## **Cours Biochimie I**

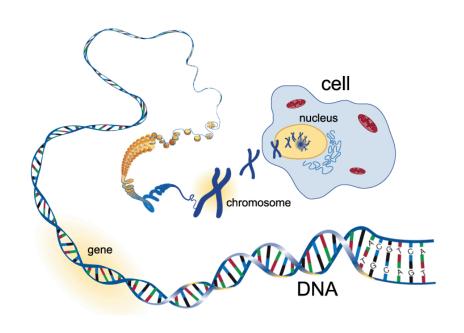
#### Leçon 4: Structure de la DNA et RNA

Leçon	Subject	Page en Stryer	
1	Introduction en biochimie / classes de biomolécules / aminoacides	4-17 (1.2, 1.3), 25- 40 (2.1, 2.2)	
2	Composition et structure des protéines	40-59 (2.3-2.6)	
3	Exploration des protéines et des protéomes	65-90 (3.1-3.3), 93-101 (3.5, 3.6)	
4	Structure de la DNA et RNA	107-119 (4.1-4.3)	
5	Explorer les gènes et les génomes	134-144 (5.1, 5.2 premières 3 pages)	
6	Synthèse des protéines / expression recombinante	117-119 (4.3), 119- 127 (4.4), 142-148 (5.2)	



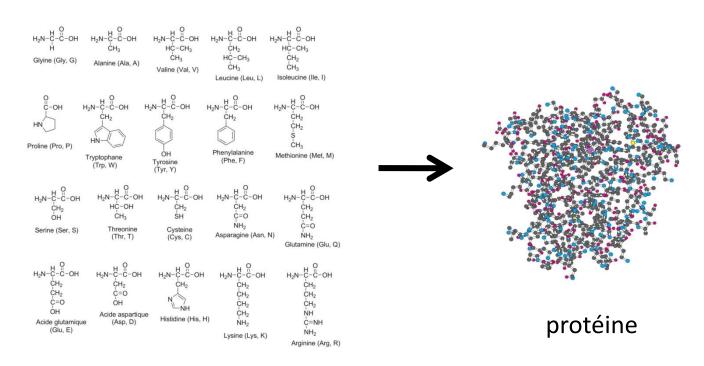
## Leçon 4

- Composition du DNA
  - Bases, sucres, phosphates
- Découverte du DNA
  - Histoire
  - Expériences importantes
- Structure du DNA
- DNA réplication, méthode de PCR
- Flux de l'information



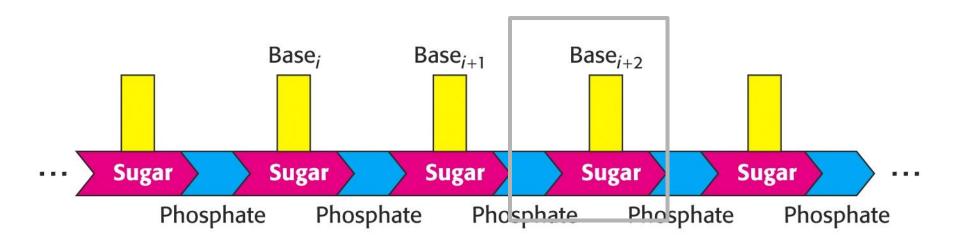
## Composition du DNA

#### Quel sont les composants du DNA?

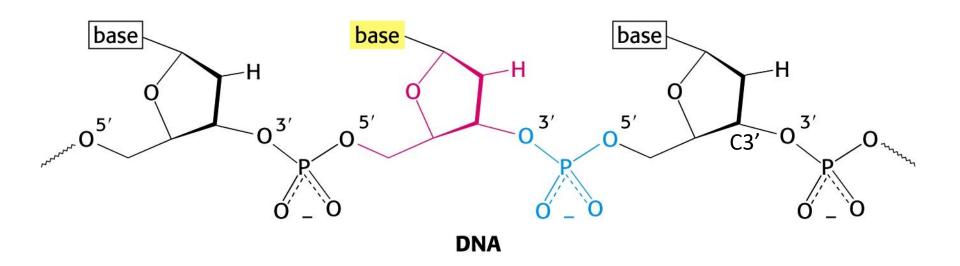


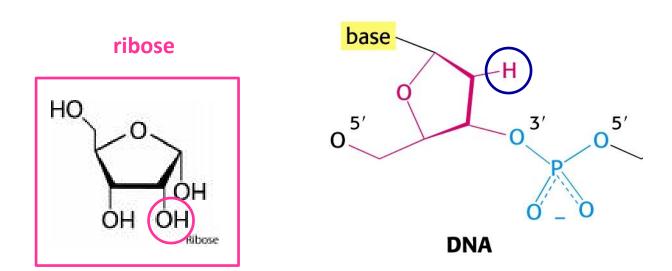
aminoacides

#### Bases, sucres et phospates

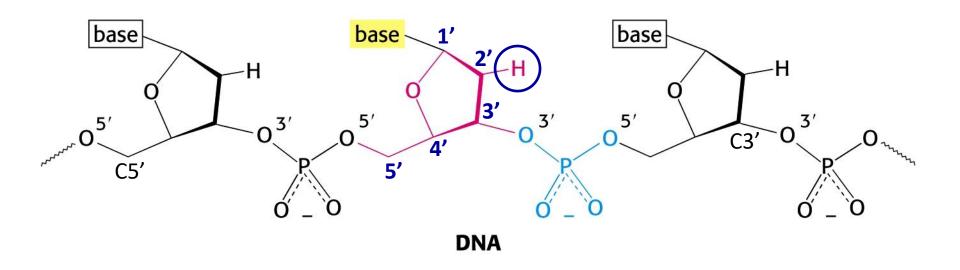


- Long polymère linéaire
- Un squelette invariant: sucres reliés par des phosphates
- Bases variantes
- Un monomère = nucléotide

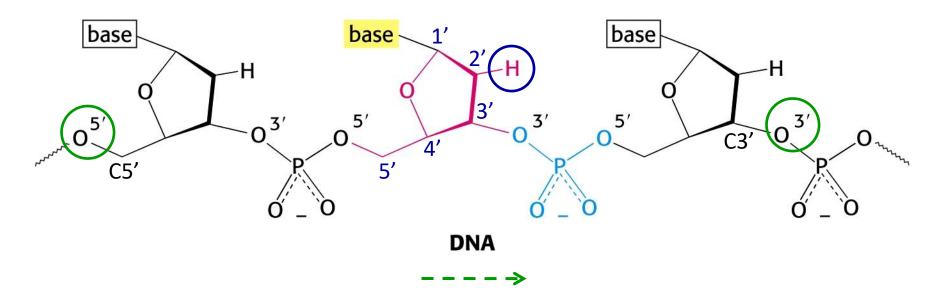




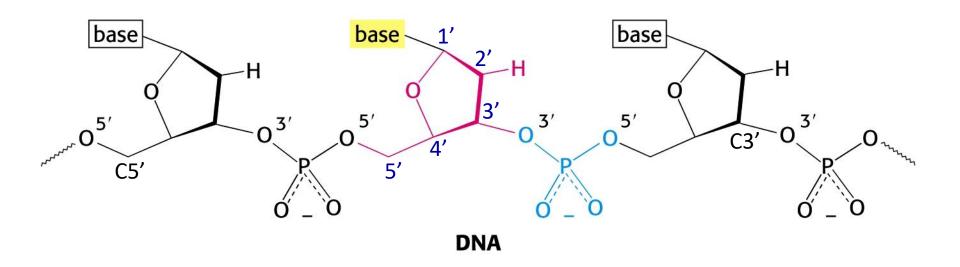
• Sucre: déoxyribose -> acide déoxyribonucléique (ADN)



- Sucre: déoxyribose -> acide déoxyribonucléique (ADN)
- Nomenclature du ribose: carbone 1', 2', 3', 4', 5'

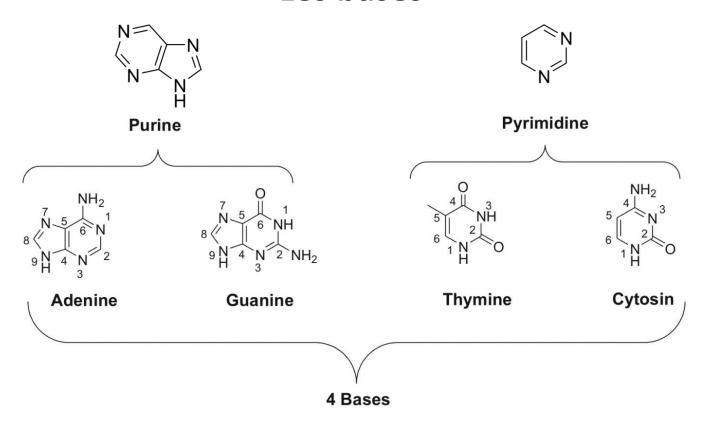


- Sucre: déoxyribose -> acide déoxyribonucléique (ADN)
- Nomenclature du ribose: carbone 1', 2', 3', 4', 5'
- On dessine le DNA dans la direction 5' → 3'



Quelles sont les bases?

#### Les bases



#### L'adénine

adénine

#### L'adénine

$$N = N$$
 $N = N$ 
 $N =$ 

Dans quelle position est-ce que l'adénine est connecté au ribose?

