

Master 2 de Chimie Organique  
Master 2 Ingénierie et Chimie des BioMolécules

**Structures, Mécanismes et Fonctions des Protéines (UE D5CI538/D5BS049)**

Coordinateur : Laurent SALMON

Première session d'examen (11 janvier 2023) – Durée : 3 h

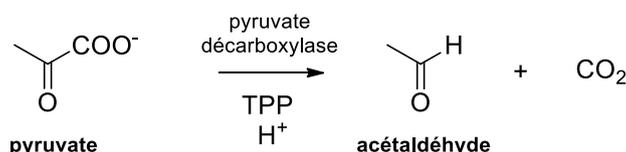
Notes de cours et photocopiés autorisés

Durée des exercices donnée à titre indicatif

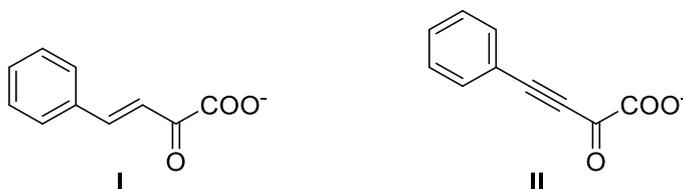
**PARTIE A : Mécanismes enzymatiques I (sans métal redox) et Inhibition Enzymatique (11 POINTS / 1H40) – Cours de L. Salmon & J.-P. Mahy**

**EXERCICE 1 (35 MIN) – ENZYMES A TPP**

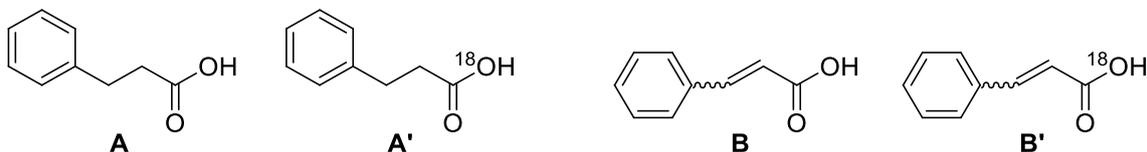
La pyruvate décarboxylase est une enzyme à thiamine pyrophosphate (TPP) catalysant la transformation du pyruvate en acétaldéhyde :



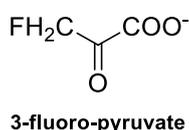
Les composés **I** et **II** suivants sont également substrats de cette enzyme :



- 2 1. Quels seraient les produits normalement attendus de la réaction catalysée par la pyruvate decarboxylase sur **I** et **II** ?
- 2 2. Détaillez le mécanisme de cette réaction sur le composé **I**.
- 3 3. La réaction conduit en fait, à partir de **I**, à l'acide dihydrocinnamique **A**, et à partir de **II**, à un mélange *E/Z* d'acides cinnamiques **B**. Conduite dans l'eau marquée à l'oxygène 18 ( $\text{H}^{18}\text{OH}$ ), la réaction donne les acides carboxyliques marqués respectifs **A'** et **B'**. Proposez un mécanisme pour ces deux transformations « anormales ».

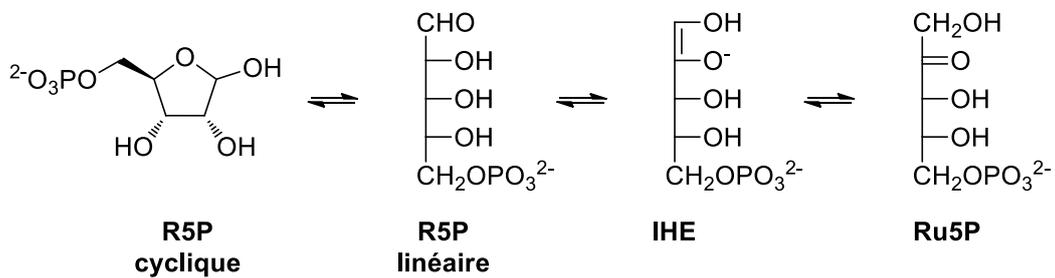


- 2 4. Le 3-fluoropyruvate ci-dessous est connu pour être un « substrat suicide » de la pyruvate décarboxylase. L'inactivation de l'enzyme est due à la réaction d'un groupe nucléophile de l'enzyme sur un intermédiaire réactionnel de type accepteur de Michael. Proposez un mécanisme pour cette inactivation.



