

UE Structures, Mécanismes et Fonctions des Protéines

Coordinateur : Laurent SALMON

Première session d'examen (14 janvier 2022) – Durée : 3 h

Notes de cours et photocopiés autorisés

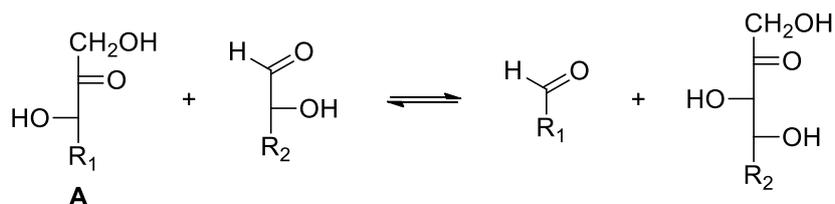
Durée des exercices donnée à titre indicatif

PARTIE A : Mécanismes enzymatiques I sans cofacteurs redox et Inhibition

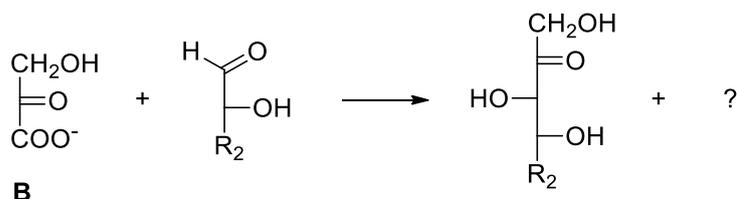
Enzymatique (10 POINTS / 90 MIN) – Cours de L. Salmon & J.-P. Mahy

EXERCICE I (L. Salmon) :

La trans-cétolase (TK), une enzyme à thiamine pyrophosphate, catalyse *in vivo* la réaction suivante :



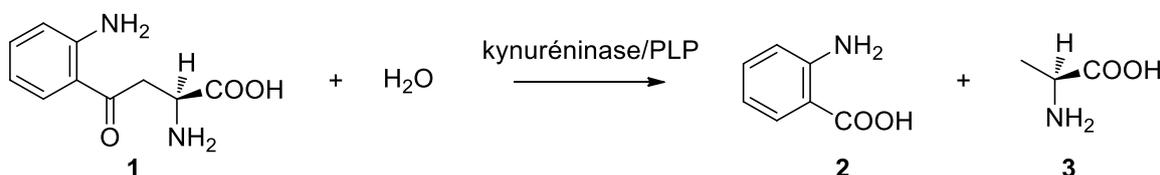
1. L'équilibre peut être complètement déplacé vers la droite par l'utilisation à la place de **A** de l'hydroxypyruvate **B**. Pourquoi ? Ecrivez le mécanisme en faisant apparaître le rôle du co-enzyme.



2. On cherche à produire des mutants de la TK capables de transférer un groupement formyle. Quel substrat donneur **C** utilisera-t-on alors à la place de l'hydroxypyruvate ? Quels types de produits pourra-t-on préparer ?
3. La TK peut tolérer comme aldéhyde accepteur (avec des vitesses de réaction réduites de 90%) des composés aussi simples que l'acétaldéhyde $\text{CH}_3\text{-CHO}$. Quelle face *si* ou *ré* de l'acétaldéhyde est attaquée ? Quel produit obtiendra-t-on, et avec quelle stéréochimie, par condensation de **B** sur l'acétaldéhyde ?
4. L'hydroxypyruvate précédent peut être préparé à partir de L-sérine par une enzyme utilisant le pyridoxal-phosphate comme co-enzyme. Par quel mécanisme ?
5. Le pyridoxal ne peut être présent en quantité catalytique que si on utilise un autre co-substrat. De quel type ?

EXERCICE II (*L. Salmon*) :

On se propose de déterminer le mécanisme de l'hydrolyse de la L-kynurénine **1**, catalysée par la kynuréninase en présence de phosphate de pyridoxal (PLP), en acide 2-amino-benzoïque **2** et L-alanine **3** :

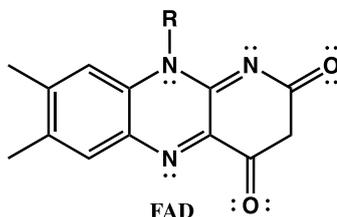


On dispose des informations suivantes :

