



Licence STS - Mention BGS - UEP 1.3 – Structures et propriétés des Biomolécules

Examen – semestre 3  
Janvier 2007 – 1 heure

**Les calculatrices ne sont pas autorisées**

**Question 1 : Etude d'un peptide ( 12 points - A : 5 mn, B : 15 mn, C : 10 mn, D : 10 mn)**

A – Après action du mercaptoéthanol, un peptide A est élué par chromatographie échangeuse de cations à pH 6. Un peptide A1 est alors récolté. Par rinçage de la colonne par la soude 1M, un second peptide A2 est élué.

**A1** – Quel est le rôle du mercaptoéthanol ?

Coupe les ponts disulfures

0.2

**A2** – Quelle est la caractéristique de la résine échangeuse de cations ?

La résine est négative et fixe les cations (POSITIFS)

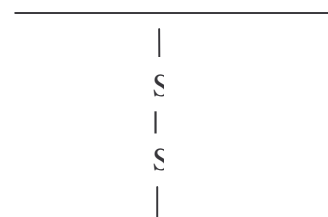
0.2

**A3** – A pH 6, déduire les charges des peptides A1 et A2 satisfaisant l'éluion :

Si A1 est élué en premier, alors il est neutre ou négatif  
Si A2 est retenu, il est positif à pH 6, en augmentant le pH avec la soude, il devient neutre ou négatif

0.4

**A4** – Déduire le schéma du peptide A ?



0.2

**B** – L'étude du séquençage des peptides A1 et A2 donne :

Hydrolyses	PEPTIDE A1	PEPTIDE A2
HCl 6N – 110 °C	Ala, Asp, Cys, Val, Y	Ala, Cys, Gly, X, Y
DNFB	DNP-Ala	DNP-Gly
Carboxypeptidase A	Val	Ala
Trypsine	1 peptide	1 dipeptide + 1 tripeptide
Chymotrypsine	1 dipeptide + 1 tripeptide	Ala + 1 tétrapeptide
Protéinase V8	1 dipeptide + 1 tripeptide	1 peptide

Contrairement à A1, le peptide A2 est positif au réactif de sacchaguchi.  
Les peptides A1 et A2 sont tous les deux positifs aux réactifs des phénols.  
Déterminer la séquence primaire des peptides A, A1 et A2 en répondant aux questions suivantes :

**B1** - Qu'apporte l'hydrolyse HCl 6N – 110 °C :

LA COMPOSITION DU PEPTIDE

0.2

**B2** - Quels sont les rôles des réactifs :

- réactif de sacchaguchi :  
présence ARG

0.2

- réactifs des phénols :  
présence de TYR

0.2

**B3** – Nommer le DNFB et définir son rôle ?

Dinitrofluorobenzène – permet de caractériser le NT – donne des DNP-aa

0.2

**B4** – Schématiser les données précédentes en les complétant par celles apportées par l'action de la carboxypeptidase A :

Pour le **peptide A1**

1 2 3 4 5            Y = Tyr  
Ala-----Val      Asp,Cys et Y à placer

0.6

Pour le **peptide A2**

1 2 3 4 5            X = Arg  
Gly-----Ala      Y = Tyr  
                         Cys, X et Y à placer

0.6

**B5** – Rôle de la trypsine ?

COUPURE de type N après ARG ou LYS

0.2

Conséquences sur le **peptide A1** (*donner toutes les possibilités*)

Pas de coupure – pas d'arg

0.2

Conséquences sur le **peptide A2** (*donner toutes les possibilités*)

1 Arg et 3 4 5      X = Arg  
1 2 Arg et 4 5

0.4

**B6** – Rôle de la chymotrypsine ?

COUPURE de type N après TYR, PHE

0.2

Conséquences sur le **peptide A1** (*donner toutes les possibilités*)

1 Tyr et 3 4 5      Y = Tyr  
1 2 Tyr et 4 5

0.4

Conséquences sur le **peptide A2** (*donner toutes les possibilités*)

1 2 3 Tyr et Ala

0.2

**B7** – Rôle de la Protéinase V8 ?

COUPURE de type N après Asp , Glu

0.2

Conséquences sur le **peptide A1** (*donner toutes les possibilités*)

1 Asp et 3 4 5  
1 2 Asp et 4 5

0.4

Conséquences sur le **peptide A2** (*donner toutes les possibilités*)

Pas de coupure – pas de Asp

0.2

**B8** – Récapitulatif

séquences du **peptide A1** (*donner toutes les possibilités*)

Ala Asp Tyr Cys Val  
Ala Tyr Asp Cys Val

0.4

séquences du **peptide A2** (*donner toutes les possibilités*)