**EXERCICE 2 (15 MIN) – ALDOSE-CETOSE ISOMERASES**

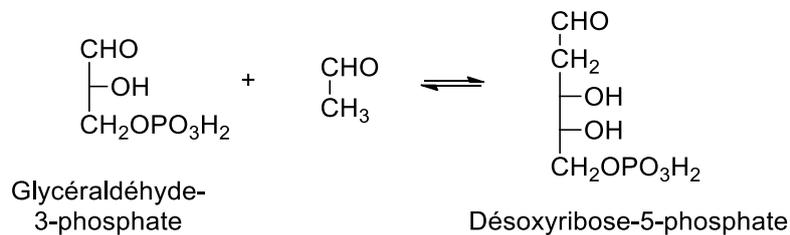
La phosphoribose isomérase (RPI) catalyse l'isomérisation réversible du D-ribose 5-phosphate (R5P) en D-ribulose 5-phosphate (Ru5PP) selon le mécanisme rapporté ci-dessous :



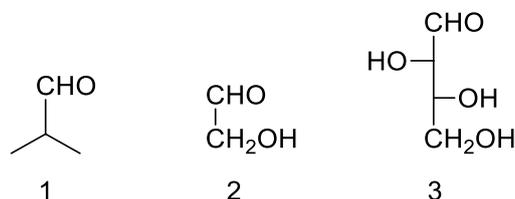
1. Pour chaque cas ci-dessous, proposer une structure d'un inhibiteur du type suivant :
  - a. analogue du R5P cyclique,
  - b. analogue du R5P linéaire,
  - c. analogue de l'intermédiaire de haute énergie (IHE).
2. Donner le mécanisme de l'étape d'isomérisation du R5P linéaire en Ru5P impliquant un résidu glutamate du site actif.

**EXERCICE 3 (20 MIN) – ALDOLASES**

La désoxyribose-5-phosphate aldolase catalyse *in vivo* la réaction suivante :



1. Quels produits obtiendra-t-on en incubant l'enzyme en présence d'acétaldéhyde et de chacun des composés suivants (incluant la stéréochimie du produit) ?



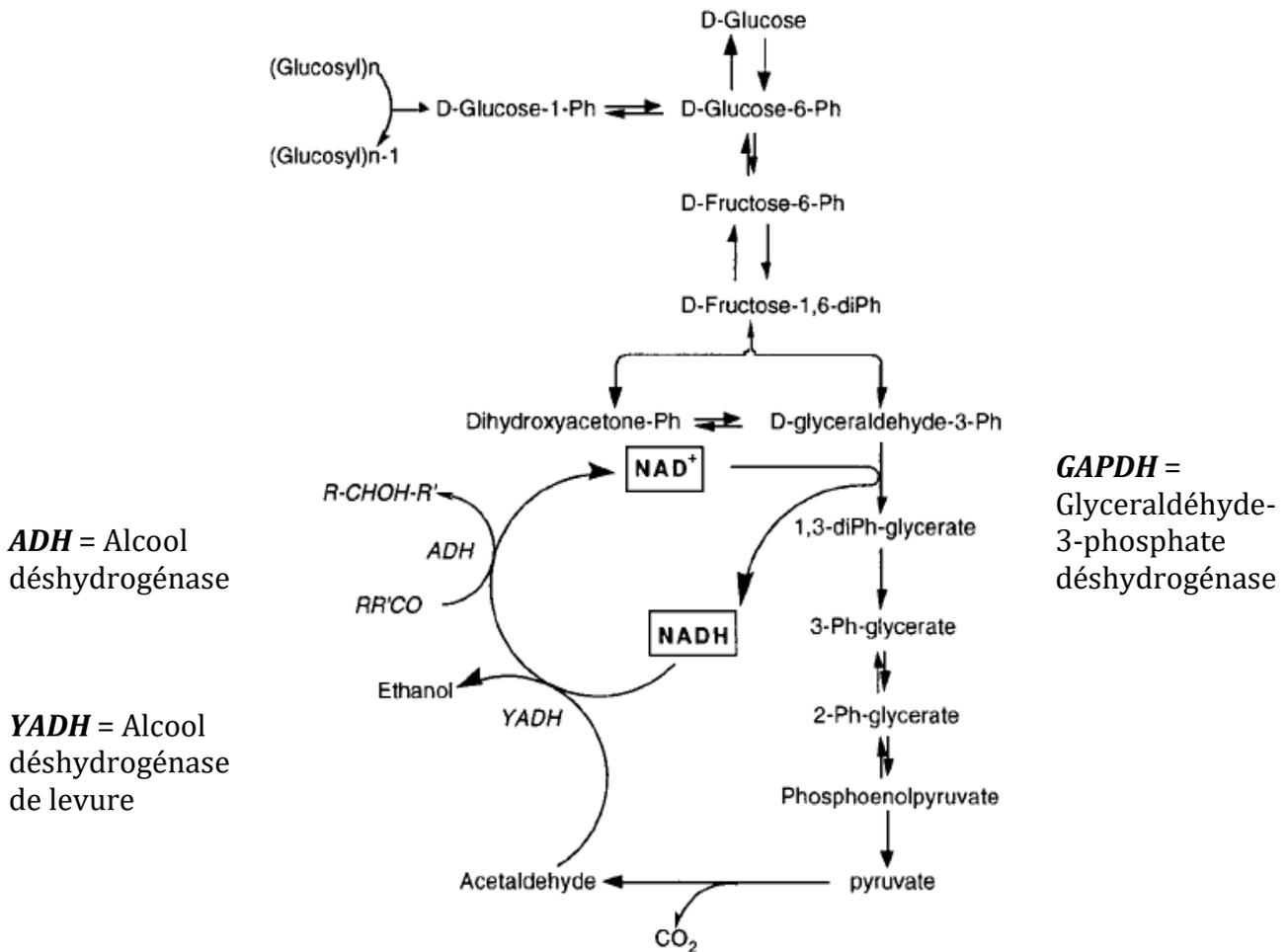
2. Incubée en présence du seul acétaldéhyde, l'enzyme conduit à la formation d'un composé C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>. Quel est ce produit et quelle est sa stéréochimie ?
3. L'enzyme est une aldolase de classe I, inactivée lorsqu'on la fait fonctionner en présence de cyanoborohydrure de sodium (NaBH<sub>3</sub>CN). Proposez un mécanisme catalytique plausible pour la formation du désoxyribose-5-phosphate.