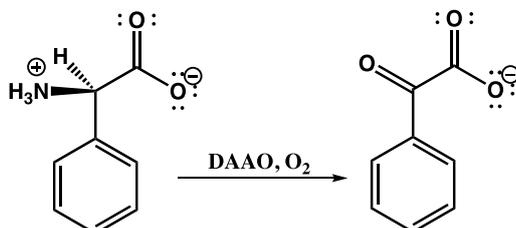
- Les produits **4(R)** et **4(S)** de réduction par $NaBH_4$ de la (L)-kynurénine sont tous deux inhibiteurs compétitifs.
 - Ecrire ces deux produits.
 - La constante d'inhibition K_i du produit **4(R)** est de 1,4 mM, alors que celle du produit **4(S)** est de 0,3 mM. Quel est l'inhibiteur qui a la plus grande affinité pour le site actif de l'enzyme ?
- On a d'autre part pu mettre en évidence que le produit **4(R)** (mais pas le **4(S)**) pouvait subir une rétro-aldolisation en présence de kynuréninase et de phosphate de pyridoxal, conduisant à la L-alanine **3** et au 2-aminobenzaldéhyde **5**, le V_{max} de cette réaction étant toutefois 10 fois plus petit que celui de l'hydrolyse enzymatique de la L-kynurénine.
 - Ecrire le mécanisme général de la rétro-aldolisation.
 - Quel est le K_m du substrat **4(R)** ?
- Sachant que la première étape de l'hydrolyse enzymatique de la L-kynurénine **1** est une attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur le groupe carbonyle, proposer un mécanisme pour cette réaction.

EXERCICE III – Les D-amino-acide oxydases (*J.-P. Mahy*) :

La D-amino-acide oxydase (**DAAO**, E.C. 1.4.3.3) est une enzyme ubiquitaire chez les eucaryotes de poids moléculaire 45,5 kDa. Elle est responsable, dans les cellules, de la désamination des D-amino-acides pour conduire aux acides α -cétoniques correspondants. Elle appartient à la classe des oxydases qui utilisent comme cofacteur redox le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) :



I- Pour étudier l'activité de la **DAAO**, la transformation de la D-phénylglycine **1** en acide formylbenzoïque **2** a été étudiée par spectrophotométrie UV-visible.



- I-1a.** Ecrivez l'équation stoechiométrique correspondant à cette réaction.
I-1b. Quels sont les produits secondaires formés ?
I-1c. Comment FAD est-il régénéré ?

I-2a. Décrivez le mécanisme de fonctionnement des **DAAO** tel qu'il a été proposé en cours.

I-2b. Quel intermédiaire clé est formé ?

I-2c. Expliquez succinctement les faits expérimentaux en faveur de ce mécanisme.

II- Des D-amino-acide oxydases ont également été trouvées chez des microorganismes tels que *Trigonopsis variabilis* (**TvDAAO**). Ces enzymes ont ainsi pu être obtenues en plus grosses quantités, ce qui a facilité l'étude de leur mécanisme d'action et leur utilisation en bioconversions.

Des études cinétiques ont été effectuées sur ces enzymes, avec des dérivés de la D-phénylglycine **1** provenant, soit de la deutériation du H porté par le carbone α de l'acide (D- α - ^2H -phénylglycine), soit de la substitution en para du noyau phényle par divers groupes (tableau 1).

TABLEAU 1

Apparent steady state kinetic parameters for the oxidation of p-substituted phenylglycines

Measurements at 25 °C, polarographic assay using 90 mM Tris/HCl buffer, pH 8.3; $[\text{O}_2] = 0.253 \text{ mM}$.

Numbers in italics are the isotope effects, *i.e.* the ratio of the values for the $[\alpha\text{-}^1\text{H}]$ - and $[\alpha\text{-}^2\text{H}]$ - forms of phenylglycine.

para-Substituent	V_{\max}	$K_m(\text{A})$	V_{\max}/K_m
	<i>s⁻¹</i>	<i>mM</i>	<i>mM/s</i>
$[\alpha\text{-}^1\text{H}]$ -	11.8	0.5	23.6
$[\alpha\text{-}^2\text{H}]$ -	1.7	0.4	4.2
Isotope effect ($^1\text{H}/^2\text{H}$)	6.9	1.2	5.7
Cl-	1.4	0.17	8.2
Br-	0.9	0.05	17.0
Me-	4.3	0.2	21.5
MeO-	3.2	0.15	21.3
HO-	13.7	0.6	22.8
NO ₂ -	2.7	0.09	31.8

II-a. Observe-t-on un effet isotopique sur K_M ? expliquez.