#### L'adénine

adén<u>os</u>ine

'base'

'nucléoside'

## La guanine

'base'

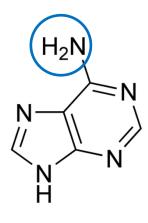
#### La guanine

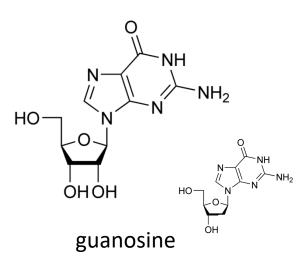
Quelle est la différence entre les bases guanine et adénine?

### **Les purines**

purine

guanine



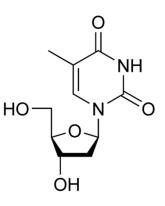


adénosine

#### La thymine et la cystosine

thymine

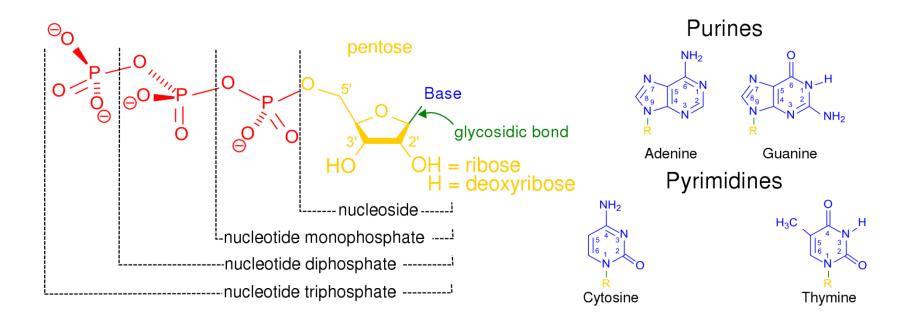
pyrimidine



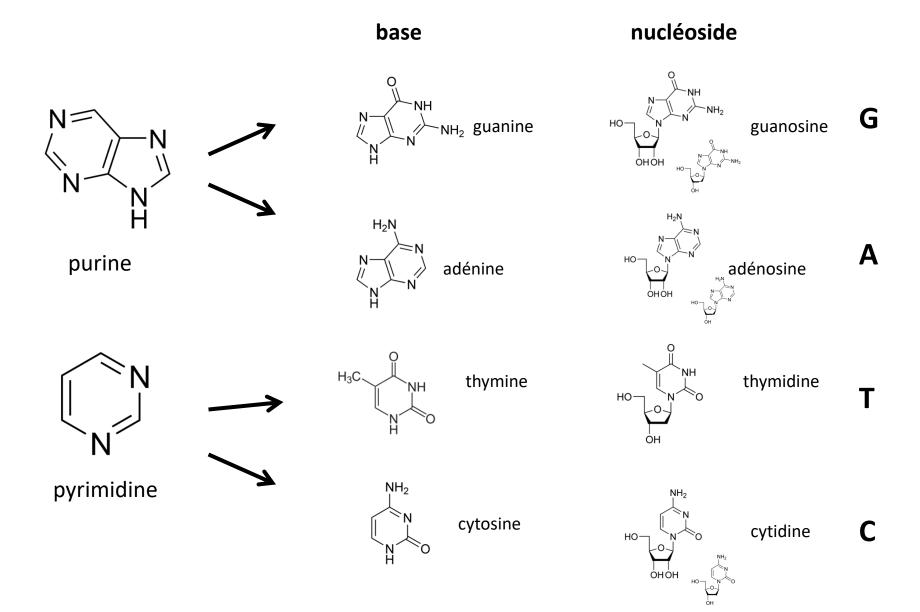
thymidine

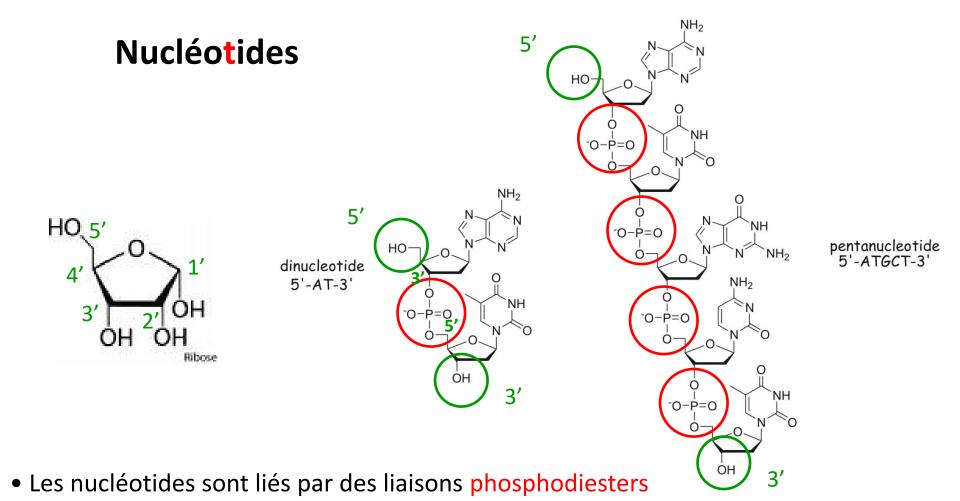
'nucléoside'

#### Nomenclature: bases, nucléosides et nucléotides



#### Nomenclature: bases, nucléosides et nucléotides





- Les liaisons phosphodiesters sont formées par les 3'-hydroxyles et les 5'-hydroxyles
- Le polymère a une polarité; par convention une séquence de DNA est écrite dans la direction  $5' \rightarrow 3'$  (p.ex. 5'-ATGCT-3')

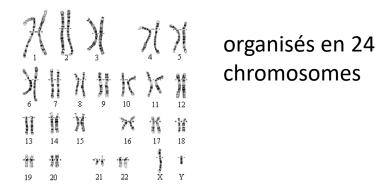
#### Le DNA code l'information génétique

Combien de nucléotides y-a-t-il dans le génome humain?

Quelle est la longueur du DNA?

#### Le DNA code l'information génétique

- Les molécules de DNA ont des longueurs frappantes:
  - Bactérie (p.ex. E.coli): 4'600'000 nucléotides
  - Génome humain: 3'000'000'000 nucléotides



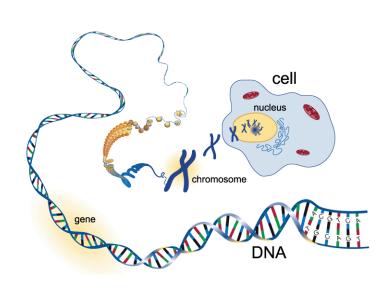
• Si une molécule de DNA pouvait être étirée, sa longueur serait de 30 cm!

### Découverte du DNA

- Composition du DNA
  - Bases, sucres, phosphates



- Découverte du DNA
  - Histoire
  - Expériences importantes
- Structure du DNA
- DNA réplication, méthode de PCR
- Flux de l'information



## Découverte du DNA



#### Découverte du DNA ('nuclein') 1869



Découverte du DNA ('nuclein') en 1869 par Friedrich Miescher à Tübingen (il avait mit les nucleus des cellules leucocytes dans une solution basic et ensuite les fait précipiter avec une solution acide)



Figure 1.5 The laboratory at Tubingen where Mescher isolated nuclein (courtes) of the University of Tubingen Library, Tubingen, Federal Republic of Germany)

#### **Friedrich Miescher**



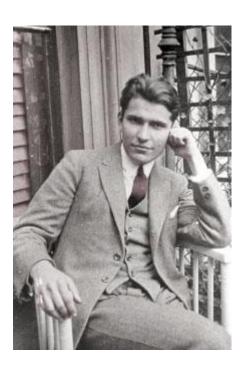
- Prix Friedrich Miescher (le prix le plus important en Suisse pour la recherche en biomédecine)
- Institut Friedrich Miescher (à Bale)

#### Structure chimique des nucléotides 1940s



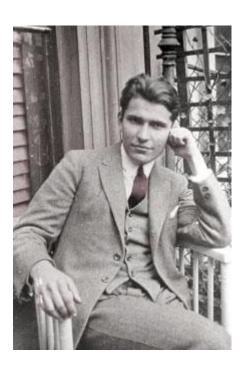
Lord Alexander Todd

Découverte de la connectivité du DNA (5'-3'). Prix Nobel en 1957



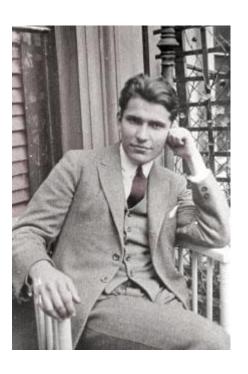
Base compositions experimentally determined for a variety of organisms Species A:THuman being 1.00 Salmon 1.02 Wheat 1.00 Yeast 1.03 Escherichia coli 1.09 Serratia marcescens 0.95

**Erwin Chargaff** 



Base compositions experimentally determined for a variety of organisms Species A:TG:CHuman being 1.00 1.00 Salmon 1.02 1.02 Wheat 1.00 0.97 Yeast 1.03 1.02 Escherichia coli 1.09 0.99 Serratia marcescens 0.95 0.86

**Erwin Chargaff** 



GABLE 5.1 Base compositions experimentally determined for a variety of organisms					
Species	A:T	G:C	A:G		
Human being	1.00	1.00	1.56		
Salmon	1.02	1.02	1.43		
Wheat	1.00	0.97	1.22		
Yeast	1.03	1.02	1.67		
Escherichia coli	1.09	0.99	1.05		
Serratia marcescens	0.95	0.86	0.70		

