



Partie I : Nadia RABAH
Université de Toulon Sud Var
UFR Sciences et Tech.
Département de biologie

Examen 2eme session 2011-2012

B31 Biochimie structurale et moléculaire
Répondre sur les sujets d'examen.

LES CALCULATRICES SONT INTERDITES !

Questions à choix multiples (Entourer la ou les bonnes réponses) (1pt/ question)

1. Les nucléotides :

- a. Ce sont des esters phosphates d'un sucre à 5C (pentose) où une base azotée est liée de façon covalente au C1' du résidu de sucre.
- b. Le noyau pyrimidique conduit à deux types de bases (l'adénine et la thymine).
- c. Ils entrent dans la composition de l'ADN mais pas de l'ARN.
- d. Ils peuvent contenir des modifications sur des sites cycliques ou exocycliques.
- e. Ce sont des composés structuraux de coenzymes.

2. Parmi les propositions suivantes, lesquelles sont justes :

- a. Un nucléoside est formé d'une base, d'un sucre et d'un groupement phosphate.
- b. Les bases puriques sont composées d'un hétérocycle et les bases pyrimidiques de deux cycles juxtaposés.
- c. De nombreuses bases dans l'ARN (surtout dans l'ARNt sont modifiées).
- d. La xanthine est un intermédiaire dans le métabolisme de l'adénine et de la guanine. Lorsqu'elle n'est pas éliminée elle conduit à une pathologie dite de la goutte.

3. Lesquels de ces composés sont des nucléosides :

- a. Cytidine.
- b. Désoxyguanosine.
- c. Uracile.
- d. Adénosine monophosphate.
- e. Thymine.

4. Concernant les bases azotées :

- a. La présence de doubles liaisons conduit à la délocalisation des électrons π avec comme conséquence la présence de différentes formes tautomères.
- b. La répartition des électrons à la surface des bases azotées n'est pas uniforme, il en résulte que ce sont des molécules polarisées.
- c. Les propriétés d'ionisation des bases azotées peuvent influencer la position ainsi que l'orientation des liaisons 'hydrogène'.
- d. Les bases azotées peuvent exister sous forme zwitterionique.
- e. Les bases azotées peuvent former une liaison β -O-glycosidique avec des oses pour donner des nucléosides.

5. Parmi les propositions suivantes concernant les différentes formes de l'ADN:

- a. L'hélice-B est constituée de deux brins de polynucléotides tournant autour d'un même axe avec une torsion droite pour former une double hélice d'environ 20 Å de diamètre.
- b. L'hélice-B contient 10 résidus par tour avec un écart de 0,34nm entre les bases.
- c. La forme ADN-B est la plus stable dans les conditions physiologiques, elle contient des successions de CG favorisant la conformation en zigzag.
- d. La forme ADN-A est favorisée dans des solutions contenant peu d'eau (déshydratation).
- e. La forme ADN-Z est présente chez les procaryotes et les eucaryotes. Elle est impliquée dans la régulation des gènes.

6. Concernant la structure de l'ADN, quelles sont les affirmations qui sont justes ?

- a. Les structures en épingle à cheveux sont dues à la présence sur un même brin d'ADN de séquences auto-complémentaires.
- b. Les structures cruciformes ne sont pas aussi stables que l'ADN bicaténaire.
- c. Les structures cruciformes sont favorisées par le surenroulement négatif de l'ADN.
- d. La présence de structures tertiaires au niveau de l'ADN facilite la fixation de protéines régulatrices.
- e. Les topoisomérases sont des enzymes qui modifient le nombre d'enlacements de l'ADN en coupant un ou deux brins d'ADN.

7. Propriétés chimiques des acides nucléiques :

- a. La dénaturation de l'ADN correspond à l'hydrolyse des liens phosphodiester entre les nucléotides.
- b. L'ADN est soluble dans l'éthanol.
- c. Le phénomène d'hyperchromicité correspond à l'augmentation de l'absorbance au U.V. due à la dénaturation de l'ADN.
- d. L'ADN et l'ARN peuvent être séparés par centrifugation différentielle.
- e. La centrifugation au gradient de densité de saccharose permet de séparer les différentes molécules d'ARN (ARNt, ARNm et ARNr).

8. Les enzymes qui hydrolysent les acides nucléiques sont dites 'nucléases'. Elles possèdent certaines caractéristiques. Lesquelles ?

