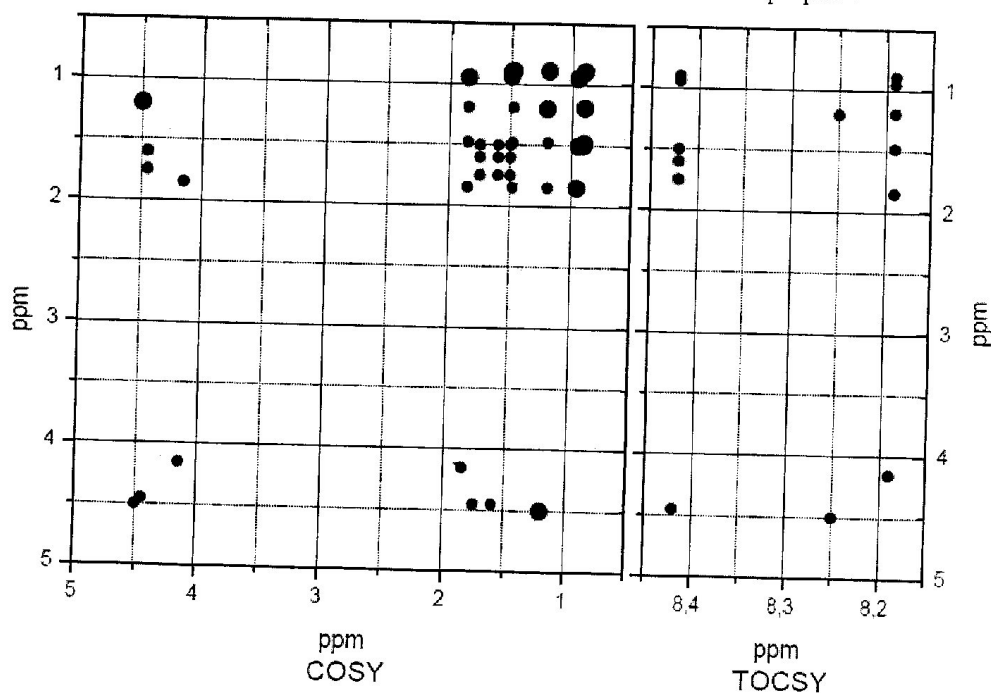


Rappel : le numéro d'anonymat est obligatoire.

Durée de l'épreuve : 2 h 30 en totale (60-70 min recommandé pour la partie RMN). Nombre de pages d'énoncé : 3, c.à.d. 2 feuilles recto-verso.

Aucun document supplémentaire autorisé. Calculatrice autorisée.

1. Des extraits des spectres ^1H - ^1H COSY et TOCSY schématisés sont montrés en bas de la page. Les deux spectres ont été enregistrés du même échantillon de polypeptide soluble. Voir p.3 pour des tableaux.
 - a. Identifier les systèmes de spin et les acides aminés visibles sur les spectres. Expliquer votre démarche.
 - b. Etablir un tableau d'attribution de ^1H dans lequel vous corrélerez les déplacements chimiques aux atomes ^1H . Est-ce qu'il y a des informations structurales que vous pourriez déduire de votre attribution ? Expliquer ?



2. Deux spectres TOCSY enregistrés du même peptide avec la séquence indiquée en utilisant deux conditions différentes sont montrés. Attribuer les signaux d' au moins cinq acides aminés. Expliquer votre démarche.