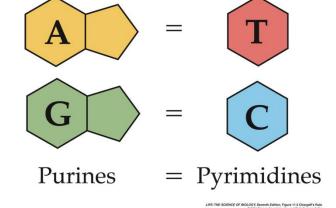
**Erwin Chargaff** 



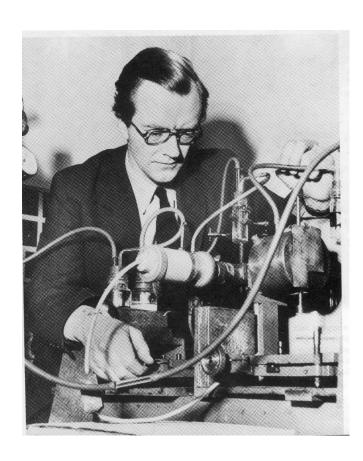
Base compositions experimentally determined for a variety of organisms A:TG:CSpecies A:GHuman being 1.00 1.00 1.56 Salmon 1.02 1.02 1.43 Wheat 1.00 0.97 1.22 Yeast 1.03 1.02 1.67 Escherichia coli 1.09 0.99 1.05 Serratia marcescens 0.86 0.70 0.95

#### **Erwin Chargaff**

Le ratio de A:T et G:C est toujours proche de 1; indépendamment de l'organisme

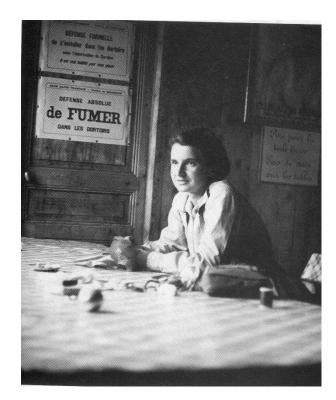


#### X-ray structure of DNA 1953



**Maurice Wilkins** 

At the time professor at Kings College Prix Nobel en 1962

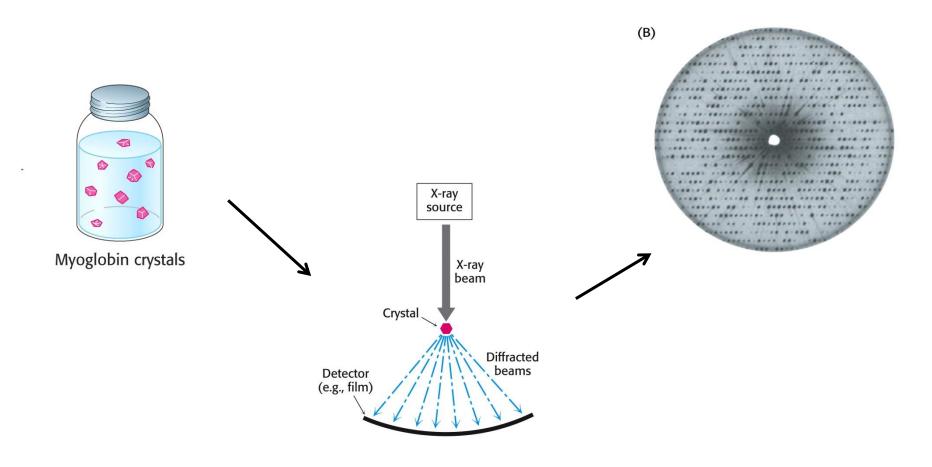


**Rosalind Franklin** 

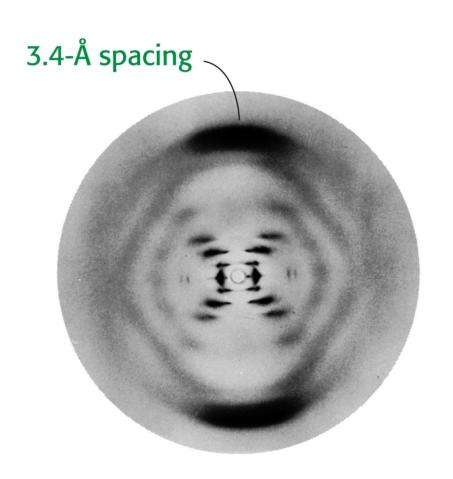
At the time researcher at Kings College

## Structure tridimensionnelle d'une protéine

Cristallographie par rayons X



#### X-ray structure of DNA



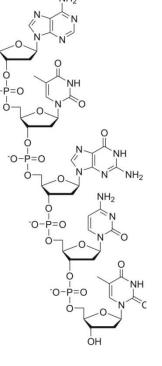
- Diffraction de rayons X
   par une fibre de DNA
- Structure hélicoïdale régulière
- Répétitive dans des unités de 3.4 Å

# Découverte de la structure du DNA par James Watson et Francis Crick (1953)



 Deux brins polynucléotidiques s'enroulent

Les bases irrégulières sont à l'extérieur de l'hélice?



# Découverte de la structure du DNA par James Watson et Francis Crick (1953)



- Les squelettes sucre-phosphate sont à l'extérieur (→ pas de répulsions éléctrostatiques!)
- Les bases sont à l'intérieur!

Comment une structure aussi régulière est-elle capable de s'accommoder si les bases à l'intérieur sont si différentes?

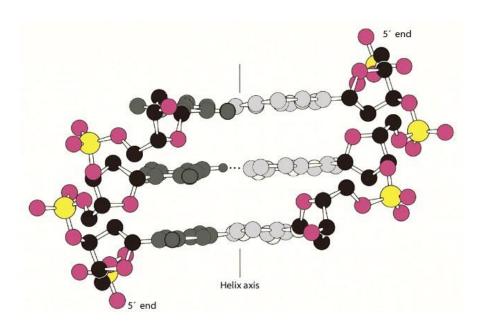
$$H_3C$$
  $NH$  thymine

### H<sub>2</sub>N N N N adénine

$$H_3C$$
  $NH$  thymine

### Hélice de DNA

(vue latérale; 3 paires de bases)

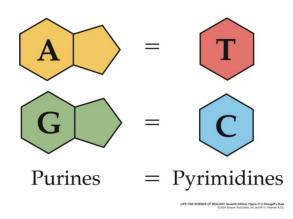


# pyrimidine Hélice de DNA (vue de haut) purine



La structure de DNA peut expliquer les résultats de Erwin Chargaff

Species	A:T	G:C	A:G
Human being	1.00	1.00	1.56
Salmon	1.02	1.02	1.43
Wheat	1.00	0.97	1.22
Yeast	1.03	1.02	1.67
Escherichia coli	1.09	0.99	1.05
Serratia marcescens	0.95	0.86	0.70

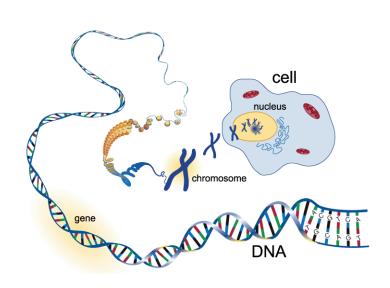


## Structure du DNA

- Composition du DNA
  - Bases, sucres, phosphates
- Découverte du DNA
  - Histoire
  - Expériences importantes



- Structure du DNA
- DNA réplication, méthode de PCR
- Flux de l'information



### La double-hélice du DNA

Les deux chaines sont assemblées par des liaisons hydrogène entre les pairs de bases; G-C, A-T, purine-pyrimidine

Quelle est l'énergie d'une liaison hydrogène?

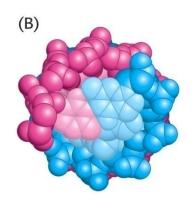
### La double-hélice du DNA

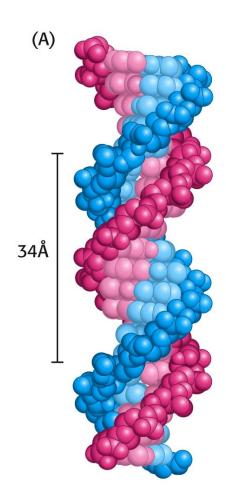
Les deux chaines sont assemblées par des liaisons hydrogène entre les pairs de bases; G-C, A-T, purine-pyrimidine

L'énergie d'une liaison hydrogène: 1-5 kcal /mol

### La double-hélice du DNA

- Deux brins hélicoïdales sont enroulés l'un autour de l'autre
- Sens d'enroulement: droite
- Les bases sont à l'intérieur, les phosphates et les deoxyriboses à l'extérieur
- La structure hélicoïdale se répète tous les 10 nucléotides (~ 34 Å)
- Le diamètre de l'hélice est ~ 20 Å





### **Dimensions du DNA**

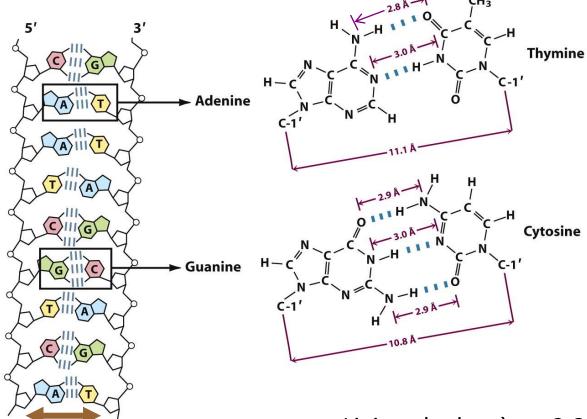
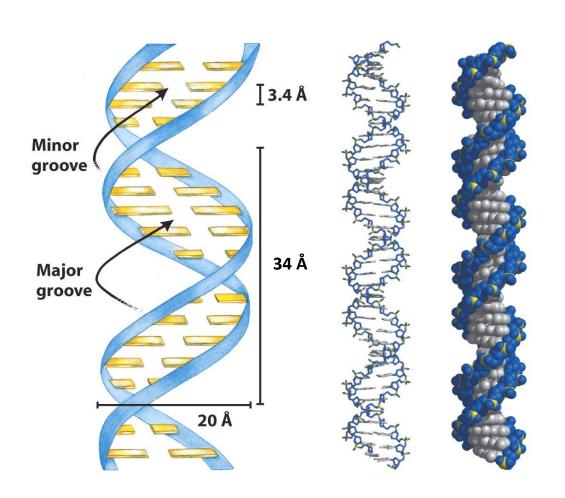