II-b. Sur quel paramètre porte l'effet isotopique ? Cet effet peut-il être compatible avec l'intermédiaire proposé dans le mécanisme de la question II ?

II-c. Les variations de V_{\max} en fonction des effets électroniques des substituants des noyaux phényles sont-elles compatibles avec la formation de cet intermédiaire ?

III. En fait, dans le cas de la **TvDAAO**, on pense que le mécanisme passe plutôt par un transfert d'hydrure sur le FAD, avec formation d'un intermédiaire iminium.

III-a. Expliquez pourquoi les faits expérimentaux ci-dessus sont en accord avec un tel mécanisme.

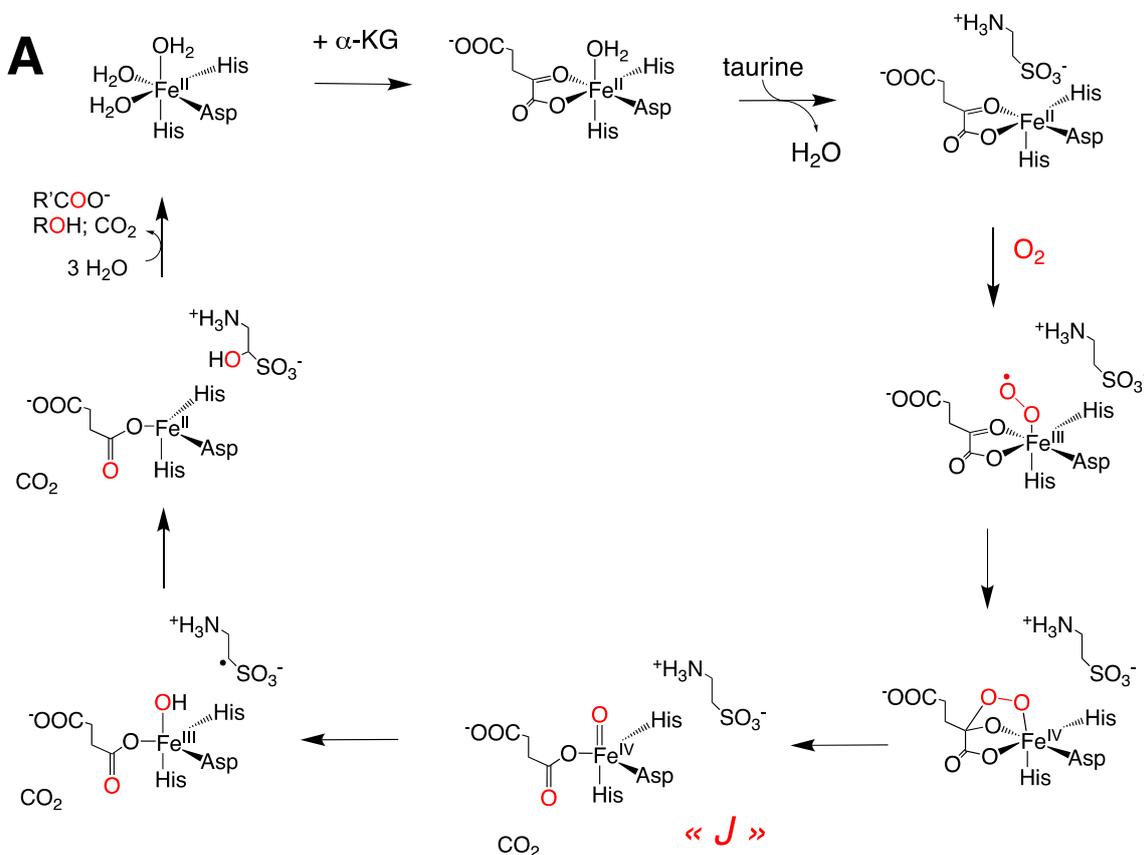
III-b. Ecrivez le mécanisme correspondant

PARTIE B : Mécanismes enzymatique avec métal redox (5 POINTS / 45 MIN) - Cours de F. Banse et J.-P. Mahy

EXERCICE I – Oxygénases non hémiques à réductase ou cofacteur redox (F. Banse) :

Les enzymes α -ketoglutarate (α -KG) dépendantes forment la plus large classe d'enzymes non hémiques impliquées dans l'activation de O_2 . Elles catalysent une grande variété de transformations : hydroxylations, époxydation, désaturation, etc. Elles sont aussi capables de catalyser des halogénations.

