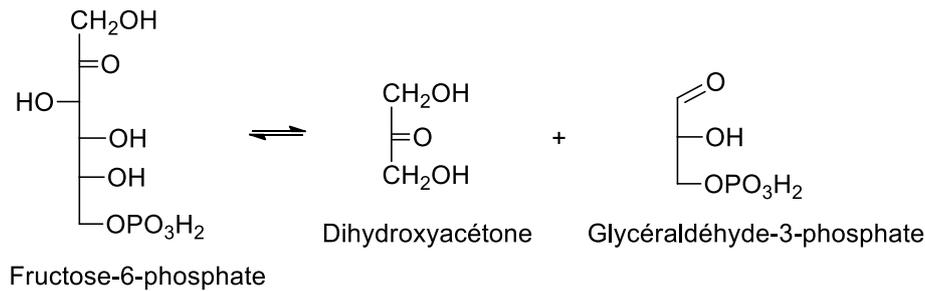


UE Structures, Mécanismes et Fonctions des Protéines
 (Cours de L. Salmon)

Aldolases

Exercice 1 :

La fructose-6-phosphate aldolase (FPA) catalyse naturellement la réaction suivante :

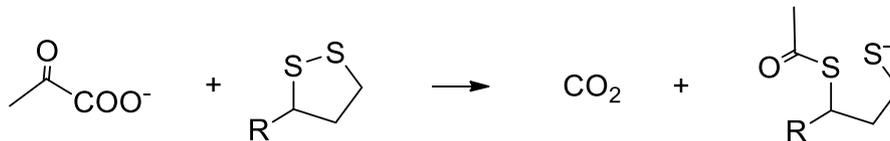


- L'enzyme est inactivée lorsque la réaction est menée en présence de cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN). Donnez un mécanisme probable de la réaction enzymatique de coupure du fructose-6-phosphate et de la réaction d'inactivation.
- Quels sont les produits attendus de la réaction entre dihydroxyacétone et chacun des composés ci-dessous catalysée par la FPA (précisez la stéréochimie) :
 - CHO-CH₂OH ;
 - CHO-CH₂Ph.
- La FPA peut accepter d'autres substrats que la dihydroxyacétone. Quel est le produit attendu de la réaction de la FPA sur le seul glycolaldéhyde CHO-CH₂OH ?

Enzymes à TPP

Exercice 1 :

- La pyruvate deshydrogénase d'*E. coli* utilise la thiamine pyrophosphate (TPP) comme co-enzyme. Son substrat physiologique est le pyruvate qu'elle transforme selon :



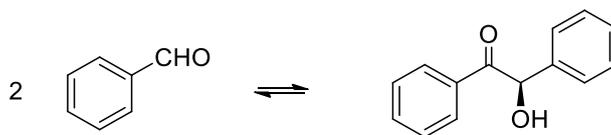
- Donnez le mécanisme complet de cette réaction.
- L'enzyme peut accepter comme substrat le 3-fluoropyruvate, qu'elle transforme selon :



- Proposez un mécanisme pour cette réaction non physiologique.

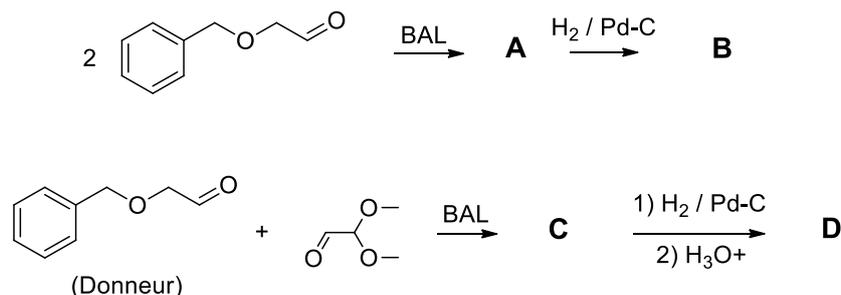
Exercice 2 :

1. Une autre enzyme à TPP, la benzaldéhyde lyase, a été isolée d'une bactérie, *Pseudomonas fluorescens*. Elle catalyse la réaction suivante :



- Proposez un mécanisme raisonnable pour cette réaction.