Figure 8-11
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

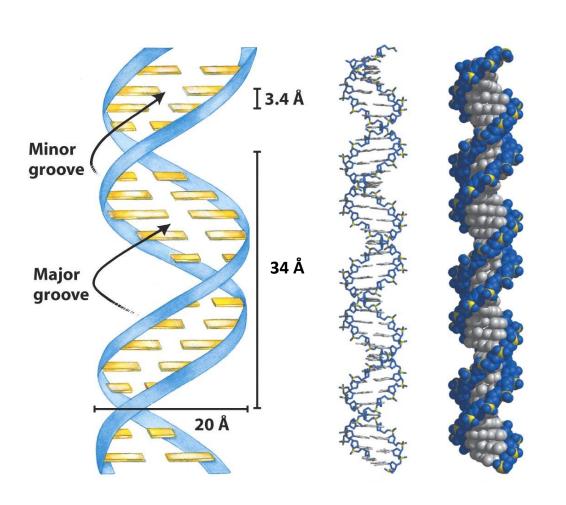
- Liaison hydrogène: 2.8 3.0 Å
- Distance des C1' (des sucres): 11.1 et 10.8

### **Dimensions du DNA**



Quelle est la longueur d'une double hélice avec deux brins de 100 nucléotides?

### **Dimensions du DNA**

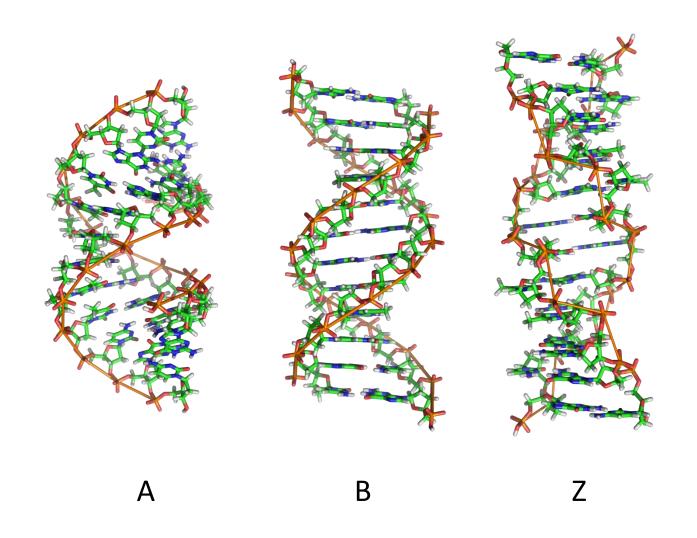


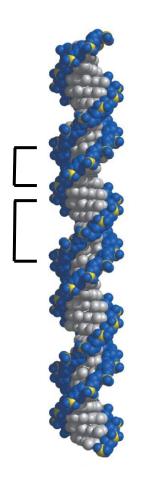
Quelle est la longueur d'une double hélice avec deux brins de 100 nucléotides?

- 100 pairs de bases
- Distance axial: 3.4 Å

 $\rightarrow$  340 Å = 34 nm

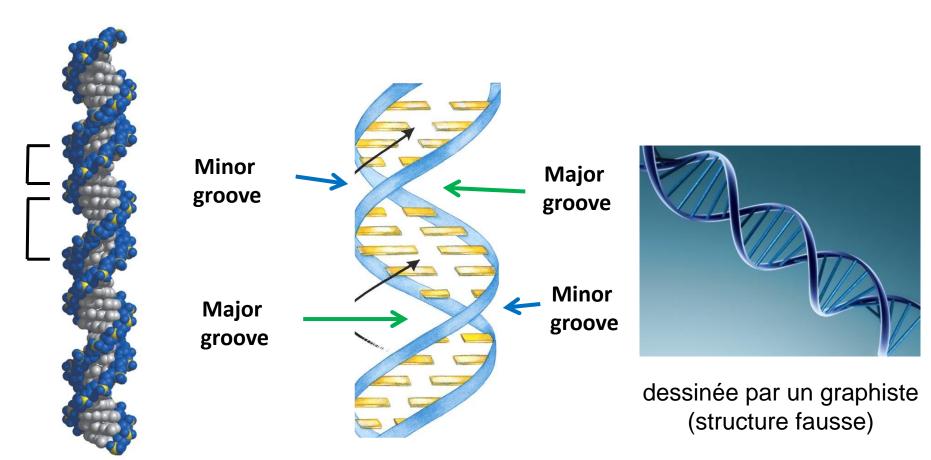
# Il y a des formes différentes d'hélices du DNA

