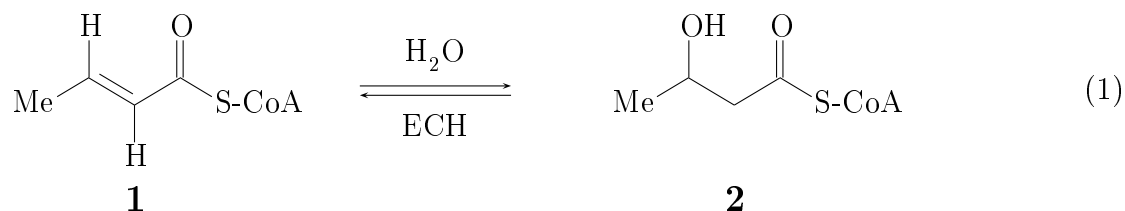


## TD 1 : Protéines

### Exercice 1 : Énoyl-CoA hydratase

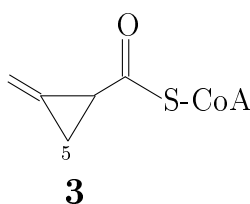
L'énoyl-CoA hydratase (ECH) catalyse l'hydratation stéréospécifique de thioesters  $\alpha,\beta$ -insaturés du coenzyme A et en particulier du *E*-crotonyl-CoA **1** selon la réaction suivante :



Lorsque l'on incube **1** en présence d'ECH dans  $\text{D}_2\text{O}$ , on obtient le 2-deutério-3-hydroxybutyryl-CoA **2a** de configuration *2R,3S*.

1. Dessiner le composé **2a** en tenant compte de la stéréochimie.
2. L'addition sur la double liaison est-elle *syn* ou *anti* ?
3. Quelle est la face (*Re/Si*) attaquée par l'eau ? (on considérera le carbone C-3 pour la désigner)
4. La réaction inverse de la déshydratation effectuée sur le composé **2** redonne le produit **1**. Quel est l'hydrogène (pro *R*/pro *S*) arraché en C-2 lors de cette réaction de déshydratation ?
5. Proposer un mécanisme enzymatique catalysant la réaction d'hydratation incluant deux résidus acide glutamique, protonés ou non, et une molécule d'eau. Comment doivent-êtré disposés ces résidus pour rendre compte de la stéréosélectivité de la réaction d'hydratation ?

Le composé **3** ci-dessous est un inhibiteur de l'ECH. Afin d'élucider le mécanisme de cette inhibition, les auteurs ont incubé l'ECH avec le composé **3** marqué au tritium ( $^3\text{H}$ ). Une digestion par la trypsine de l'ECH après réaction conduit à de nombreux fragments peptidiques dont un est radioactif.

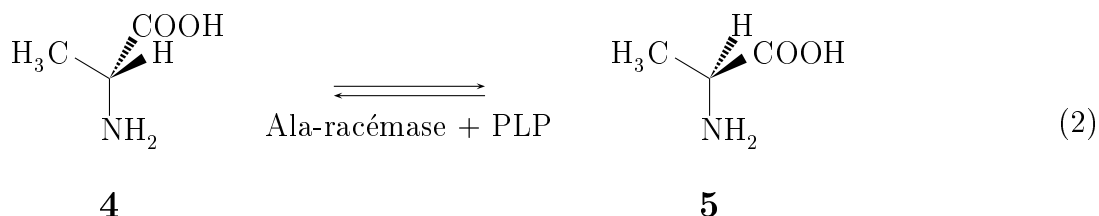


6. La trypsine est une protéase à sérine et contient une triade catalytique Asp/His/Ser dans son site actif. Donner le mécanisme de la réaction d'hydrolyse d'un amide modèle RCONHR' par la trypsine en précisant les différents intermédiaires.
7. Le peptide radioactif a été analysé par la méthode d'Edman. Rappeler le principe de cette méthode et en préciser le mécanisme.
8. Cette analyse a permis de montrer que le peptide radioactif est modifié sur un résidu cystéine proche du site actif. D'autre part, l'incubation de l'enzyme avec une quantité équimolaire de composé **3** marqué au carbone  $^{13}\text{C}$  sur le carbone C-5 provoque un changement de déplacement chimique de ce carbone  $^{13}\text{C}$  de 14 ppm à 105 ppm. Proposer un mécanisme d'inactivation de l'enzyme sachant que ce n'est pas la fonction thioester qui est touchée dans cette réaction.