1. Le site actif de la Taurine Dioxygénase (TauD) est schématisé Figure 1A. Comment est qualifié le type de site de coordination, commun à de nombreuses enzymes non hémiques, représenté par les deux Histidines et l'Aspartate ?
2. Ecrivez le bilan de ce cycle.
3. Quel est le rôle joué par le cofacteur α -KG ? Pourquoi est-il indispensable ?
4. La Figure 1B présente le cycle catalytique de la SyrB2, une halogénase impliquée dans la biosynthèse de la syringomycine E, un anti-fongique naturel. Quelle différence(s) importante(s) avec le cycle de la TauD observez-vous ?
5. L'étude de la décroissance de l'intermédiaire **K** de la SyrB2 en présence de substrat normal (R-CH₃) ou deutéré (R-CD₃) a révélé un effet cinétique isotopique (KIE) de l'ordre de 20. A la lumière de ces informations, détaillez les étapes du mécanisme de chloration du substrat par l'intermédiaire **K** en justifiant quelle est l'étape cinétiquement déterminante.



conditions plus éco-compatibles en utilisant une hémoprotéine, dans un tampon phosphate à pH = 7, à température ambiante. Pour cela, le dérivé **1** est incubé dans ces conditions :

- soit avec un cytochrome P450 en présence de NADPH, de réductase et de O₂,
- soit en présence de peroxydase de Raifort et de peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

- I. a- Quel intermédiaire réactionnel commun aux deux enzymes est formé lors de ces réaction ?
b- Indiquez le mécanisme complet de formation de cet intermédiaire dans les deux cas.
- II. En vous inspirant du mécanisme des réactions des dérivés phénoliques avec respectivement Cyt.P450/NADPH/O₂ et HRP/H₂O₂, indiquez le mécanisme de la réaction du naphтол **1** avec cet intermédiaire dans les deux cas.
- III. a- Avec laquelle des deux hémoprotéines obtiendrez-vous le produit de couplage désiré ?
b- Expliquez en raisonnant sur l'influence de la protéine qui entoure l'hème sur la réactivité de l'intermédiaire réactionnel avec le naphтол.
c- Est-ce que cette réaction vous semble satisfaisante pour obtenir sélectivement le produit de couplage désiré ?

PARTIE C : Activation et étiquetage des protéines (5 POINTS / 45 MIN) – Cours de A. Alix et B. Vauzeilles

Cet examen s'appuie sur une stratégie et des résultats décrits dans la publication 'Triple Orthogonal Labeling of Glycans by Applying Photoclick Chemistry', Verena F. Schart *et al.*, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 166-171.

Cet article décrit une nouvelle stratégie de marquage orthogonale de glycanes par réaction photoclick. Pour cela, divers dérivés métabolisables de mannosamine ont été utilisés pour modifier des acides sialiques présents à la surface cellulaire :