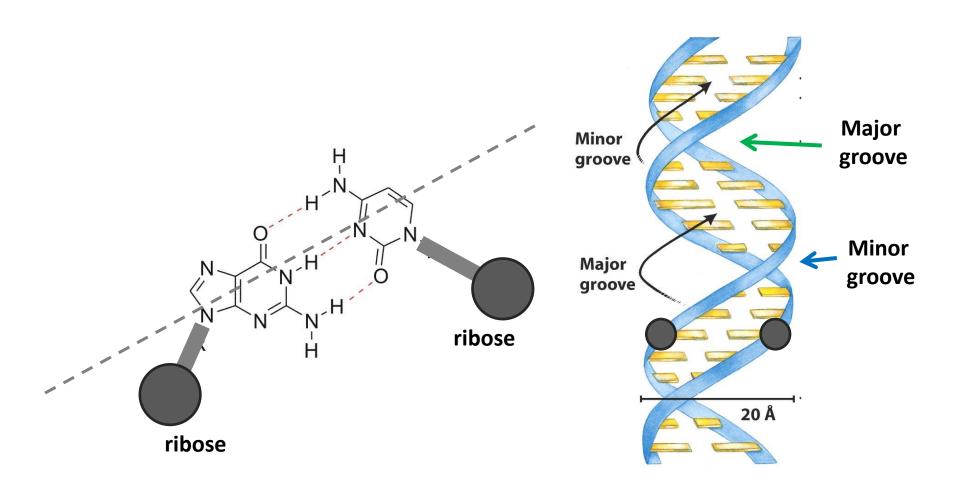


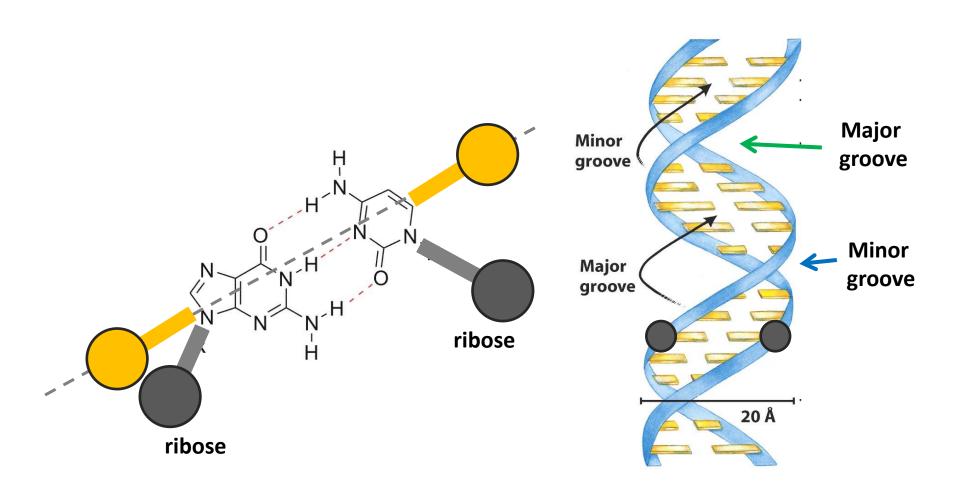


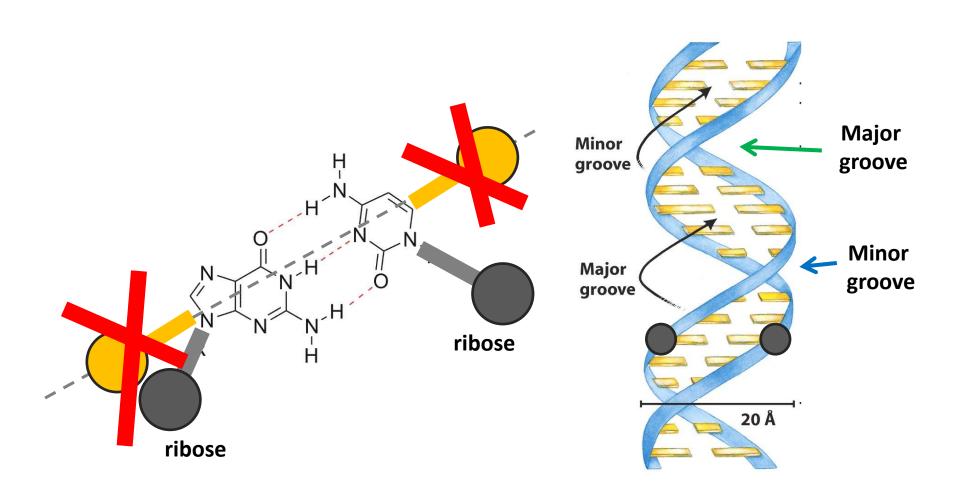


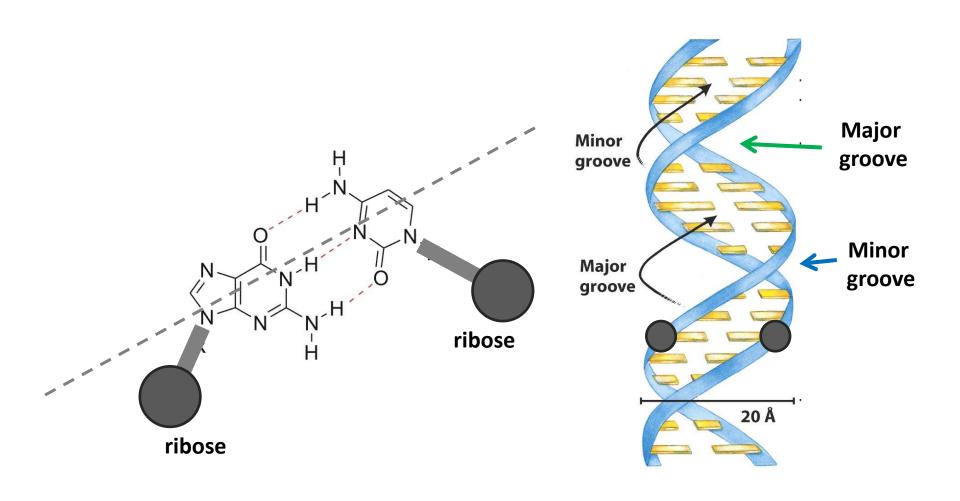
dessinée par un graphiste (structure fausse)

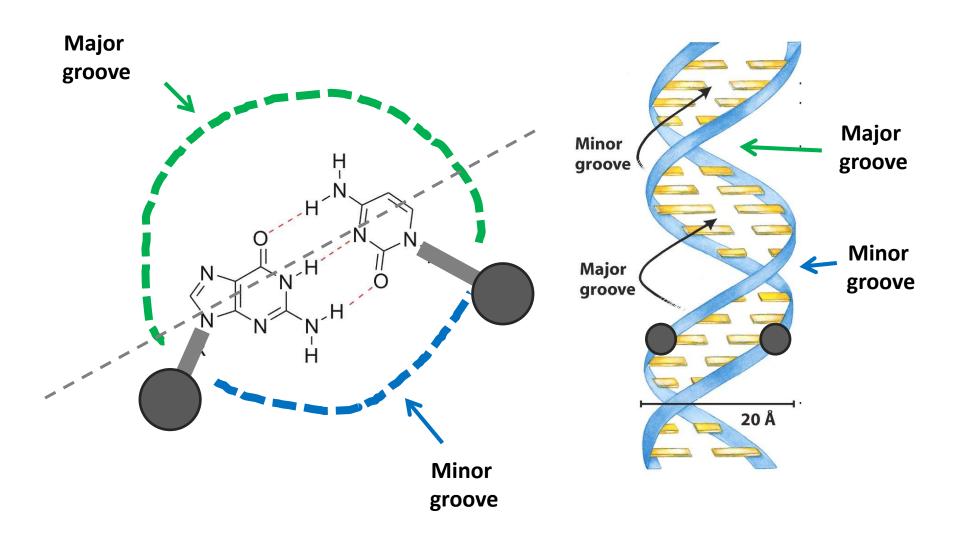


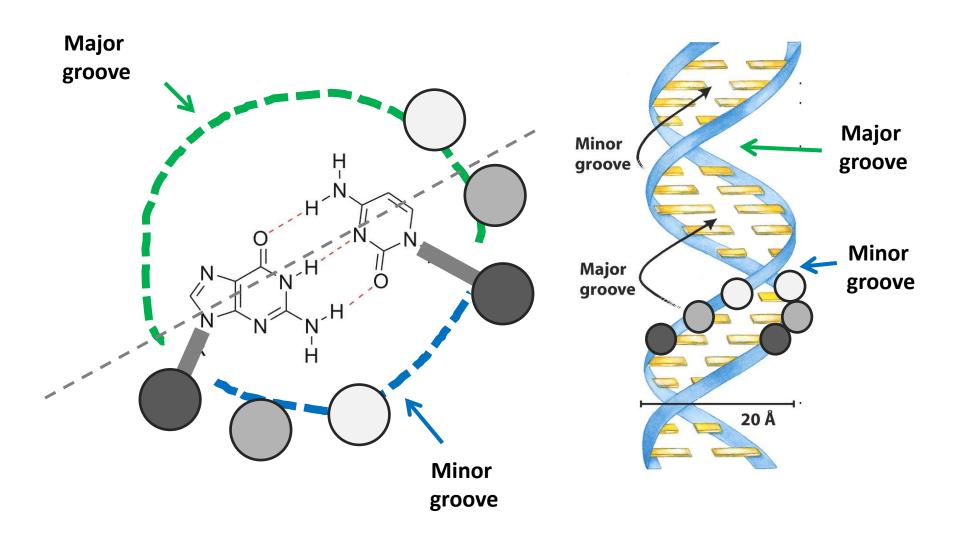












# La structure du DNA a donné des informations sur la fonction

J. D. Watson, F. H. C. Crick

« Molecular structure of nucleic acids »

Nature 171, 737-738 (1953)

....It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immedetiately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.....



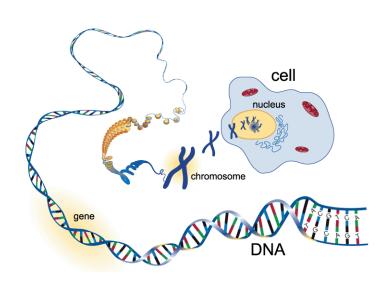
De quelle 'copying machanism' est-ce que Watson et Crick parle?

# DNA réplication, méthode PCR

- Composition du DNA
  - Bases, sucres, phosphates
- Découverte du DNA
  - Histoire
  - Expériences importantes
- Structure du DNA



- DNA réplication, méthode de PCR
- Flux de l'information



La séquence d'un brin de la double hélice permet de déduire la séquence de l'autre brin!

**Exemple:** 

5'-ATGGGC-3'

La séquence d'un brin de la double hélice permet de déduire la séquence de l'autre brin!

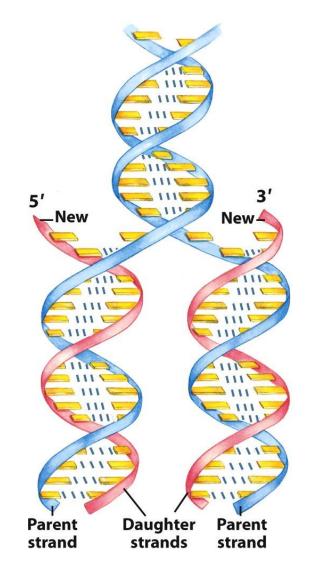
### **Exemple:**

La séquence d'un brin de la double hélice permet de déduire la séquence de l'autre brin!

### **Exemple:**

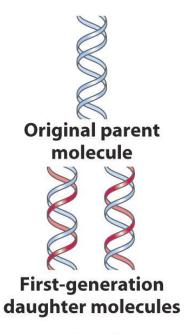
 La séquence d'un brin de la double hélice permet de déduire la séquence de l'autre brin!
 Exemple:

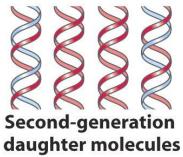
- La séparation des deux brins peut fournir deux matrices
- Deux nouvelles double hélices peuvent être synthétisées



Comment est-ce qu'on pourrait vérifier si cette hypothèse est correcte?