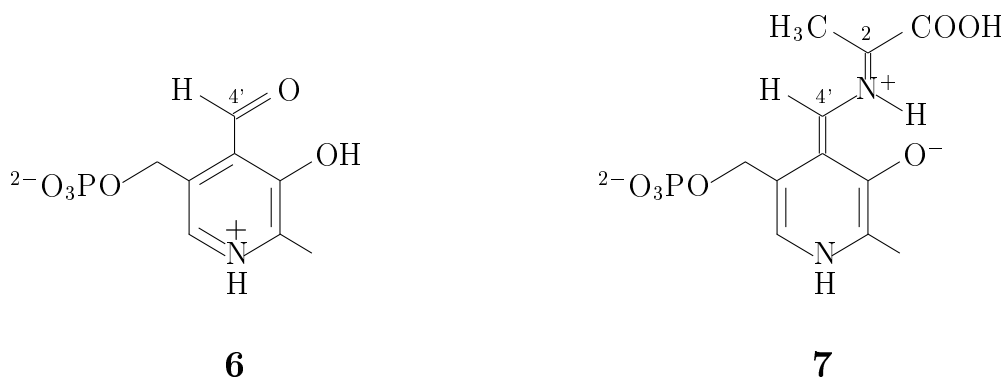
## Exercice 2 : Alanine racémase

### A-Activité racémase

L'alanine racémase de *Bacillus stearothermophilus* est une enzyme dépendante du PLP (phosphate de pyridoxal **6**). Elle catalyse la transformation réversible de la L-alanine **4** en D-alanine **5**, composant essentiel des peptidoglycanes de la paroi cellulaire bactérienne, selon le schéma 2 :



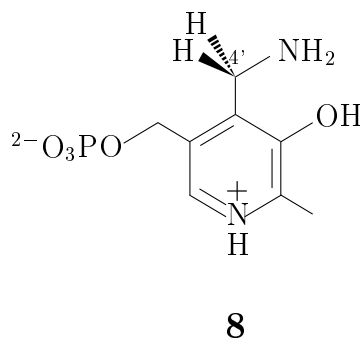
On a pu montrer que le mécanisme de la réaction faisait intervenir les deux résidus lysine-39 et tyrosine-265 du site actif de l'enzyme et impliquait l'intermédiaire quinonique **7**.



1. Quelle est la nature hétérotopique de l'intermédiaire **7** au niveau du carbone 2 ?
2. Proposer un mécanisme probable de la racémisation du D-Ala en L-Ala catalysée par l'alanine racémase en présence de PLP **6** sachant que les deux résidus Lys-39 et Tyr-265 sont situés de part et d'autre du cofacteur.
3. A quoi correspond le numéro associé à chacun des deux résidus Lys et Tyr ? Qu'en conclure quant à la relation entre structure primaire et structure tertiaire d'une protéine ?

### B-Activité transaminase

L'alanine racémase catalyse également une réaction secondaire de transamination. Ainsi, la reprotonation de l'intermédiaire **7** au niveau du carbone 4' conduit au PMP (phosphate de pyridoxamine **8**) et à un  $\alpha$ -cétoacide **A**.

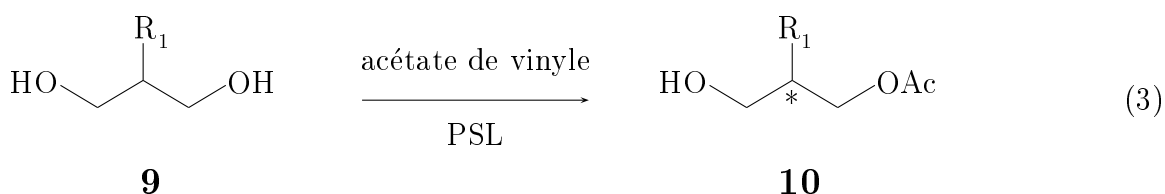


- Déterminer la structure de **A** en écrivant le mécanisme de sa formation.
- Quelle est la nature hétérotopique de l'intermédiaire **7** au niveau du carbone 4' ?
- De manière à déterminer la stéréochimie de cette réaction de transamination, les auteurs ont incubé l'acide 2-oxo-propanoïque en présence de l'enzyme et du (4'-*R*)-(4'-<sup>3</sup>H)-PMP (<sup>3</sup>H = tritium).
  - Sachant que la plus grande partie de la radioactivité est retrouvée dans le solvant (eau), conclure quant à la stéréochimie de reprotonation de l'intermédiaire **7**.
  - Comment pourrait-on confirmer ce résultat ?

### Exercice 3 : Lipases

**A.** Les lipases sont des enzymes dont le rôle biologique est d'hydrolyser les chaînes d'acides gras des lipides. Leur intérêt en chimie organique vient du fait qu'elles sont capables de réaliser des hydrolyses régio-, stéréo- et énantiosélectives de substrats variés. Ces enzymes supportent bien les solvants organiques dans lesquels elles permettent de catalyser des réactions de transestérification.

La lipase de *Pseudomonas sp.* (PSL) permet d'effectuer l'acylation énantiosélective de propane-1,3-diols prochiraux **9** en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle.