**EXERCICE 4 (30 MIN) – OXYDO-REDUCTASES**

**I. Les oxydo-réductases** comme les déshydrogénases NAD(P)-dépendantes sont couramment utilisées en synthèse organique pour la création “de novo” de centres asymétriques.

**I-1.** Ecrivez la réaction d’oxydo-réduction catalysée par une alcool déshydrogénase dans le sens de la création d’un nouveau centre asymétrique.

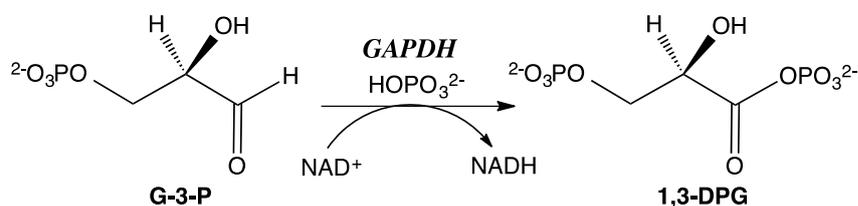
**II.** Une des principales limitations à l’utilisation des déshydrogénases purifiées en synthèse organique est la consommation stoechiométrique du NAD(P)H extrêmement coûteux. Une des solutions pour pallier cet inconvénient consiste à utiliser **la levure de boulanger** qui réalise la fermentation alcoolique du glucose selon le schéma ci-dessous :



**II-1.** A votre avis quels sont les avantages présentés par la levure de boulanger ?

**II-2.** A partir du schéma ci-dessus, expliquez pourquoi la levure de boulanger est capable de réaliser la réduction d’une large gamme de composés carbonylés ?

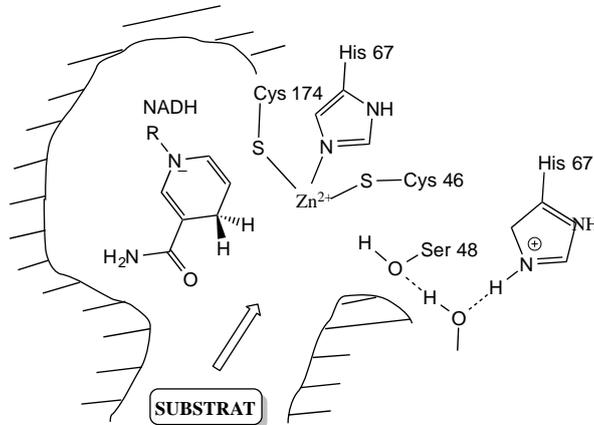
**II-3.** La glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*) catalyse, en présence de NAD<sup>+</sup>, la réaction de transformation du D-glyceraldéhyde-3-phosphate (G-3-P) en 1,3-diphosphoglycérate (1,3-DPG) :



**II-31.** De quel type de réaction s'agit-il ?

**II-32.** Pourquoi la **GAPDH** joue-t-elle un rôle primordial pour l'utilisation de la levure de boulanger en synthèse ?