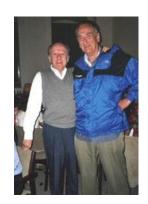
### Réplication semi-conservative





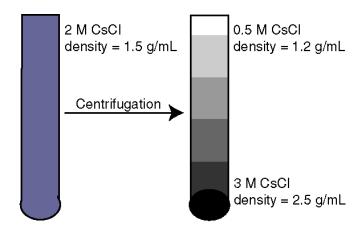
# **Expérience de Matthew Meselson et Franklin Stahl:**

- Marquer le DNA de bactérie parental avec l'isotope <sup>15</sup>N (en cultivent E.coli dans un milieu avec <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl)
- 2. Transférer les bactéries brusquement dans un milieu avec <sup>14</sup>N.
- 3. Analyser la distribution de <sup>15</sup>N et <sup>14</sup>N

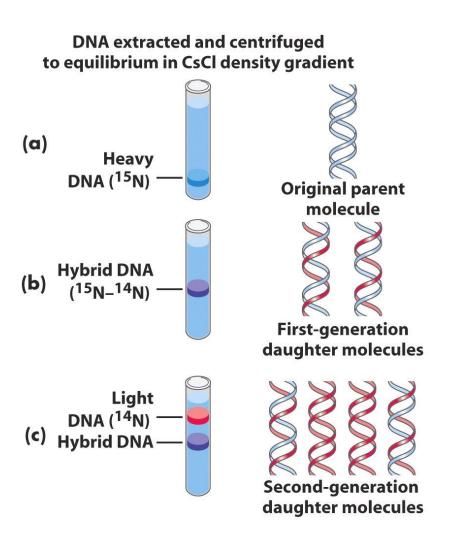


# Sédimentation à l'équilibre en gradient de densité

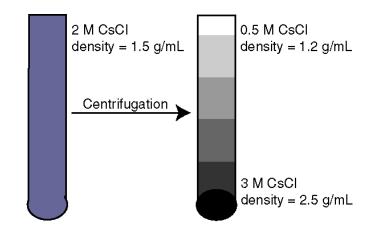
### clorure de césium



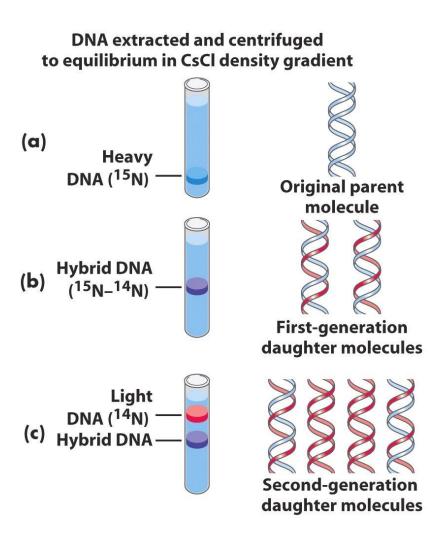
### Sédimentation à l'équilibre en gradient de densité



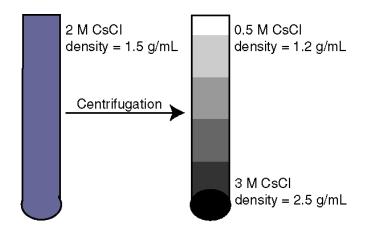
#### clorure de césium

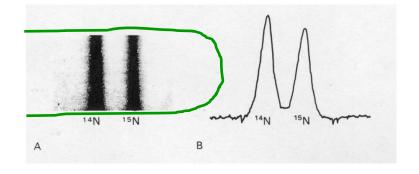


# Sédimentation à l'équilibre en gradient de densité



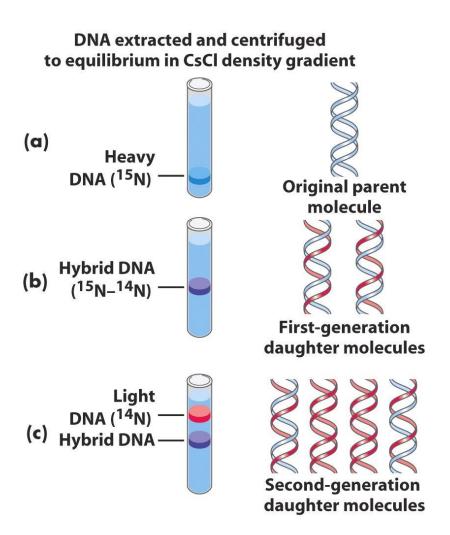
#### clorure de césium

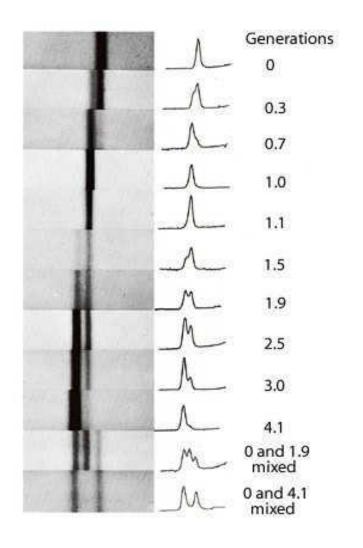


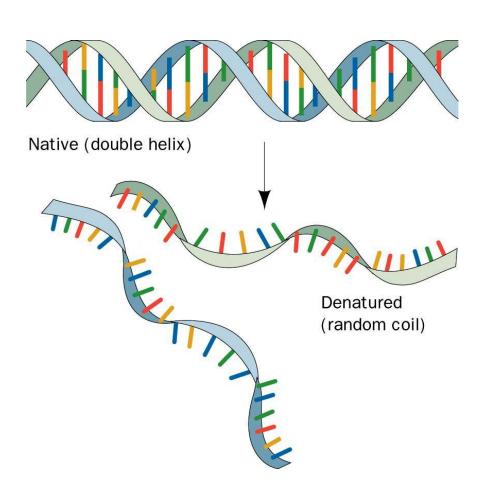


Meselson & Stahl PNAS 44, 671 (1956)

### Réplication semi-conservative

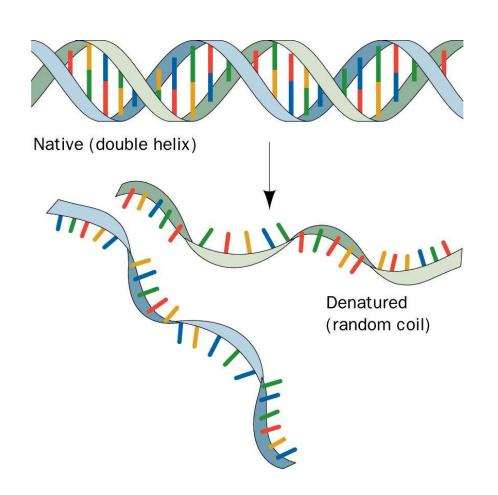




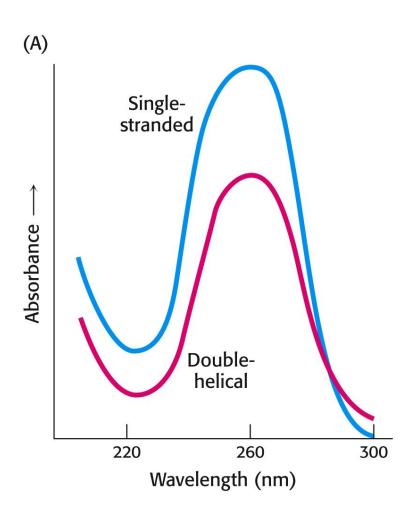


Pour la réplication et les autres processus, les deux brins doivent être séparés

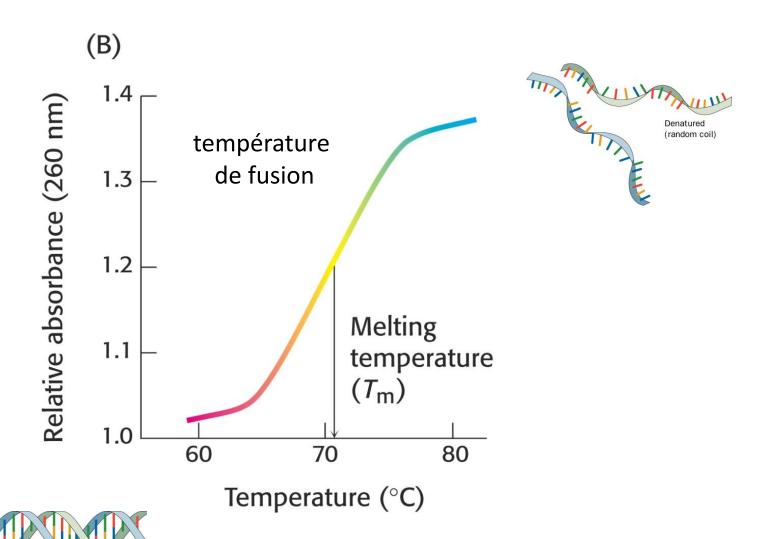
Comment est-ce que les brins de la double hélice peuvent être séparés?

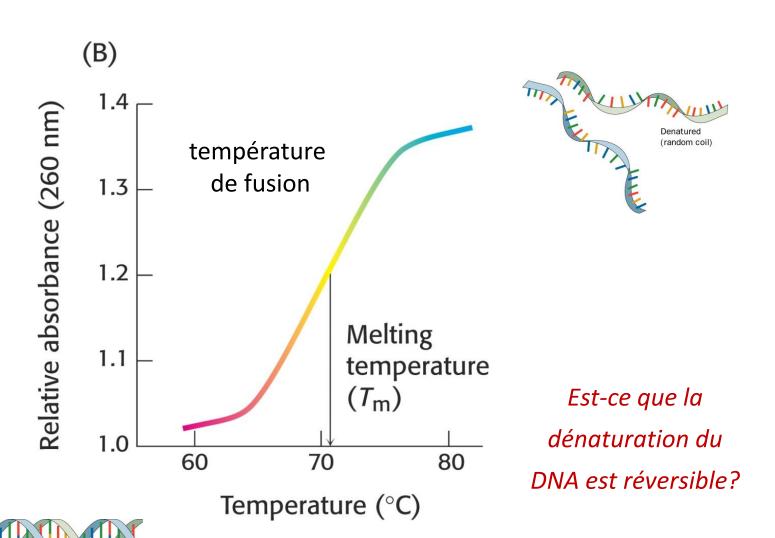


- Méthodes de séparation:
  - chaleur
  - acide (détruire les liaisons hydrogène)
- Dans les cellules, les brins sont dissociés par des enzymes en utilisant de l'énergie: hélicase

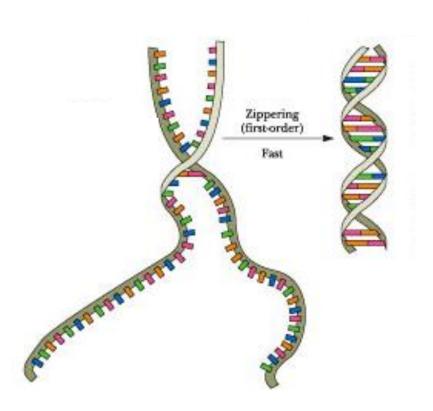


- Les bases forment des doubles hélices absorbant moins de lumière que les brins séparés
- L'absorption de la lumière est maximale à une longueur d'onde de 260 nm





## Renaturation des brins: hybridation



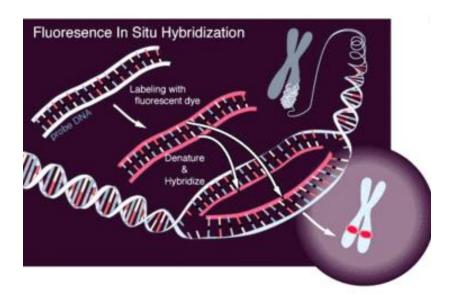
- Des brins complémentaires séparés peuvent se lier = hybridation
- L'hybridation est utilisée dans plusieurs méthodes.