- a. Les nucléases sont des phosphodiesterases, elles vont catalyser la scission de la liaison phosphodiester.
- b. Les nucléases sont des aminopeptidases, elles vont catalyser la scission de la liaison peptidique.
- c. Les exonucléases dégradent les polynucléotides en coupant à l'intérieur de la chaîne nucléotidique.
- d. Les nucléases de type 'a' libèrent des nucléotides 5' monophosphate.
- e. Les nucléases de type 'a' libèrent des nucléotides 3' monophosphate.

9. Des analogies existent entre réplication et transcription. Lesquelles?

- a. Elles impliquent toutes deux un mode semi-conservatif de synthèse.
- b. Pour toutes deux, une amorce est nécessaire à l'initiation de la synthèse.
- c. Il existe pour toutes deux une polarité de synthèse de 3' vers 5'.
- d. Elles nécessitent toutes deux une matrice d'ADN.
- e. Les deux nécessitent la présence des 4 nucléotides libres.

10. Parmi les propositions suivantes, concernant les modifications post-traductionnelles des protéines, lesquelles sont exactes :

- a. Les modifications post-traductionnelles sont réversibles, lorsqu'il s'agit de l'addition covalente d'un ou de plusieurs groupements chimiques au niveau de sites particuliers.
- b. Les modifications post-traductionnelles sont irréversibles, lorsqu'il s'agit, par exemple, de protéolyse.
- c. La phosphorylation est un processus réversible qui correspond à l'ajout d'un groupement phosphate ($-\text{PO}_3^-$) sur une sérine, une thréonine ou une tyrosine.
- d. Le clivage protéolytique permet le ciblage des protéines vers une destination cellulaire particulière.
- e. Chez les eucaryotes, la présence d'une séquence 'signal ou leader' en NH_2 des protéines implique que celles-ci sont sécrétées ou membranaires.

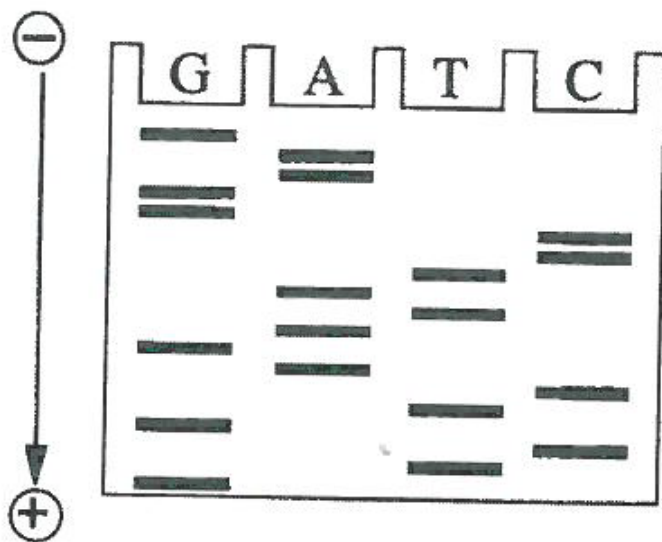
11. Quelles sont les affirmations justes concernant le gel d'électrophorèse SDS-PAGE?

- a. C'est un gel d'acrylamide en condition dénaturante, très souvent employé pour les protéines.
- b. Le SDS confère aux protéines une charge négative proportionnelle à leur longueur.
- c. Le β -mercaptoethanol est un agent réducteur. A chaud, il brise les ponts disulfures des protéines.
- d. La séparation des protéines dans un gel SDS PAGE dépend de deux critères : la taille et la charge.
- e. La technique du Western blot permet de visualiser toutes les protéines d'un tissu suite à leur séparation sur SDS PAGE.

12. Concernant les méthodes d'analyse des acides nucléiques :

- a. Le marquage radioactif de l'ADN implique l'incorporation d'un ou de plusieurs nucléotides radioactifs par des moyens enzymatiques.
- b. Le marquage à froid (non radioactif) peut s'effectuer au cours de la synthèse du fragment d'ADN par ajout d'un nucléotide porteur d'un fluorophore (exemple : FITC).
- c. Dans le marquage à froid, la visualisation du groupement chimique fluorescent se fait grâce à des films radiographiques.
- d. Une sonde est un segment peptidique utilisé pour repérer de manière spécifique un ADN ou un ARN d'intérêt.
- e. Le marquage par amorçage aléatoire (Random Priming) nécessite l'utilisation de DNAses.

13. L'autoradiographie d'un gel de séquence par la méthode de Sanger pour un fragment d'ADN donne le résultat suivant :



En sachant que chaque ligne marquée G, A, T ou C correspond à l'incubation avec chacun des 4 didéoxynucléotides, quelle est la bonne séquence 5'-3' que vous lisez ?