2. L'enzyme a été utilisée pour synthétiser des sucres rares, comme ci-dessous :

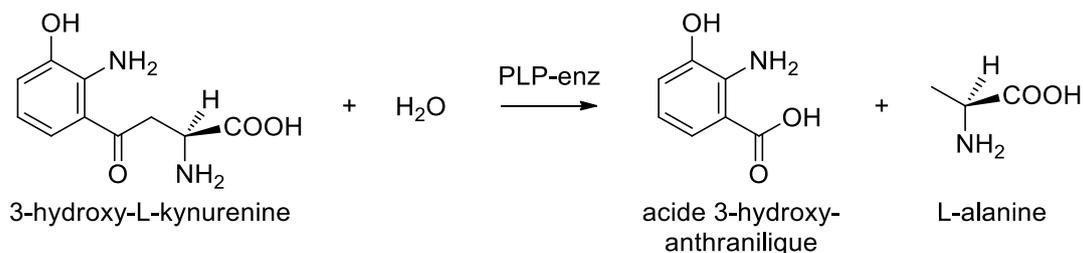


- Quels sont les composés **A** à **D** formés (précisez leur stéréochimie).

Enzymes à PLP

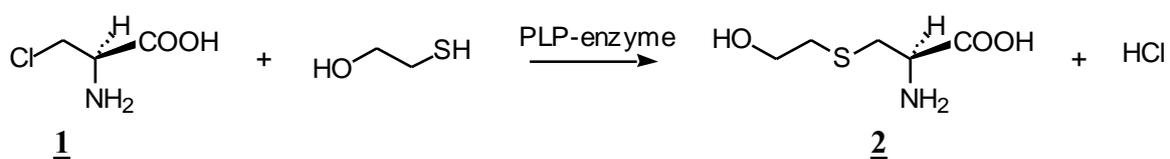
Exercice 1 :

La L-kynureninase est une enzyme à phosphate de pyridoxal (PLP) qui catalyse la transformation de la 3-hydroxy-L-kynurenine en acide 3-hydroxy-anthranilique et L-alanine indiquée ci-dessous. On soupçonne qu'un résidu glutamate ou aspartate (entre autres) de l'enzyme participe à la catalyse en formant un intermédiaire réactionnel covalent de type anhydride. Proposez un mécanisme réactionnel complet pour cette transformation.

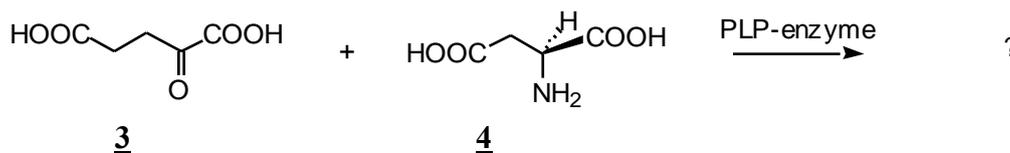


Exercice 2 :

La L-aspartate aminotransférase est une enzyme à phosphate de pyridoxal (PLP-enzyme) qui catalyse, en présence de mercaptoéthanol, la transformation de la β -chloroalanine **1** en S-(2-hydroxyéthyl)-cystéine **2** :



- Quelle est la nature homotopique ou hétérotopique des deux hydrogènes du carbone β des composés **1** et **2** ?
- Au niveau de ce carbone, la réaction de substitution a lieu avec rétention de configuration. Quel substrat pourriez-vous utiliser pour démontrer ceci (expliquer très brièvement) ?
- Proposer alors un mécanisme pour cette transformation qui tient compte des aspects stéréochimiques.
- En présence de 2-oxo-glutarate **3** et d'acide L-aspartique **4**, cette enzyme catalyse habituellement la réaction de transamination. Représenter les deux produits obtenus sans donner le mécanisme.



Adams et coll., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* (2000) 619-20

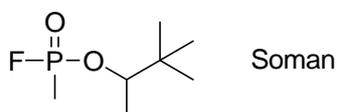
Cinétique/Inhibiteurs

Exercice 1 :

L'acétylcholinestérase (AChE) est une estérase à sérine du système nerveux central impliquée dans la régulation de la transmission des impulsions nerveuses. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine en acide acétique et choline selon le schéma réactionnel suivant :



- Quel est le mécanisme de cette transformation catalysée par l'AChE sachant que la triade catalytique Asp, His, Ser et la formation d'un intermédiaire covalent acylenzyme caractérisent ce type d'enzyme ?
- Expliquer pourquoi le methylphosphonofluoridate de pinacolyle (Soman) représenté ci-dessous, un liquide volatil, est considéré par les Nations Unies comme une arme chimique de destruction massive ?