**III.** La structure tridimensionnelle de l'**alcool déshydrogénase de levure** est représentée ci-dessous :



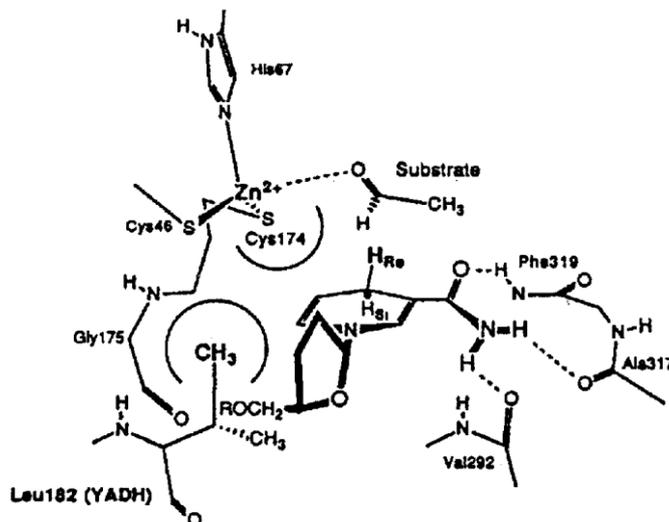
Le substrat  $RR'C=O$  et le cofacteur NADH viennent se positionner au site actif hydrophobe de l'enzyme au centre duquel se trouve également un ion  $Zn^{2+}$  relié à 2 cystéinates (Cys 174 et Cys 46) et une histidine (His 67). Une sérine (Ser 48) joue le rôle de donneur terminal de proton assisté par un histidinium ( $HisH^+$  67).

**III-1.** Au repos, une molécule d'eau est coordonnée à l'ion  $Zn^{2+}$  et engage une liaison H avec Ser 48. Expliquez pourquoi elle présente une valeur de  $pK_a$  anormalement basse (9,2).

**III-2.** Au cours du cycle catalytique, le substrat  $RR'C=O$  prend la place de la molécule d'eau. Quelle interaction existe entre  $RR'C=O$  et  $Zn^{2+}$  et quel est le rôle de  $Zn^{2+}$  ?

**III-3.** Reproduisez le schéma ci-dessus en y ajoutant le substrat  $RR'C=O$  correctement positionné et indiquez le mécanisme réactionnel qui conduit à sa réduction sélective.

**III-4.** La stéréospécificité de la réaction de réduction est liée à la position relative du substrat et du NADH :



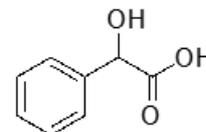
Expliquez pourquoi lorsque la leucine 182 est mutée en alanine (chaîne latérale  $CH_3$ ) la proportion de transfert du  $H_s$  est multipliée par 4000.

**PARTIE B : Biocatalyse en synthèse totale** (4,5 POINTS / 40 MIN)

Cours de A. Zaparucha

I. Une des principales utilisations de la biocatalyse est le dédoublement cinétique.

1. Donner le principe du dédoublement cinétique enzymatique ; illustrer en prenant comme exemple le dédoublement de l'acide mandélique.

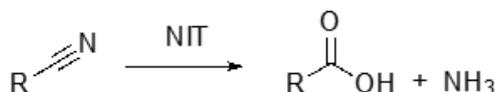


Un cas particulier du dédoublement cinétique est le dédoublement cinétique dynamique.

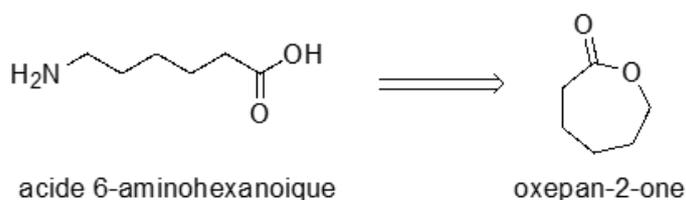
2. Donner le principe du dédoublement cinétique dynamique.  
3. Préciser quelle(s) condition(s) doit(vent) être remplie(s) pour mettre en place un dédoublement cinétique dynamique.  
4. Illustrer sur l'exemple suivant.



II. Disposer d'un test analytique fiable et robuste est essentiel pour un criblage enzymatique efficace. Donner un exemple de test analytique applicable à grande échelle pour un criblage enzymatique fonctionnel de nitrilasés (NIT) en précisant ce qui est détecté (molécule, apparition/disparition) et en proposant un mode de détection.



III. Proposer une voie de synthèse biocatalytique de l'acide 6-aminohexanoïque à partir de l'oxepan-2-one. Préciser la nature des enzymes et les cofacteurs nécessaires le cas échéant.