- a. 5'GTCGTCAGATATCCGGAAG3'
- b. 5'GAAGGCCTATAGACTGCTG3'
- c. 5'CAGCAGTCTATAGGCCTTC3'
- d. 5'CTTCCGGATATCTGACGAC3'
- e. 5'GAAGGCCTATATCCGGAAG3'

15. Quelles sont les affirmations vraies :

- a. Les YAC sont des vecteurs permettant le clonage de fragments d'ADN allant jusqu'à 2 méga pb (paires de bases).
- b. Il existe des plasmides naturels qui se répliquent dans les bactéries.
- c. Un cosmide est un hybride entre un plasmide et un phage.
- d. Un cosmide permet de cloner des fragments d'ADN plus long qu'un phage.
- e. Les inserts clonés dans un YAC sont plus petits que dans un BAC.

16. Quelles sont, parmi les affirmations suivantes, celles qui s'appliquent à une banque d'acides nucléiques.

- a. Une banque d'ADN génomique contient les séquences codantes et non codantes d'un génome.
- b. Une banque d'ADNc (ADN complémentaire) contient les séquences codantes et non codantes d'un génome.
- c. Les inserts d'une banque génomique peuvent varier d'un tissu à un autre.
- d. Une banque d'ADNc permet d'isoler les régions régulatrices d'un gène d'intérêt.
- e. Les ADNc sont des copies d'ARNm.

17. Concernant les vecteurs d'expression :

- a. Les banques d'ADNc peuvent être exprimées en utilisant des vecteurs spécialement conçus pour l'expression à partir de plasmides ou de phages dans une cellule hôte particulière (procaryote ou eucaryote).
- b. Un vecteur d'expression d'ARN contient un promoteur ainsi qu'un site de liaison du ribosome.
- c. L'opéron lactose peut être exploité pour réguler l'expression dans le temps d'un gène d'intérêt.
- d. Les cellules d'insectes sont utilisées pour l'expression de protéines eucaryotes subissant des modifications post-traductionnelles.
- e. Toutes ces propositions sont justes.

18. Soit l'ADN complémentaire double brin (ADNc) qui a été synthétisé à partir de l'ARNm de l'apolipoprotéine A-II (ApoA-2). La séquence du brin sens de cet ADNc est :

```
1  AGGCACAGAC  ACCAAGGACA  GAGACGCTGG  CTAGGCCGCC  CTCCCCACTG  TTACCAACAT
61  GAAGCTGCTC  GCAGCAACTG  TGCTACTCCT  CACCATCTGC  AGCCTTGAAG  GAGCTTTGGT
121 TCGGAGACAG  GCAAAGGAGC  CATGTGTGGA  GAGCCTGGTT  TCTCAGTACT  TCCAGACCGT
181 GACTGACTAT  GGCAAGGACC  TGATGGAGAA  GGTCAAGAGC  CCAGAGCTTC  AGGCCGAGGC
241 CAAGTCTTAC  TTTGAAAAGT  CAAAGGAGCA  GCTGACACCC  CTGATCAAGA  AGGCTGGAAC
301 GGAAGTGGTT  AACTTCTTGA  GCTATTTTCG  GGAAGTGGGA  ACACAGCCTG  CCACCCAGTG
361 AAGTGTCCAG  ACCATTGTCT  TCCAACCCCA  GCTGGCCTCT  AGAACACCCA  CTGGCCAGTC
421 CTAGAGCTCC  TGTCCCTACC  CACTCTTTGC  TACAATAAAT  GCTGAATGAA  TCC
```

Pour faciliter les comptes, la séquence a été divisée en groupe de 10 lettres et le numéro du premier nucléotide de chaque ligne a été mentionné.

Parmi les constituants suivants, quels sont ceux qui ont été utilisés pour la synthèse de cet ADNc.

- a. Une ARN polymérase.
- b. Une transcriptase reverse.
- c. Une ADN ligase.
- d. Les ribonucleosides triphosphates : ATP, UTP, GTP, CTP.
- e. Les désoxyribonucleosides triphosphates : dATP, dTTP, dGTP, dCTP.

19. La séquence nucléotidique de l'ApoA-2 décrite ci-dessus :

- a. Comporte la séquence du promoteur du gène de l'ApoA-II.
- b. Reproduit la séquence de l'ARNm de l'Apo-A-II (hors mis la coiffe et la queue polyA).
- c. Reproduit la séquence de tous les exons du gène de l'Apo-AII.
- d. Reproduit en partie la séquence du brin sens du gène de l'Apo-AII.
- e. Reproduit en partie la séquence du brin antisens du gène de l'Apo-AII.