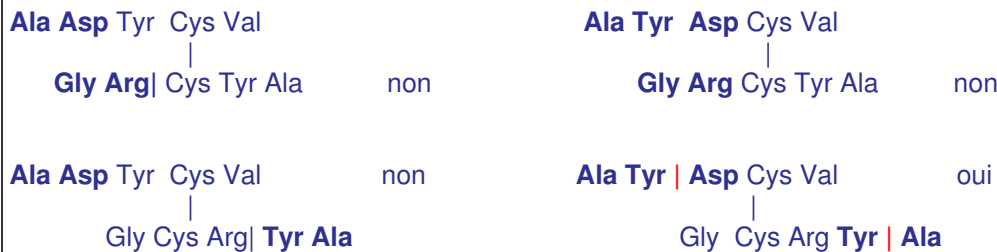
Gly Arg Cys Tyr Ala  
Gly Cys Arg Tyr Ala

0.4

C - L'étude du séquençage du peptide A donne :

Hydrolyses	Peptide A
DNFB	DNP-Ala et DNP-Gly
Carboxypeptidase A	Val et Ala
Trypsine	2 peptides dont un est un dipeptide positif au réactif des phénols
Chymotrypsine	??
Protéinase V8	2 peptides dont un est un tripeptide positif au réactif des phénols

C1 – Déduire des résultats précédents (question A et B) la séquence du peptide A. Montrer l'action de la chymotrypsine par une flèche



| = pont disulfure entre les deux cystéines

| = coupure avec la chymotrypsine

2.6

(La question D peut être traitée indépendamment de la séquence de A1 et A2).

D – En utilisant les données suivantes et celles apportées par l'hydrolyse HCl 6N à 110°C et le fait que contrairement à A1, le peptide A2 est positif au réactif de sacchaguchi et que les peptides A1 et A2 sont tous les deux positifs aux réactifs des phénols, confirmer l'ordre d'éluion des peptides A1 et A2 de la question A.

pk $\alpha$ NH <sub>2</sub> = 8	pk $\alpha$ COOH = 3	Pk <sub>R</sub> de Asp = 4	Pk <sub>R</sub> de Cys = 10
pk <sub>R</sub> de l'acide aminé X = 11		pk <sub>R</sub> de l'acide aminé Y = 13	
Y est donc la Tyr X est donc l'Arg			
	3	4	8
$\alpha$ COOH	0	-	-
R de Asp	0		-
$\alpha$ NH <sub>2</sub>	+	+	
R de Cys	0	0	
R de Tyr	0	0	0
Peptide	+	0	-
<b>pHi = 3,5</b>			
	3	8	10
$\alpha$ COOH	0	-	-
- $\alpha$ NH <sub>2</sub>	+	+	
R de Cys	0	0	
R de Arg	+	+	
R de Tyr	0	0	0
Peptide	++	+	0
<b>pHi = 9</b>			