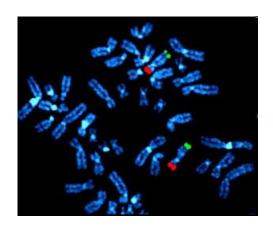
Exemple: Fluorescence In Situ Hybridation (FISH)

## Fluorescence In Situ Hybridation (FISH)



B 11 21 X T

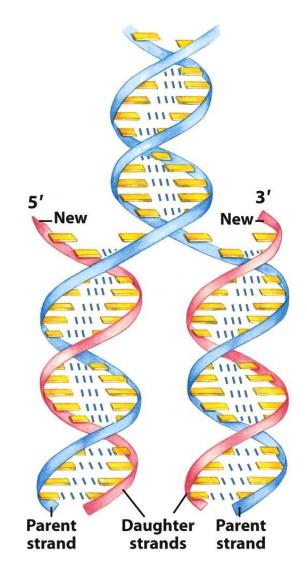




## **DNA** réplication

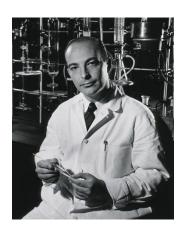
- Dans les cellules, les brins de DNA sont copiés (Meselson & Stahl)
- Les deux brins d'une double hélice peuvent être séparés

Comment est-ce que le processus de duplication marche dans les cellules?

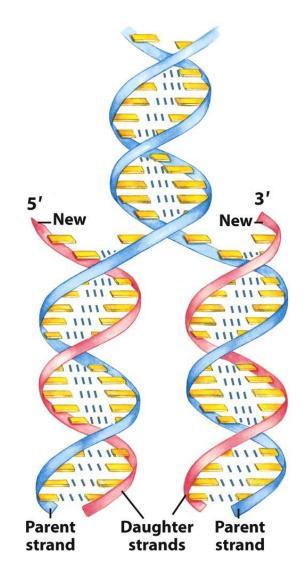


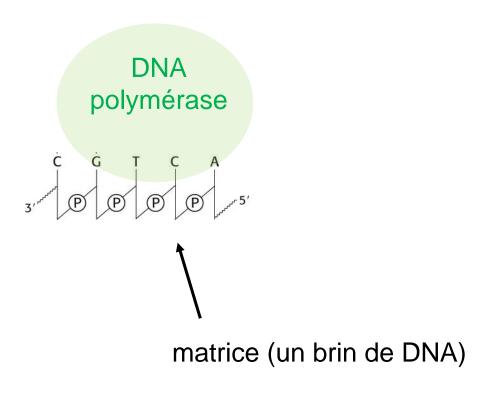
## **DNA** réplication

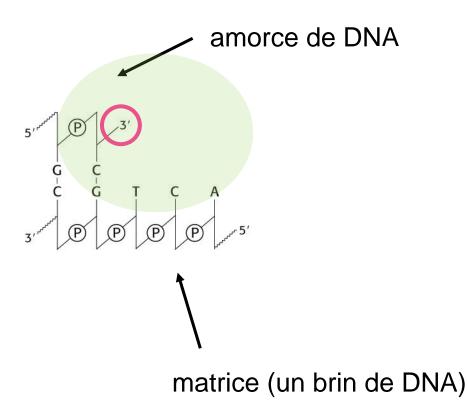
- Le DNA est répliqué par une enzyme:
   DNA polymérase
- En 1958, Arthur Kornberg a isolé la DNA polymérase de E. coli

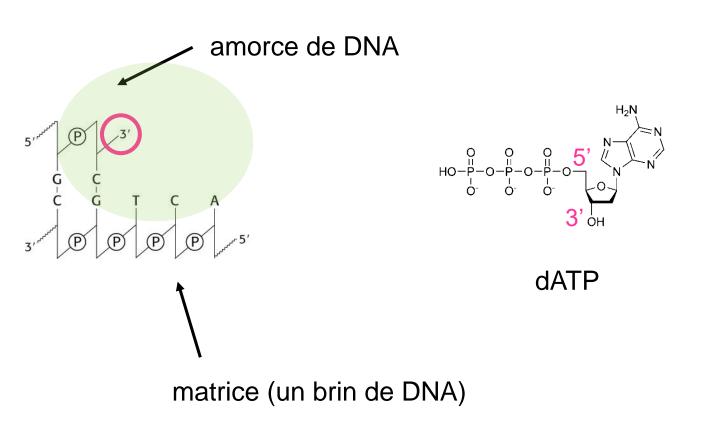


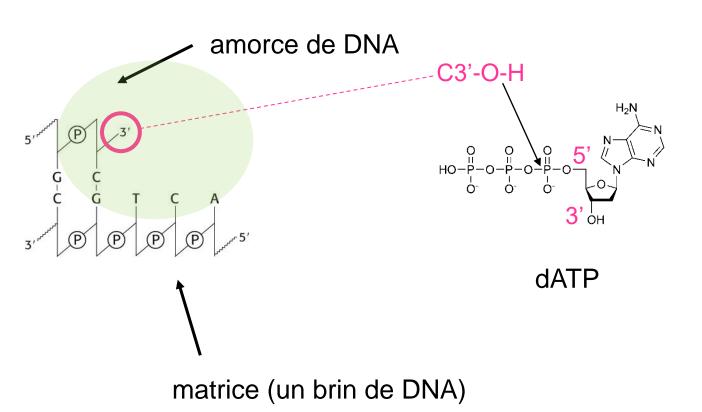
• Il a reçu le prix Nobel en 1959

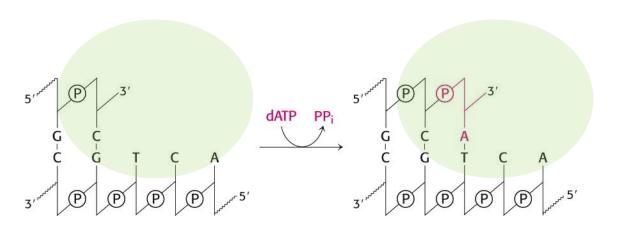




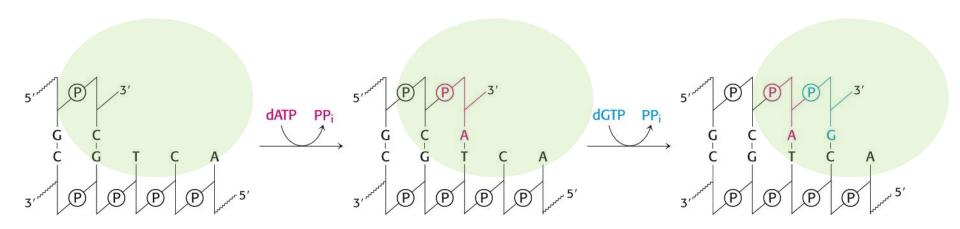






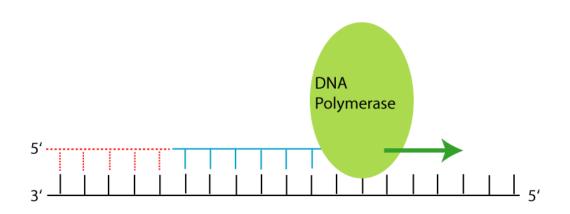


$$PP_{i} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & P_{i} & 0 & P_{i} & 0 \end{bmatrix}^{4-1}$$

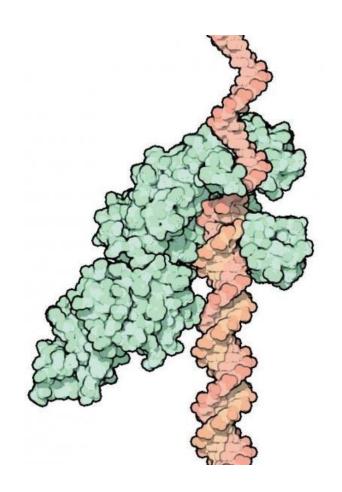


- DNA polymérase catalyse la ligation des nucleotides
- Élongation dans la direction 5' → 3'

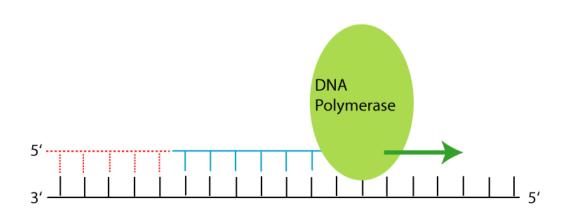
## **Réplication du DNA**



Quels réactifs sont nécessaire pour la réplication du DNA?