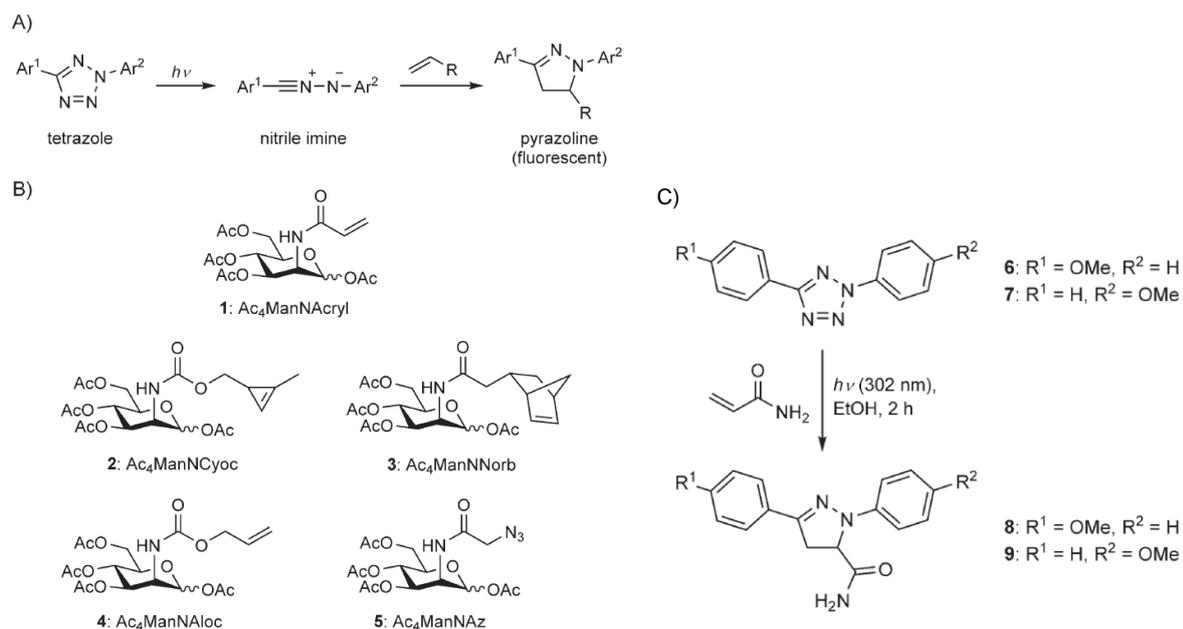
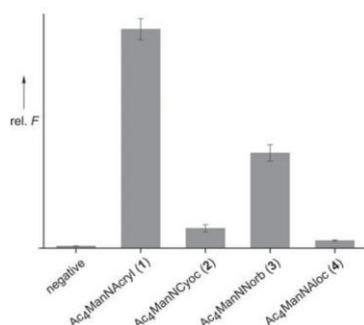


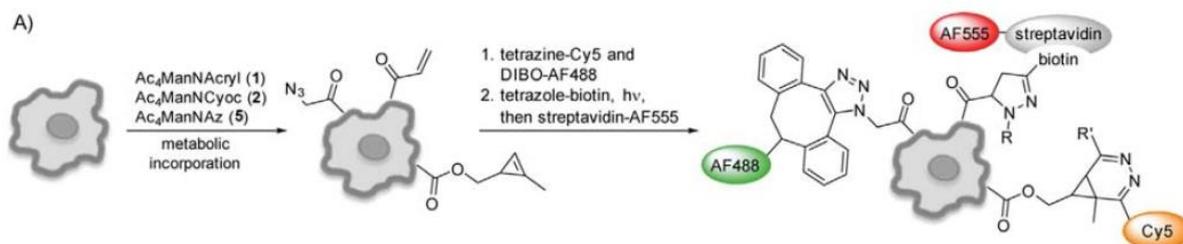
Figure 1. A) Réaction de photoclick utilisant des tétrazoles ; B) dérivés métabolisables de mannosamine ; C) réaction photoclick précédemment rapporté dans la littérature utilisant des tétrazoles synthétisables rapidement et biocompatibles. Les pyrazolines **8** et **9** peuvent être excités à 360 nm et fluorescent respectivement à 445 et 485 nm.

1. Quel est le type de réaction mis en jeu lors de la photoactivation du tétrazole en nitrile imine puis lors de la réaction de ce dernier avec un alcène ? De plus, en utilisant une notation entre parenthèses, vous préciserez et caractériserez ces 2 réactions.
2. Ecrire une forme mésomère du nitrile imine et une forme mésomère de l'acrylamide (composé sur la flèche en C)) permettant d'expliquer la régiosélectivité observée lors de la réaction de photoclick décrite en C). En déduire quel composé réagit avec sa HOMO et quel composé réagit avec sa LUMO.



Les différentes mannosamines synthétisées ont d'abord été mises en réaction avec le tétrazole **6** pour sélectionner le meilleur rapporteur de marquage cellulaire. Pour cela, une solution contenant 1 mM de tétrazole **6** et 100 μ M de chaque sucre modifié dans l'éthanol a été irradiée 1min à 302 nm. Un contrôle négatif a été réalisé en utilisant aucun dérivé sucre. La fluorescence a été mesurée à 445 nm après excitation à 360 nm et correspond à une moyenne de 4 expériences.

3. Pourquoi le composé **5** n'a-t-il pas été testé dans cette expérience ? D'après les résultats reportés dans le graphique, quel est le meilleur rapporteur de marquage de glycanes ?
4. En vous appuyant sur le mécanisme de la réaction et votre réponse à la question 2, expliquez ce résultat ? Est-ce cohérent avec la réactivité connue des composés de type acrylamide ?
5. A partir de ces résultats, les auteurs ont mis au point un marquage triple décrit ci-dessous :



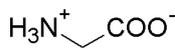
Quelles sont les trois réactions bioorthogonales mises en jeu dans ce marquage ? Donner les couples réactionnels mis en jeu dans ces 3 réactions.