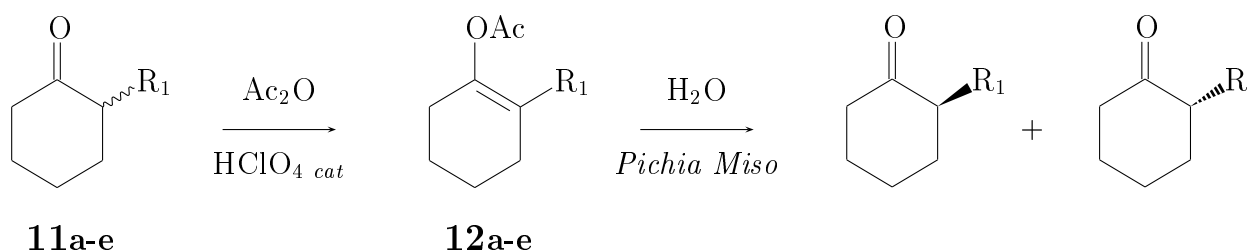


Le tableau ci-dessous résume quelques résultats expérimentaux :

R <sub>1</sub>	config. majoritaire	ee (%)
Me	<i>S</i>	>98
OBn	<i>S</i>	90

- Quelle est la relation de topicité entre les deux groupements hydroxyles des différents propane-1,3-diols ? Quelle est la sélectivité de l'enzyme pour R<sub>1</sub> = Me ou OBn ?
- En écrivant les différents équilibres qui peuvent être catalysés par la PSL, expliquer pourquoi :
  - la réaction de transestérification est favorisée par l'utilisation de l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle ?
  - l'utilisation d'un solvant organique présente un avantage par rapport à une réaction en solution aqueuse ?
- Les lipases, comme certaines protéases, possèdent souvent un résidu sérine ou cystéine dans leur site actif. En prenant comme exemple le cas d'une lipase à sérine, proposer un mécanisme pour la réaction de transestérification (on ne tiendra pas compte de la stéréochimie de la réaction).

**B.** Les cétones α-substituées optiquement actives sont des synthons très utilisés dans la synthèse de produits naturels. Il est possible de les préparer par hydrolyse d'ester d'énol catalysée par une lipase contenue dans des cellules de *Pichia miso*.



1. Après purification des produits de la réaction, la pureté énantiomérique du mélange de cétones obtenu est déterminée par mesure de son pouvoir rotatoire. Au cours d'études préliminaires menées sur l'ester d'énol **12a** ( $R_1 = \text{Me}$ ), un pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D = +2,3^\circ$  (MeOH) a été mesuré pour la 2-méthylcyclohexanone. Sachant que l'énantiomère *S* de cette cétone a un pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D = +12,2^\circ$  (MeOH), déterminer :

- l'énantiomère majoritaire
- l'excès énantiomérique obtenu

Après optimisation, les résultats présentés ci-dessous ont été obtenus :

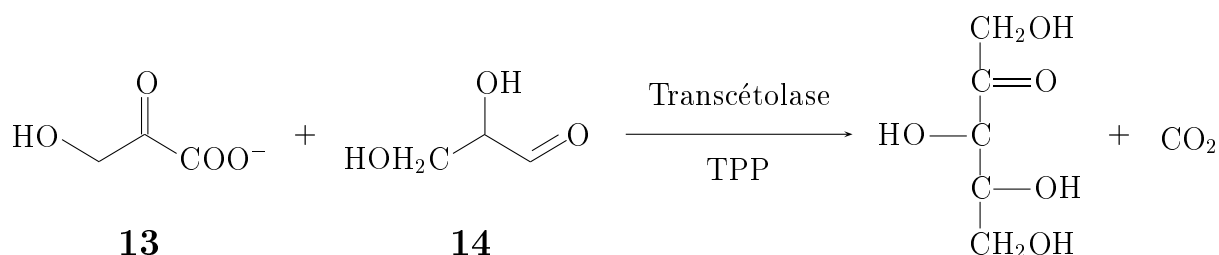
substrat	$R_1$	rendement (%)	ee (%)	config. majoritaire
<b>12a</b>	Me	78	90	<i>S</i>
<b>12b</b>	Pr	80	82	<i>S</i>
<b>12c</b>	nC7H15	77	87	<i>S</i>
<b>12d</b>	CH <sub>2</sub> -CH=CH <sub>2</sub>	49	70	<i>R</i>
<b>12e</b>	CH <sub>2</sub> Ph	71	84	<i>R</i>

2. Afin d'expliquer l'énantiosélectivité de cette réaction, on peut proposer un modèle de site actif de type protéase à sérine et contenant un groupement acide.

- un mécanisme passant par une forme énol rapidement libérée du site actif est-il compatible avec les résultats expérimentaux ?
- quelle face de l'ester d'énol doit être sélectivement protonée pour rendre compte de l'énantiosélectivité observée ?
- proposer un mécanisme concerté qui permette d'expliquer les résultats obtenus.

### Exercice 4 : Transcétolase

La transcétolase catalyse la réaction de condensation ci-dessous entre l'hydroxypyruvate **13** et le glycéraldéhyde **14**. La thiamine pyrophosphate (TPP) est un cofacteur nécessaire de l'enzyme.



1. Quelle est la configuration absolue du glycéraldéhyde utilisé ?
2. Quelle face *Si* ou *Re* de l'aldéhyde est-elle attaquée dans cette condensation ?
3. Proposer un mécanisme pour cette réaction.

Rappel : thiamine pyrophosphate :