20. Vous souhaitez, à partir de l'ADNc de l'ApoA-II, synthétiser par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) le fragment situé entre les deux séquences en caractère gras. Parmi les constituants suivants, quels sont ceux que vous utiliserez pour cette synthèse ?

- a. L'oligonucléotide : 5'ATGAAGCTGCTCGCAGC3'.
- b. L'oligonucléotide : 5'CAGCCTGCCACCCAGTGA3'.
- c. L'oligonucléotide : 5'TCACTGGGTGGCAGGCTG3'.
- d. Les désoxyribonucleosides triphosphates : dATP, dTTP, dGTP, dCTP.
- e. Une ADN polymérase.
- f. Une transcriptase reverse.

Partie II : Sujet d'enzymologie – Melle Virginie Garlatti

Les antiviraux actuels utilisés pour le traitement du VIH sont des inhibiteurs de la transcriptase réverse. De nouveaux antiviraux sont en cours de développement qui cibleraient, non pas le métabolisme de l'ADN, mais les modifications post-traductionnelles des protéines virales. Ces molécules seraient des inhibiteurs des protéases virales.

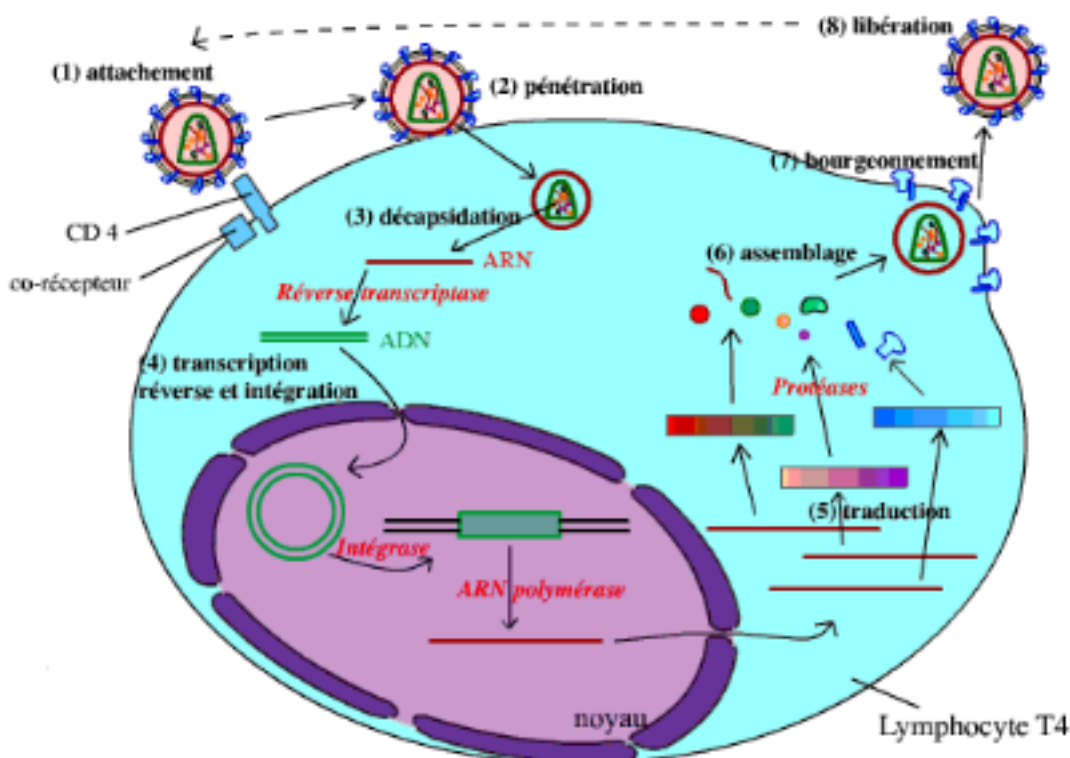


Figure 1 : Cycle viral du VIH dans un lymphocyte T4

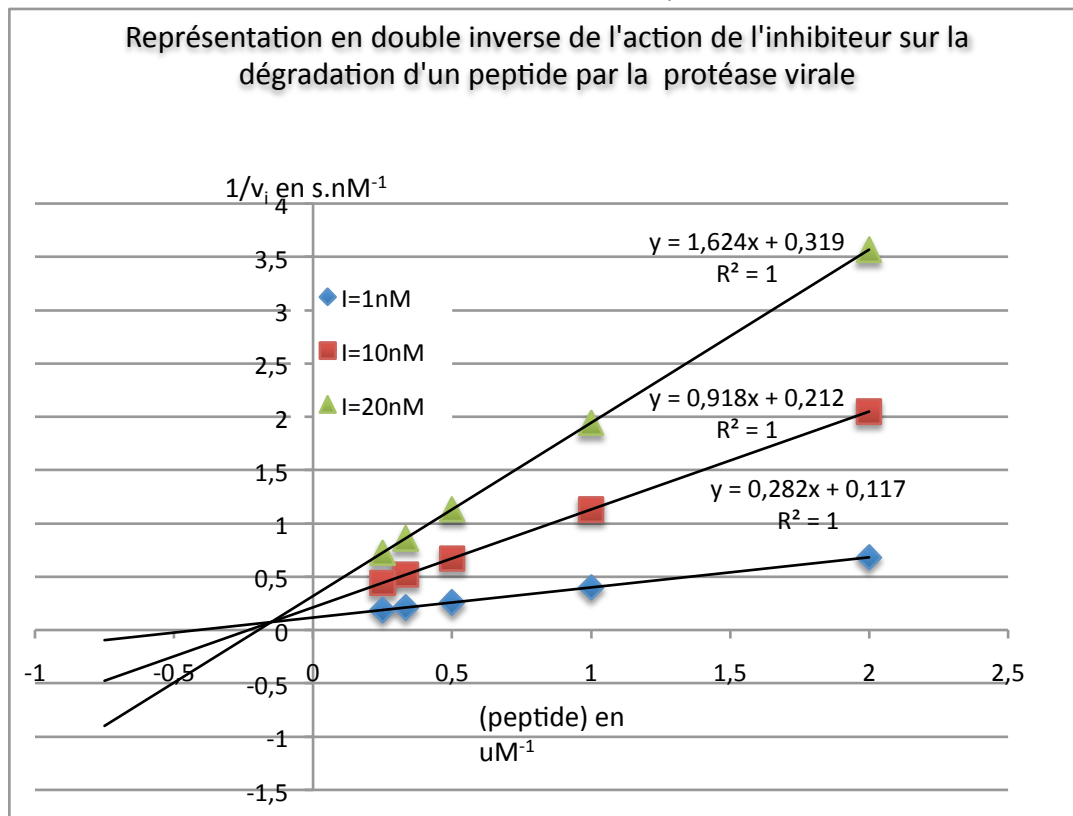
Afin d'étudier l'efficacité de ces inhibiteurs sur une des protéases virales (**300kDa**), des mesures d'activités enzymatiques sont réalisées à l'aide d'un peptide synthétique portant un seul site de coupe pour la protéase.

1. Définissez l'activité enzymatique, la constante de Mickaelis et la constante catalytique. Vous donnerez les unités de chacune de ces grandeurs.