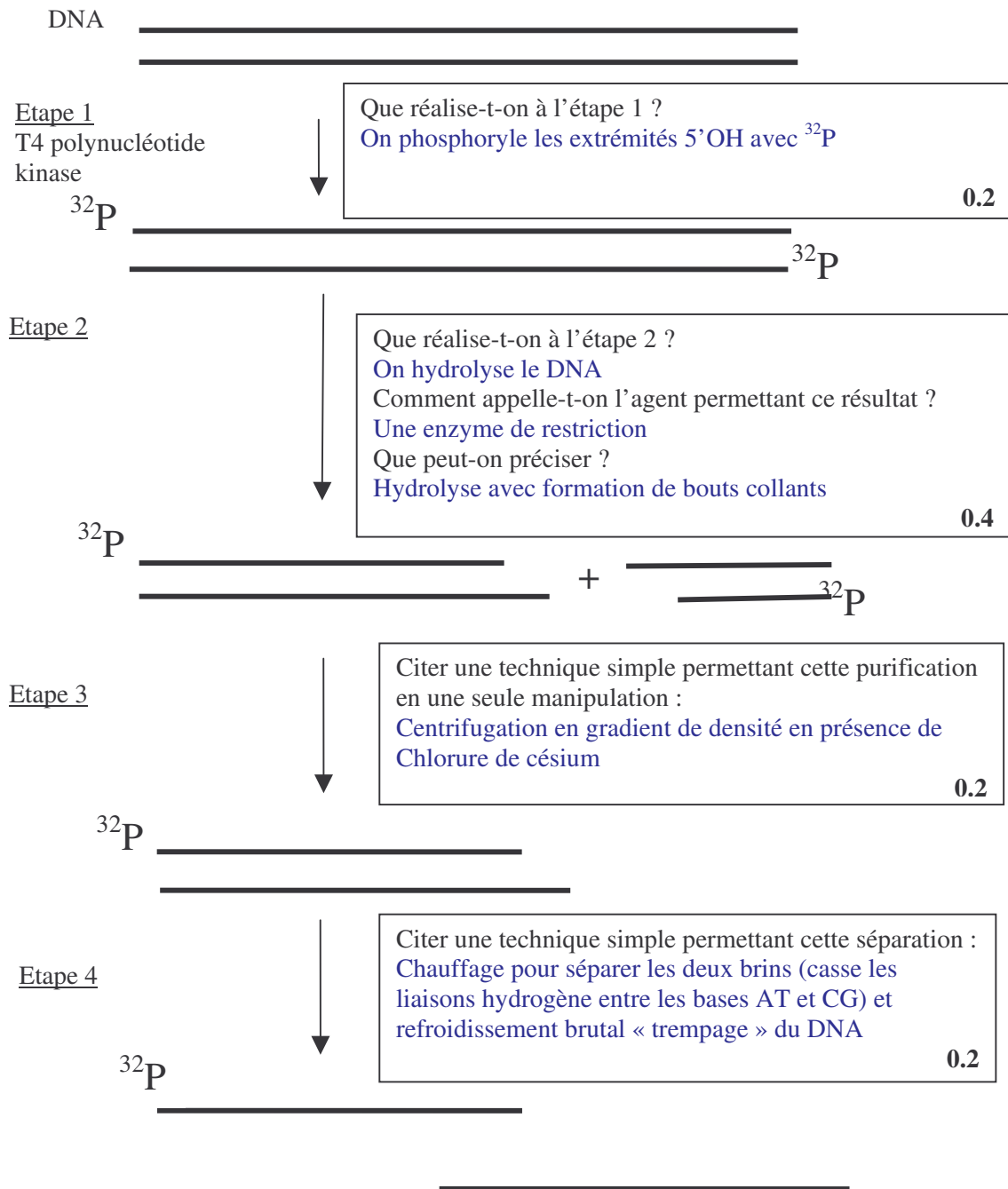
3

**Question 2 : Etude d'un mRNA ( 8 points - A : 5 mn, B : 5 mn , C : 10 mn)**

**A** - Un DNA codant la synthèse d'une protéine P est isolé puis manipulé afin de déterminer par la méthode de Maxam et Gilbert le séquençage d'un morceau du gène codant pour cette protéine.

Compléter le schéma suivant résumant la préparation du DNA en vue du séquençage.

**\*Orienter les brins de DNA .**



**B – Séquençage du DNA : Cocher (X) les bonnes réponses ou étapes représentatives de la méthode de séquençage de Maxam et Gilbert. Les classer (N°) suivant la chronologie de la manipulation**

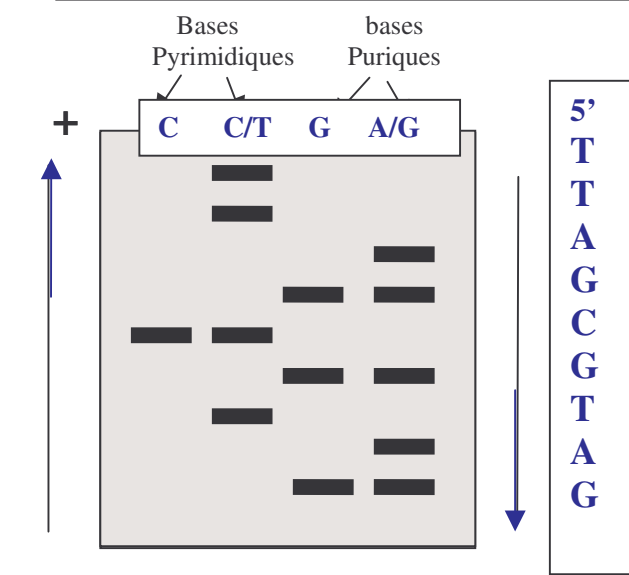
*(Une réponse erronée annule une bonne réponse)*

N°	X	
		Méthode de coupures enzymatiques
		Nécessité d'utiliser une amorce en 3'
		Méthode de synthèses enzymatiques
3	X	2 échantillons sont utilisés pour couper les bases puriques et deux autres les bases pyrimidiques
		La séparation des DNA s'effectue par électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS
2	X	Utilisation de monobrin de DNA marqués radioactif en 5'OH
		Nécessité d'utiliser une amorce en 5'
		Utilisation de monobrin de DNA non marqués radioactif
6	X	Les résultats ci-dessous montre l'autoradiographie du gel
		Utilisation de monobrin de DNA marqués radioactif en 3'OH
4	X	Les échantillons de DNA sont séparés par électrophorèse sur gel polyacrylamide
		Les échantillons de DNA sont séparés par chromatographie échangeuse d'ions
		Le gel polyacrylamide est un tamis moléculaire séparant les DNA en fonction de leur charge
5	X	Le gel polyacrylamide est un tamis moléculaire séparant les DNA en fonction de leur taille
		Les résultats du gel ci-dessous montre les acides nucléiques colorés par du bleu de Coomassie
1	X	Méthode de coupures chimiques
		Les résultats du gel ci-dessous montre les acides nucléiques colorés par le bromure d'éthidium
		La synthèse de DNA nécessite une DNA polymérase, du Mg <sup>++</sup> et des dXTP et des ddXTP

1.2

**C – Résultats : Compléter les résultats ci-dessous et donner la séquence du monobrin de DNA.**

Résultat du gel de séquençage par Méthode de Maxam et Gilbert



Sens de migration?

Sens de lecture?

5.8