6. Quel est la différence électronique entre la réaction faisant intervenir la tétrazine-Cy5 et la réaction faisant intervenir le tétrazole biotinylé ? En déduire la sélectivité de réaction observée pour la tétrazine-Cy5.
7. A votre avis, pourquoi les auteurs ont-ils utilisés une séquence de marquage tétrazole biotinylé/streptavidine fluorescente AF555 plutôt que d'utiliser directement la fluorescence de la pyrazoline formée ?

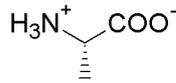
Proposez des expériences à mettre en place pour vérifier que toutes les réactions de marquage sont bien orthogonales et, en utilisant un tableau, les résultats attendus. Quelles expériences de contrôle doivent également être réalisées pour s'assurer de la fiabilité des résultats de marquage ?

ANNEXES :

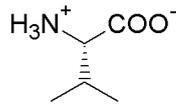
Aminoacides



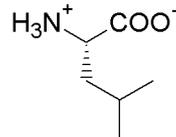
glycine
Gly (G)



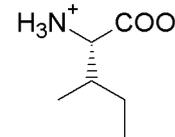
alanine
Ala (A)



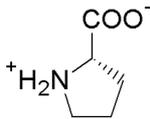
valine
Val (V)



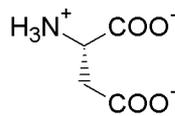
leucine
Leu (L)



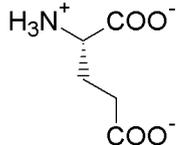
isoleucine
Ile (I)



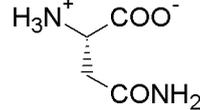
proline
Pro (P)



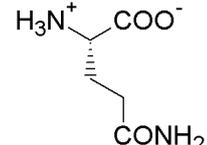
aspartate
Asp (D)



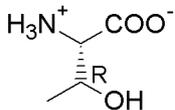
glutamate
Glu (E)



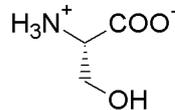
asparagine
Asn (N)



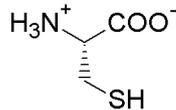
glutamine
Gln (Q)



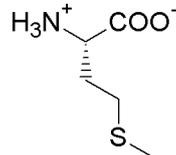
thréonine
Thr (T)



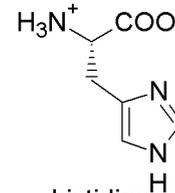
sérine
Ser (S)



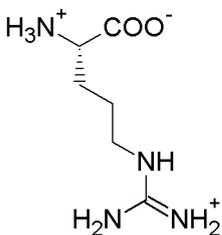
cystéine
Cys (C)



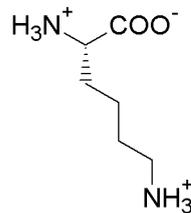
méthionine
Met (M)



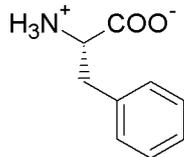
histidine
His (H)



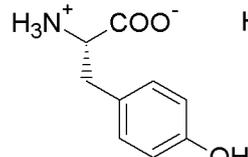
arginine
Arg (R)



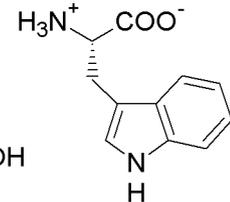
lysine
Lys (K)



phénylalanine
Phe (F)

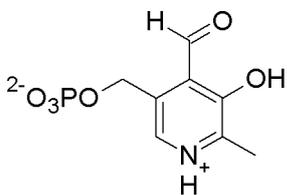


tyrosine
Tyr (Y)

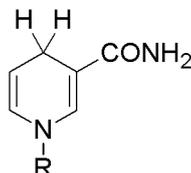


tryptophane
Trp (W)

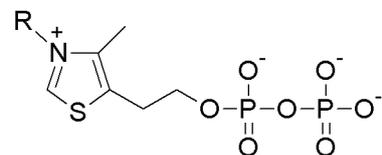
Cofacteurs



phosphate de pyridoxal
PLP



nicotinamide adénine
dinucléotide (phosphate)
NAD(P)H



pyrophosphate de
thiamine

Equation de Michaelis-Menten

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