D¹ A E F R¹ H D S G Y¹⁶ E V H H Q¹⁸ K

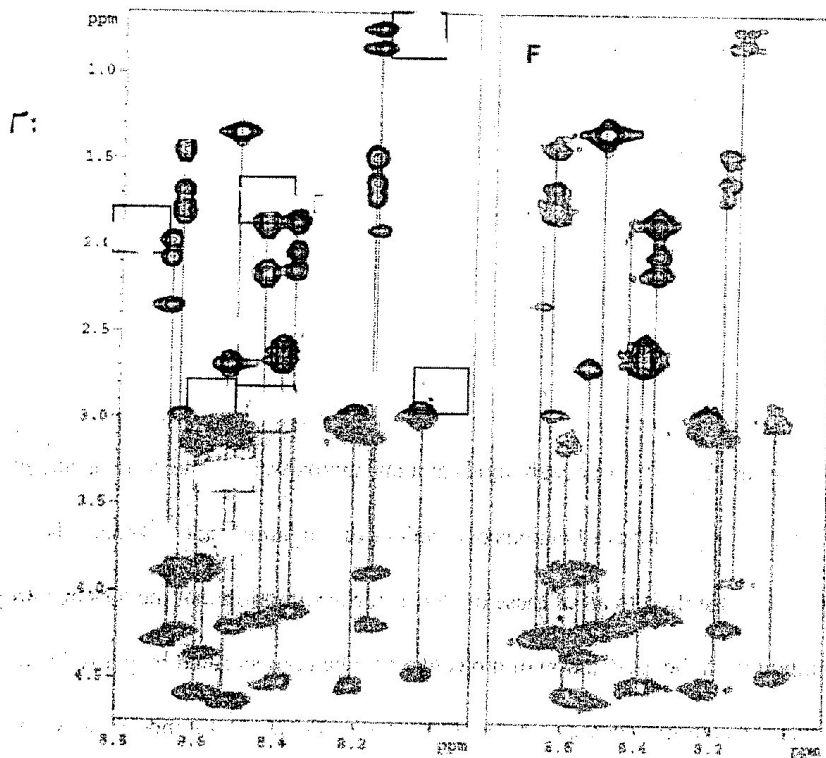


FIG. 2. ¹H NMR spectra of Aβ(1-16) in the absence and in the presence of Zn²⁺ at pH 6.5 and 7.5. (A-D) Enlargements of the amide and aromatic-proton region of the 400 MHz 1D ¹H NMR spectra of 2 mM Aβ(1-16): (A) pH 6.5; (B) pH 6.5, [Zn²⁺] 3 mM; (C) pH 7.5; (D) pH 7.5, [Zn²⁺] 3 mM. (E, F) 2D-TOCSY spectra of 3 mM Aβ(1-16) at pH 7.5 in the absence (E) and in the presence (F) of 4.8 mM Zn²⁺.

3. a. Expliquez brièvement le fondement physique du déplacement chimique. Calculez le déplacement chimique d'une résonance ¹H qui se retrouve à 600.050.720 Hz, si on retrouve sur le même spectromètre celle de la référence à 600.050.000 Hz.
b) Quelle substance est utilisée comme référence ? Pourquoi ?
c) Indiquer des groupements fonctionnels des protéines qui montrent un déplacement chimique trouvé en a).

Table A2.1 Extended chain ^1H chemical shifts for the 20 common amino acid residues^a

Residue	NH	αH	βH	Others	
Gly	8.39	3.97			
Ala	8.25	4.35	1.39		
Val	8.44	4.18	2.13	γCH_3	0.97, 0.94
Ile	8.19	4.23	1.9	γCH_2	1.48, 1.19
				γCH_3	0.95
				δCH_3	0.89
Leu	8.42	4.38	1.65, 1.65	γH 1.64	
				δCH_3	0.94, 0.90
Pro ^b		4.44	2.28, 2.02	γCH_2	2.03, 2.03
				δCH_2	3.68, 3.65
Ser	8.38	4.50	3.88, 3.88		
Thr	8.24	4.35	4.22	γCH_3	1.23
Asp	8.41	4.76	1.84, 1.75		
Glu	8.37	4.29	2.09, 1.97	γCH_2	2.31, 2.28
Lys	8.41	4.36	1.85, 1.76	γCH_2	1.45, 1.45
				δCH_2	1.70, 1.70
				ϵCH_2	3.02, 3.02
				ϵNH_3^+	7.52
Arg	8.27	4.38	1.89, 1.79	γCH_2	1.70, 1.70
				δCH_2	3.32, 3.32
				NH	7.17, 6.62
Asn	8.75	4.75	2.83, 2.75	γNH_2	7.59, 6.91
Gln	8.41	4.37	2.13, 2.01	γCH_2	2.38, 2.38
				δNH_2	6.87, 7.59
Met	8.42	4.52	2.15, 2.01	γCH_2	2.64, 2.64
				ϵCH_3	2.13
Cys	8.31	4.69	3.28, 2.96		
Trp	8.09	4.70	3.32, 3.19	2H	7.24
				4H	7.65
				5H	7.17
				6H	7.24
				7H	7.50
				NH	10.22
Phe	8.23	4.66	3.22, 2.99	2,6H	7.30
				3,5H	7.39
				4H	7.34
Tyr	8.18	4.60	3.13, 2.92	2,6H	7.15
				3,5H	6.86
His	8.41	4.63	3.26, 3.20	2H	8.12
				4H	7.14

^aData for the non-terminal residues X in tetrapeptides GGXA, pH 7.0, 35°C from K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley, 1986.