## PARTIE C : Stress oxydant (4,5 POINTS / 40 MIN)

Cours de M. Erard et C. Sicard-Roselli

### Tandem Payne/Dakin Reaction: A New Strategy for Hydrogen Peroxide Detection and Molecular Imaging.

Angew. Chem. Int. Ed. 2018, 57, 10173 –10177

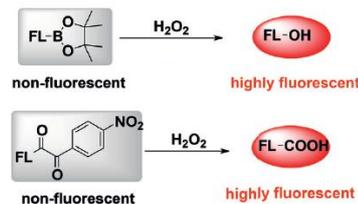
Les données/ informations dont vous pourriez avoir besoin sont rassemblées en fin d'exercice

**Abstract:** Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) has been recognized as one of the most significant ROS (reactive oxygen species) in human health and disease. Because of the intrinsic attributes of  $H_2O_2$ —such as its low reactivity under physiological pH—it is exceedingly challenging to develop small-molecule fluorescent probes with high selectivity and sensitivity for visualization of  $H_2O_2$  in an intricate biological milieu. To address this gap, a rationally designed tandem Payne/Dakin reaction is reported that is specific to molecular recognition of  $H_2O_2$ . New  $H_2O_2$  probes based on this unique chemical strategy can be easily synthesized by a general coupling reaction, and the practical applicability of those probes has been confirmed by the visualization of endogenously produced  $H_2O_2$  in living cells. In particular, starvation-induced  $H_2O_2$  production in mouse macrophages has been detected by the novel probe in both confocal imaging and flow cytometry. This tandem Payne/Dakin reaction provides a basis for developing more sophisticated molecular tools to interrogate  $H_2O_2$  functions in biological phenomena.

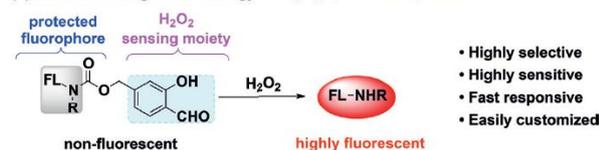
Oxidative stress, an imbalance of reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant defenses, is a fundamental process that operates in a diverse array of human diseases, including Alzheimer's diseases, cardiovascular disorders, and cancer.<sup>[1]</sup> Cellular hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) arises primarily as a ubiquitous dismutation product of superoxide. It is constantly produced by cells to maintain redox homeostasis and can be converted to dramatically more "damaging" ROS such as hypochlorous acid (HOCl) and hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) by myeloperoxidase and Fenton reagents, respectively.  $H_2O_2$  itself, however, is relatively mild under physiological conditions, and can thus diffuse across biological membranes,<sup>[2]</sup> where it can regulate a multitude of physiological and pathological processes in cells as a redox-signaling molecule.<sup>[3]</sup> Mounting evidence suggests that  $H_2O_2$  production drives a broad spectrum of cellular processes, including cell proliferation and differentiation,<sup>[4]</sup> immune response,<sup>[1,5]</sup> tumorigenesis, and metastasis,<sup>[6]</sup> while the diverse functions of  $H_2O_2$  are greatly influenced by its subcellular production, accumulation, and distribution. Therefore, mapping out  $H_2O_2$

in living cells with spatial-temporal precision is of great importance to mechanistic studies of  $H_2O_2$ -related biology.