2. Le tableau ci-dessous vous donne les vitesses initiales de réaction à différentes concentrations en peptides, en absence d'inhibiteur. Analysez ces résultats.

(peptide) μM	0,5	1	2	3
v_i nM.s^{-1}	1,89	3,14	4,71	5,65

Tableau 1 : Vitesse initiale de réaction de la protéase (2nM) à différentes concentrations en substrat.

3. La figure ci-dessous vous donne la représentation de Lineweaver et Burk obtenue pour différentes concentrations en inhibiteur 1. Analysez ces résultats.



4. Le problème lié aux inhibiteurs de protéases est leur spécificité envers les protéines virales. En effet, si les inhibiteurs ont un effet sur les protéases de l'hôte, on peut voir apparaître de nombreux effets secondaires qui peuvent mener à la mort du patient. Dans le tableau ci-dessous, on donne les caractéristiques de différents inhibiteurs quant à leurs effets sur la protéase virale et sur une protéase cellulaire humaine homologue. Analysez ces résultats.

Inhibiteur		Sur Protéase virale nM	Sur Protéase humaine nM
1	K _i		1000
	K' _i		6000
2	K _i	0,1	10
	K' _i	3	60
3	K _i	40	100 000
	K' _i	70	300 000
4	K _i	500	1
	K' _i	1000	4

Tableau 2 : Constantes d'inhibitions en nM de quatre inhibiteurs pour une protéase virale et une protéase humaine

5. Les traitements actuels utilisent des inhibiteurs de la transcriptase reverse et possèdent un K_i de l'ordre du micromolaire. Que pensez-vous de l'efficacité de ces nouveaux inhibiteurs de protéases par rapport aux traitements actuels ?