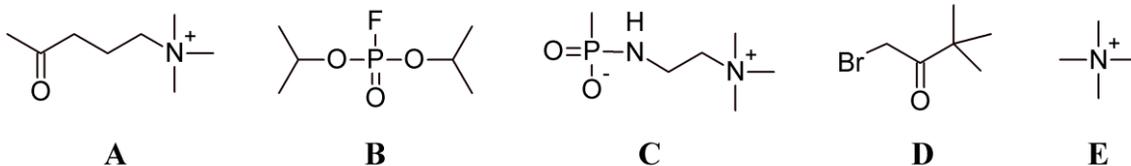


- Dans des conditions bien définies, des inhibiteurs de l'AChE sont utilisés à des fins thérapeutiques, notamment contre la maladie d'Alzheimer. Certains d'entre eux sont des inhibiteurs compétitifs analogues d'intermédiaires de haute énergie (ou de l'état de transition).
 - Quelles différences faites-vous entre un inhibiteur analogue de substrat et un inhibiteur analogue d'intermédiaire de haute énergie (ou de l'état de transition) ?
 - Proposez deux inhibiteurs différents du type « analogue d'intermédiaire de haute énergie (ou de l'état de transition) » dirigés contre l'AChE.

4. Plusieurs inhibiteurs (A-E) de cette enzyme sont représentés ci-dessous. Préciser, pour chacun d'entre eux, le type d'inhibiteur en question :

a. réversible ou irréversible ?

b. analogue de substrat, analogue de l'IHE, marqueur d'affinité et/ou inhibiteur suicide ?



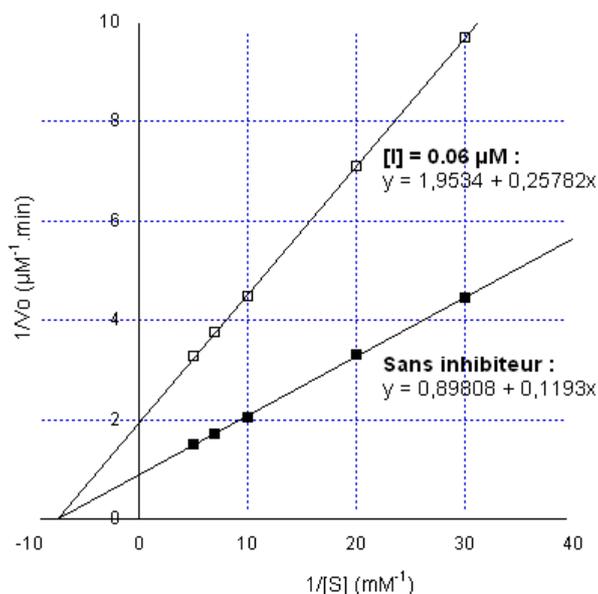
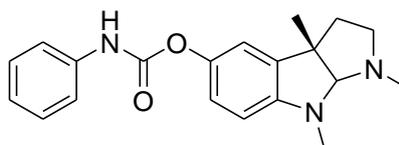
c. dans le cas d'un marqueur d'affinité ou d'un inhibiteur suicide, préciser la structure de l'acide aminé marqué.

5. L'autorégulation de l'activité de l'AChE se produit par inhibition par excès de substrat.

a. Quelle est l'allure générale de la courbe de la vitesse initiale $V_0 = f([S])$ caractéristique de ce type d'inhibition ?

b. L'inhibition par excès de substrat est un cas particulier d'une inhibition réversible. Laquelle ? Expliquer brièvement.

6. La représentation de Lineweaver-Burk ci-après montre les droites $1/V_0 = f(1/[S])$ en absence (■) et en présence (□) d'un inhibiteur I de l'AChE appelé Phensérine ($[I] = 0.06 \mu\text{M}$).