#### (a) Traditional $H_2O_2$ sensing strategy



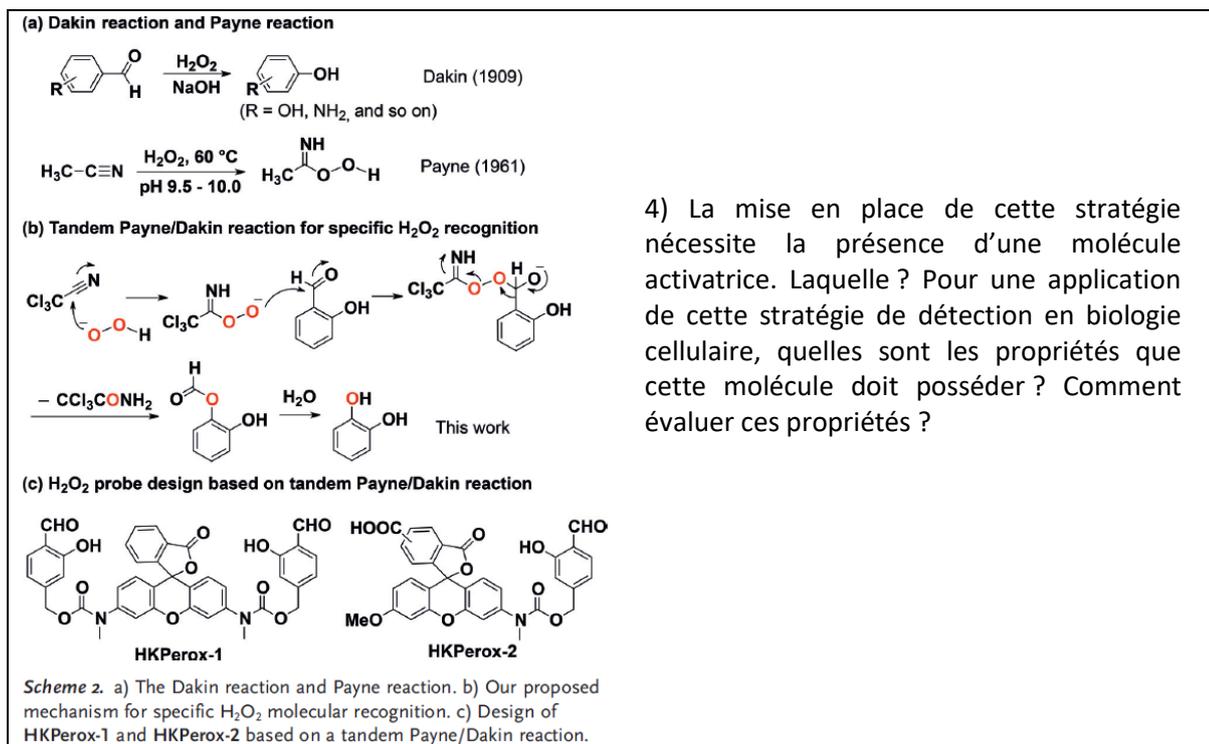
#### (b) Our novel and general strategy for $H_2O_2$ specific recognition



**Scheme 1.** a) Traditional  $H_2O_2$  fluorescent probes based on boronate oxidation and Baeyer–Villiger-type reactions. b) Our new strategy for  $H_2O_2$ -specific recognition based on a tandem Payne/Dakin reaction.

- 1) Pour quelles raisons HOCl et le radical  $HO\cdot$  induisent-ils plus de dommages que  $H_2O_2$  ? D'après l'article,  $H_2O_2$  peut diffuser plus longtemps que les autres radicaux. Expliquer pourquoi.
- 2) Dans l'introduction de l'article, il est dit qu'un stress oxydant peut induire des pathologies telles qu'Alzheimer ou des cancers. Quel(s) composant(s) cellulaire(s) peut(vent) être la cible d'un tel stress ? Citer une modification induite par des radicaux sur un de ces composants.
- 3) Citer un système permettant d'éliminer ces oxydations induites sur les composants cellulaires ? En expliquer brièvement le principe ou fonctionnement.

La stratégie choisie par les auteurs est détaillée dans le schéma 2. Elle nécessite le couplage de la réaction de Payne avec celle de Dakin puis la coupure spontanée du carbamate pour libérer l'amine correspondante et donc la molécule fluorescente.



4) La mise en place de cette stratégie nécessite la présence d'une molécule activatrice. Laquelle ? Pour une application de cette stratégie de détection en biologie cellulaire, quelles sont les propriétés que cette molécule doit posséder ? Comment évaluer ces propriétés ?

Les auteurs évaluent les réponses des deux sondes *in vitro* (figure 1) et en cellules (figure 2). Les Figure 1 a, b et c se concentrent sur la sonde HKPerox-1. Il est écrit dans le texte à propos de la sonde HKPerox-2 "Strikingly, our probe HKPerox-1 exhibited a > 10000-fold enhancement in fluorescence intensity toward H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> over other ROS/RNS (Figure c1) [...], thus confirming its excellent selectivity. The green-emitting rhodol-based HKPerox-2 (10 μM) was also characterized, which gave over 30-fold selectivity over other tested ROS/RNS".