^bData for *trans*-Pro.

Examen Méthodes de la Biologie Structurale 2007/08
Partie : Spectroscopie de fluorescence
(Epreuve sans documents)

On dispose d'une sonde de fluorescence A en solution. Dans l'eau, la sonde A présente un maximum d'émission de fluorescence à 450 nm, un rendement quantique de fluorescence de 0,4 et un temps de vie de fluorescence de 3,2 ns. Dans l'hexane, cette même sonde présente un maximum d'émission à 380nm, un rendement quantique de 0,6 et un temps de vie de 6 ns.

- 1) En vous aidant d'un schéma avec les niveaux d'énergie, décrivez l'origine du déplacement spectral entre les deux solvants.
- 2) Calculer les constantes radiatives et non radiatives de la sonde dans les deux solvants. Que peut-on conclure sur l'origine des variations de rendement et de temps de vie?
- 3) La sonde est greffée à l'unique résidu cystéine d'une protéine X. Le spectre d'émission de la protéine marquée (X-A) présente un maximum à 445 nm. Le rendement quantique est de 0,4. Que peut-on conclure sur le résidu cystéine de X ?
- 4) On fait interagir la protéine X-A avec une protéine Y non marquée. Le maximum d'émission est alors de 405nm et le rendement quantique de 0,1. Quelles hypothèses sur l'interaction X/Y, peut-on émettre à partir de ces observations ?
- 5) On marque la protéine Y sélectivement sur son extrémité N-terminale par une sonde B et on fait interagir Y-B avec X-A. Le maximum d'émission de la sonde A est alors de 405 nm et son rendement de 0,05. Que peut-on conclure ?
- 6) On marque maintenant Y sélectivement sur son unique cystéine par une sonde C et on fait interagir Y-C avec X-A. Le maximum d'émission de la sonde a est alors de 445 nm et sont rendement de 0,4. Que peut-on conclure ?

On rappelle que $\phi = k_r/(k_r+k_{nr})$ et $\tau = 1/(k_r+k_{nr})$.

EPREUVE SANS DOCUMENTS
Partie Cristallographie Biologique

Exercice 1

Quels sont les critères de validation et de contrôle qualité d'une structure 3D issue de la cristallographie des rayons X sur des monocristaux.

Exercice 2. La méthode de la série isomorphe

- Donnez les hypothèses de base de cette méthode.
- Phasage « SIR » : on dispose d'un espace natif et d'un dérivé lourd isomorphe. La phase de chaque réflexion peut prendre deux valeurs possibles notées α_1 et α_2 .
 - Rappelez les expressions permettant de calculer α_1 et α_2 .
 - en appelant α_{vraie} la phase exacte de la réflexion, donner les relations reliant α_1 et α_2 à α_{vraie} .

Exercice 3. La diffusion anormale

- Donnez l'expression permettant de calculer le facteur de structure d'une réflexion hkl en fonctions des paramètres atomiques dans le cas où tous les atomes ont une contribution anormale.
- Présentez de manière qualitative et succincte l'intérêt de la diffusion anormale pour le phasage des réflexions (Il n'est pas demandé de développer les mathématiques correspondantes).

Exercice 4

- Donnez les principes de base du processus connu sous le terme d'affinement d'une structure cristallographique. On pourra illustrer la réponse à cette question par un schéma synthétique.
- Dans ce processus d'affinement, quels sont les problèmes spécifiques aux macromolécules biologiques ? Comment sont-ils pris en compte ?
- Quelles différences faites-vous entre le R_{crist} et le R_{libre} ? Quelles pourraient être les origines d'une différence importante entre le R_{crist} et le R_{libre} ?