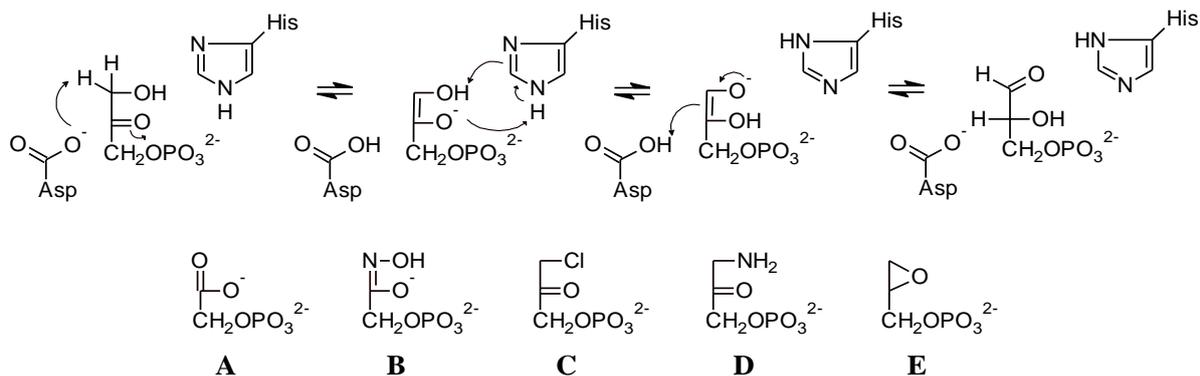


1. Déterminer la valeur de la constante de Michaëlis K_m et celle de la vitesse maximale V_{max} .

- Sachant que les essais enzymatiques ont été réalisés avec 1 ng d'enzyme (monomérique, masse molaire = 55000) dans une cuve de 1 mL, en déduire la valeur de la constante catalytique k_{cat} (le turn-over maximum) en s^{-1} . Quelle est la durée d'un cycle catalytique ?
- D'après le graphe, cet inhibiteur est-il compétitif ou non-compétitif pur ? Justifier brièvement votre réponse en donnant notamment les expressions des équations correspondantes $1/V_o = f(1/[S])$.
- Le rapport des pentes des deux droites du graphe permettent de calculer facilement la constante d'inhibition K_i du Phensérine. Quelle est cette valeur ? L'enzyme a-t-elle plus d'affinité pour le substrat ou pour l'inhibiteur ?

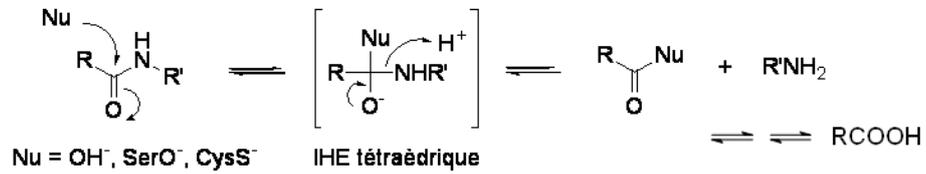
Exercice 2 :

- Quelle est l'action d'un inhibiteur sur la vitesse initiale d'une réaction enzymatique ?
- Que traduit la valeur de la constante d'inhibition K_i ?
- Quelle(s) différence(s) faites-vous entre un inhibiteur réversible et un inhibiteur irréversible ?
- Comment définissez-vous une inhibition compétitive ?
- Quelle différence principale existe-t-il entre un inhibiteur dit « marqueur d'affinité » et un inhibiteur « suicide » ?
- Quelles différences existe-t-il entre un inhibiteur dit « analogue de substrat » et un inhibiteur dit « analogue de l'état de transition ou d'intermédiaire de haute énergie (ET/IHE) » (donner trois différences) ?
- La réaction catalysée par la triosephosphate isomérase (TIM) est donnée ci-dessous, ainsi que plusieurs inhibiteurs (A-E) de cette enzyme. Préciser, pour chacun d'entre eux, le type d'inhibiteur en question :
 - réversible ou irréversible ?
 - analogue de substrat, analogue de l'ET/IHE, marqueur d'affinité ou inhibiteur suicide ?



8. Proposer une structure d'un inhibiteur analogue de substrat et celle d'un inhibiteur analogue de l'ET/IHE,

a. dans le cas de la réaction catalysée par une métalloprotéase représentée ci-dessous :



b. dans le cas de la réaction catalysée par une glycosidase représentée ci-dessous :