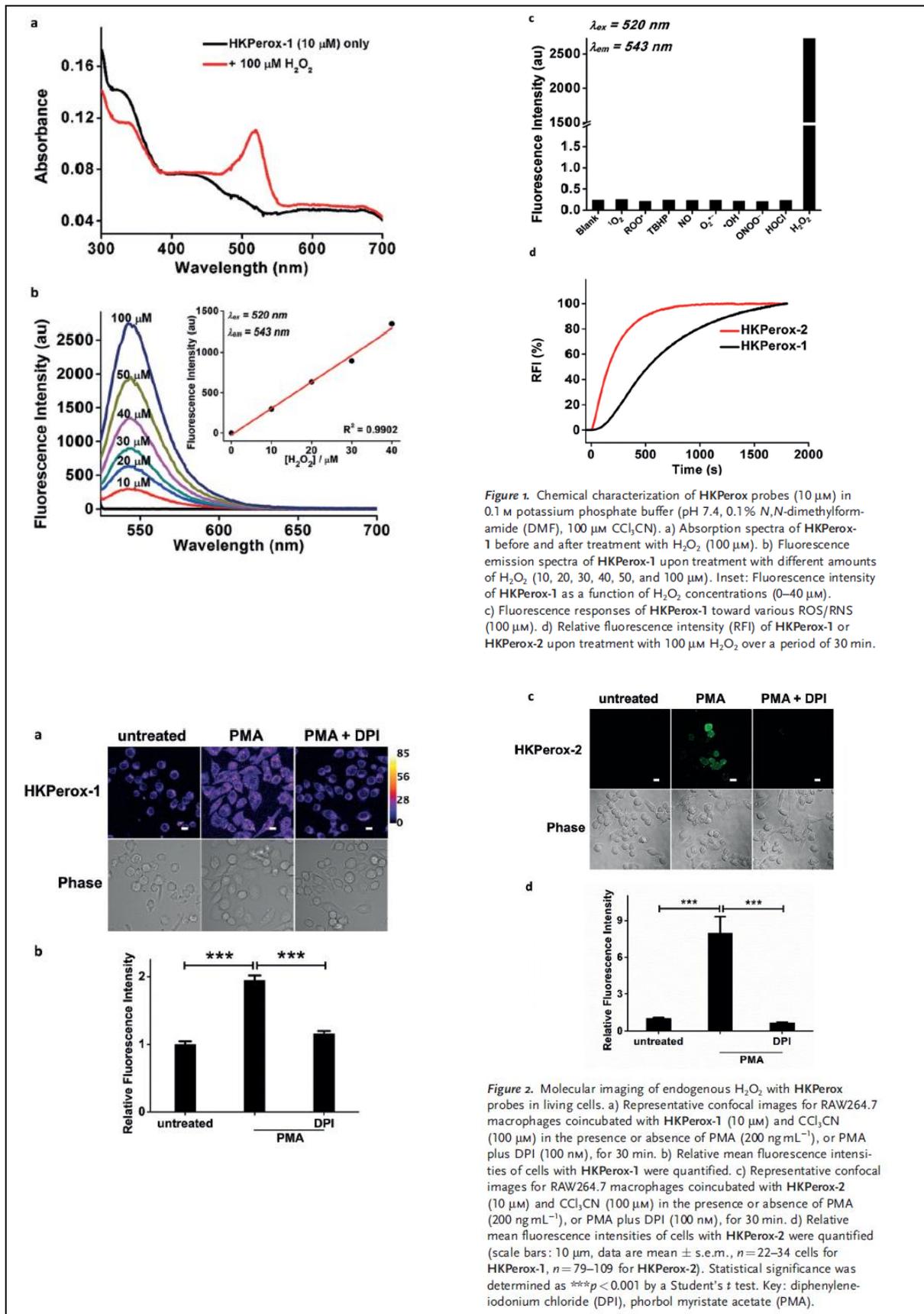
Figure 2, le PMA active l'activité de la NADPH oxydase dans les cellules macrophages RAW264.7 et le DPI l'inhibe.

5)

a) Expliquez pourquoi les résultats de sélectivité et de cinétique *in vitro* sont cohérents ou non avec les structures des molécules ?

b) En prenant en compte les données de sélectivité et de cinétique obtenues *in vitro*, expliquer les conditions expérimentales dans lesquelles on voudra utiliser l'une ou l'autre des sondes.

c) En prenant en compte les résultats obtenus sur les cellules, commentez la localisation des sondes et donc de la détection ainsi que leurs performances relatives.



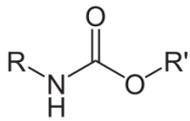
**Données :**

**Potentiels standard d'oxydo-réduction**

HOCl /Cl<sup>-</sup> : 1.08 V; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /H<sub>2</sub>O : 1.32 V, HO<sup>•</sup>/H<sub>2</sub>O : 2.3V

