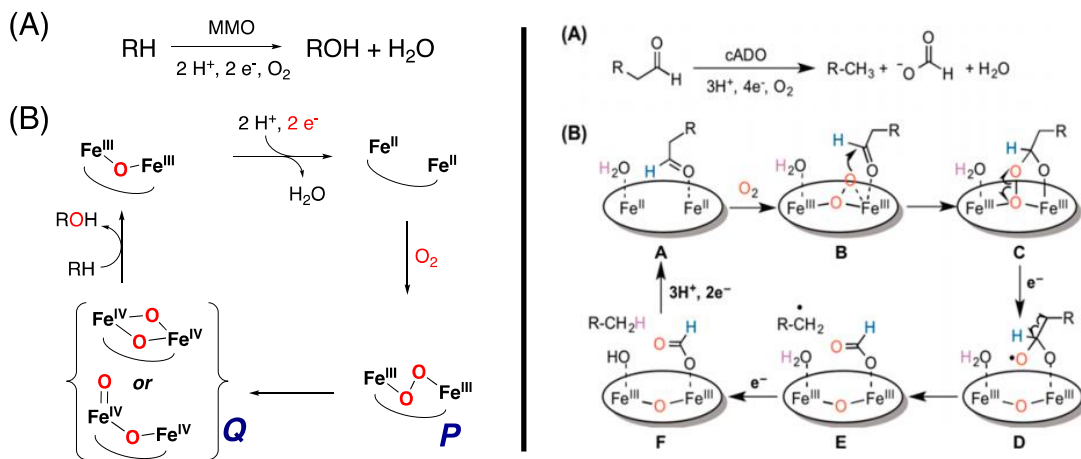
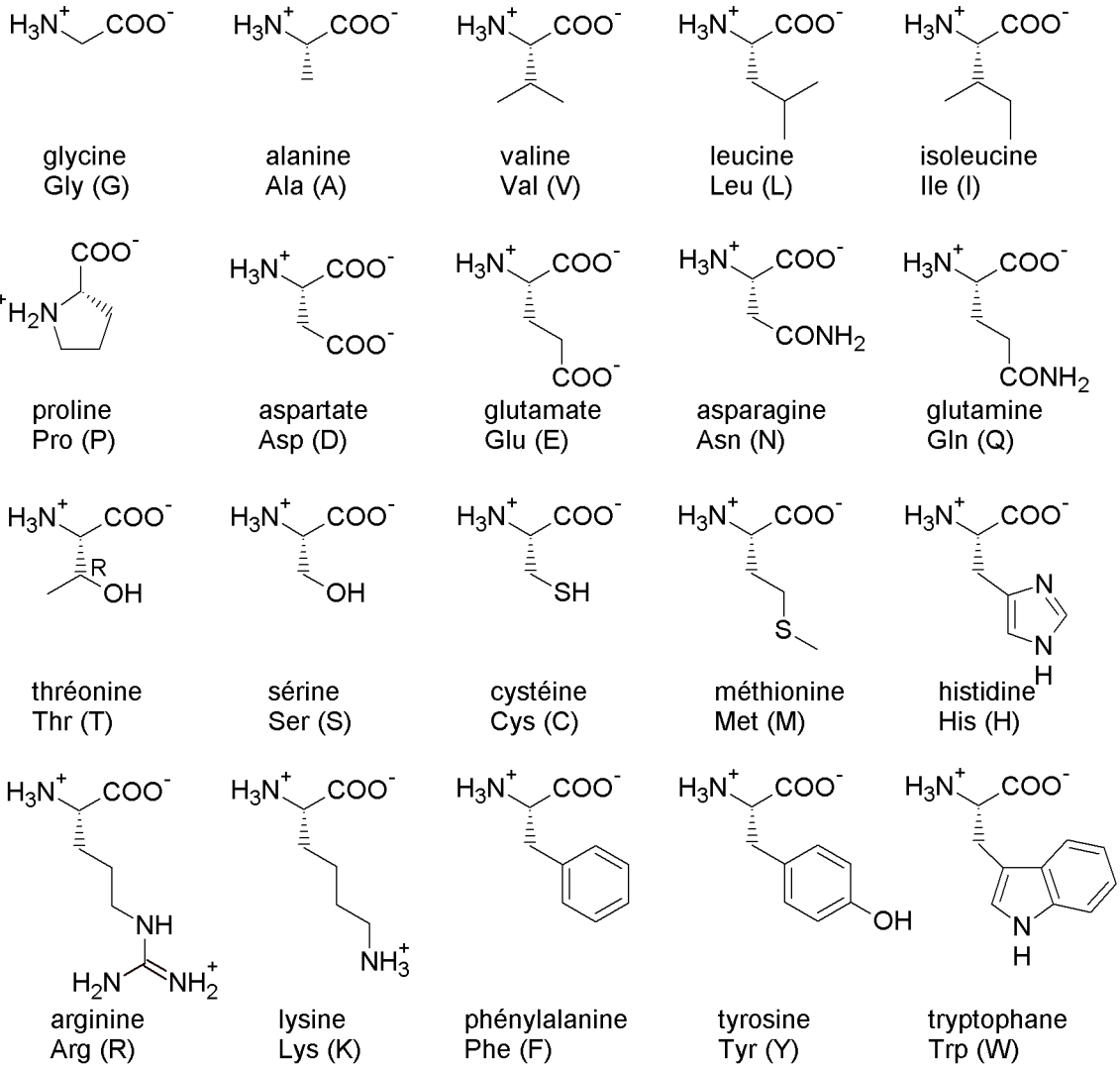


Figure 1. équation-bilan (A) et cycle catalytique (B) de la MMO (à gauche, RH désigne un alcane) et de l'ADO (à droite).

4. Détaillez le mécanisme d'oxydation du substrat RH par l'intermédiaire Q de la MMO.

ANNEXE :

Aminoacides



Cofacteurs