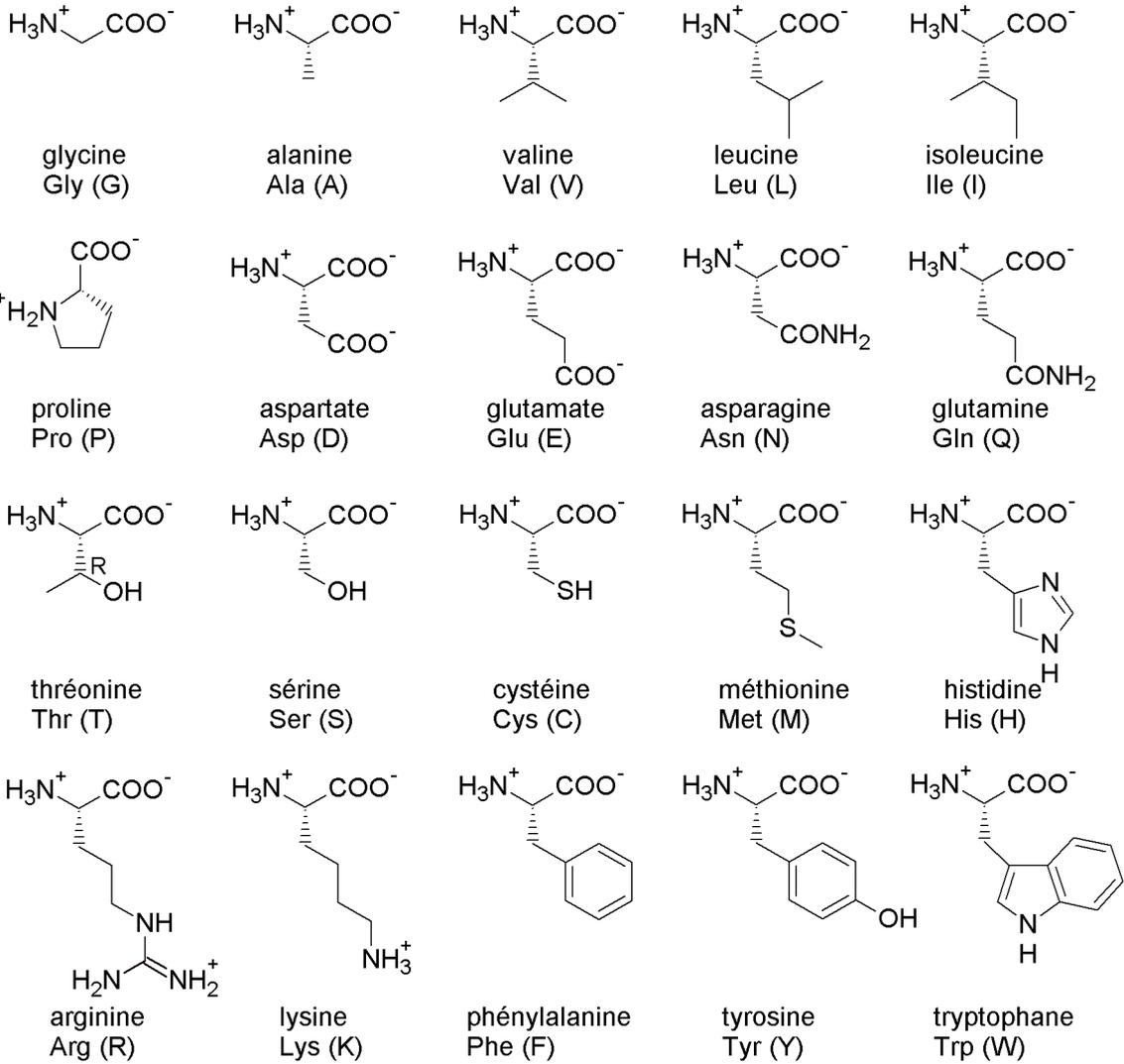
	Constante de réaction (L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
ADN + HO <sup>•</sup>	8 x 10 <sup>8</sup>
protéine + HO <sup>•</sup>	10 <sup>11</sup>
HOCl + protéine	5 x 10 <sup>7</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + protéine	10 <sup>2</sup>

**Structure du carbamate :**

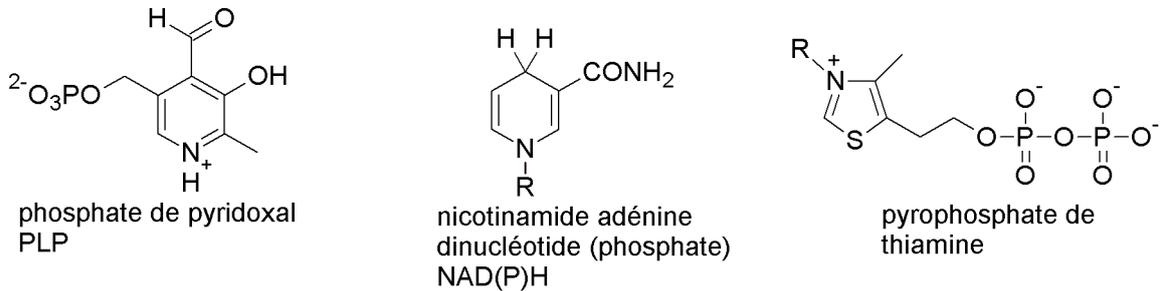


ANNEXES :

**Aminoacides**



**Cofacteurs**



**Equation de Michaelis-Menten**

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