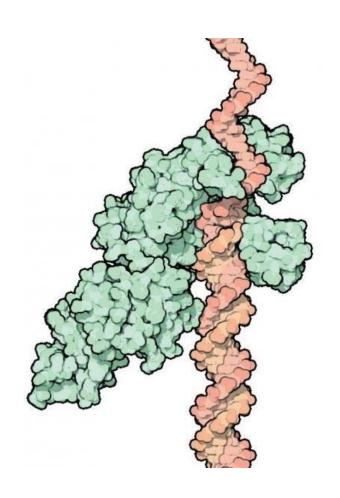


## Réplication du DNA

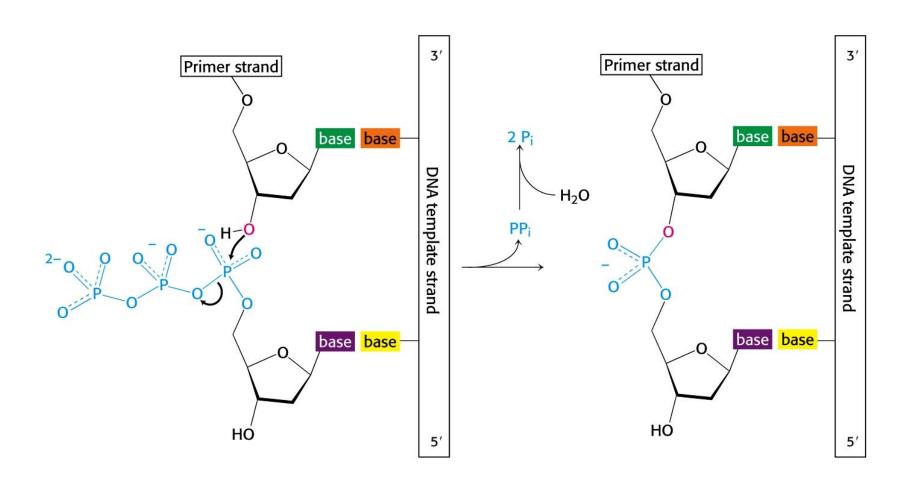


#### Réactifs:

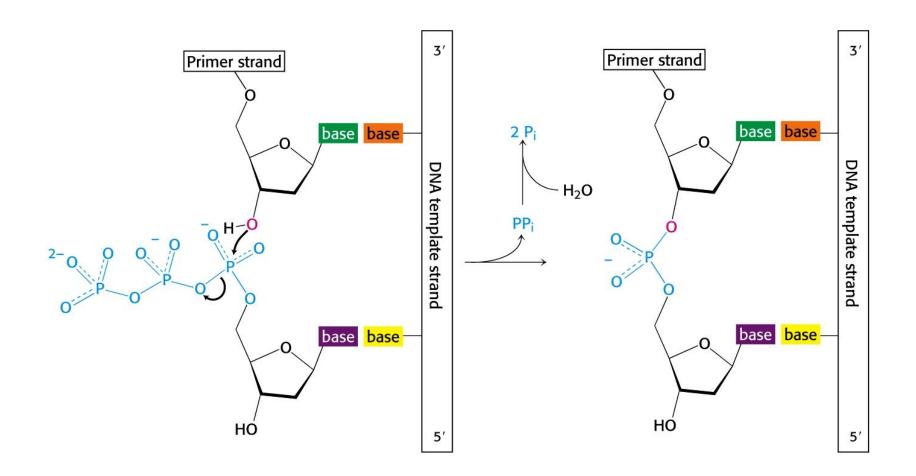
- matrice (brin de DNA)
- amorce de DNA ('primer')
- déoxinucléotides 5'-triphosphate
   (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- DNA polymérase



## Réplication du DNA: ligation des nucléotides

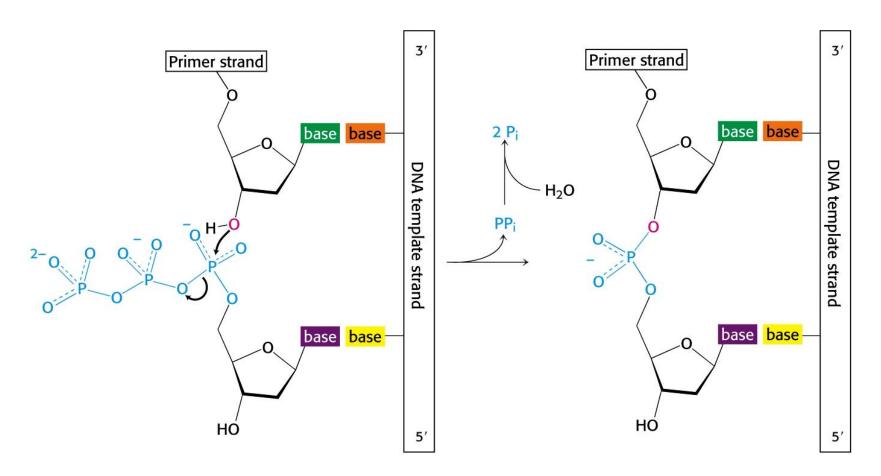


## Réplication du DNA: ligation des nucléotides



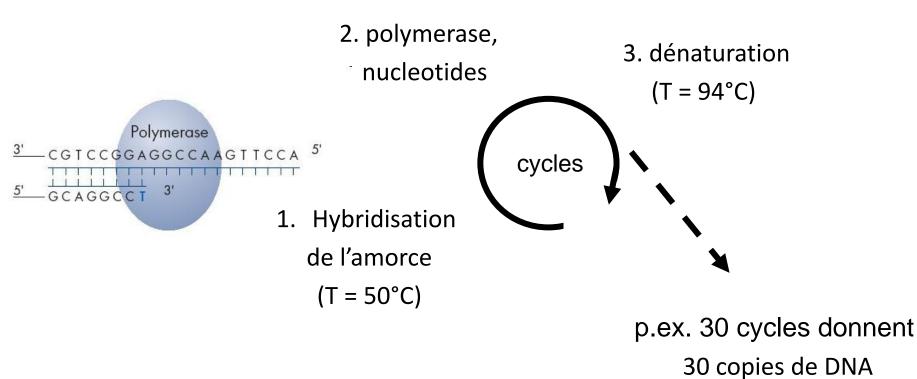
Combien d'erreurs est-ce que la DNA polymérase fait?

## Réplication du DNA: ligation des nucléotides

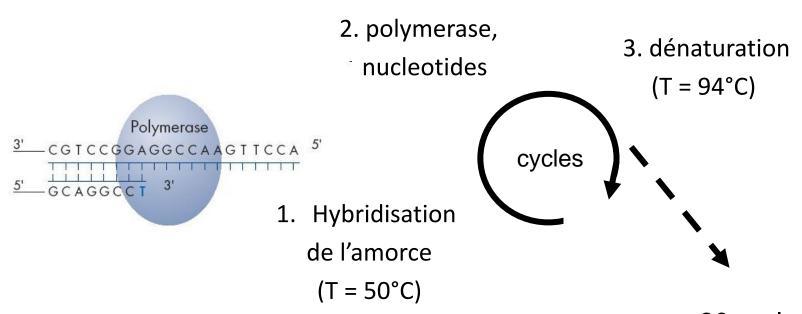


- La DNA polymérase a aussi une fonction « proof-reading »
- 1 erreur par 10<sup>8</sup> étapes d'élongation!!

# Copier des séquence de DNA au laboratoire avec la DNA polymérase

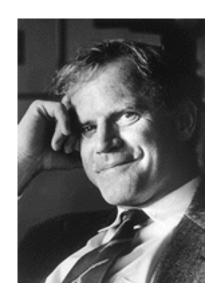


# Copier des séquence de DNA au laboratoire avec la DNA polymérase

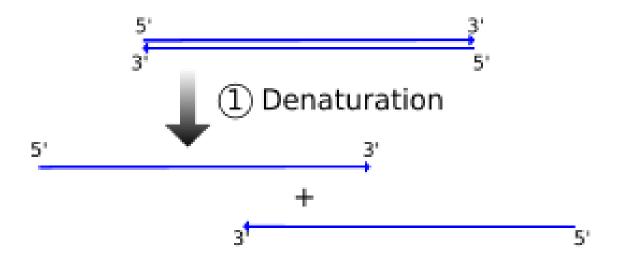


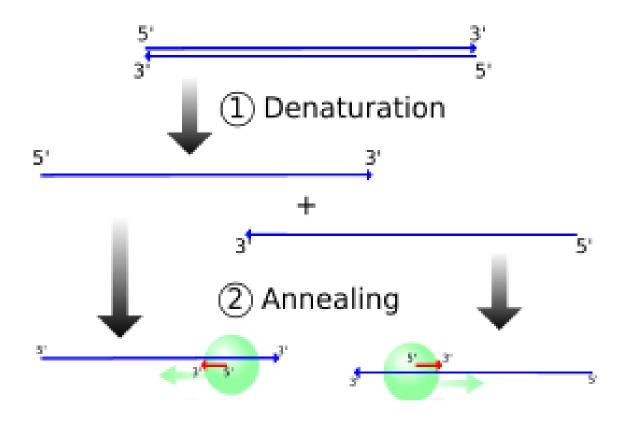
Comment pourrait-on produire de plus grandes quantités de DNA?

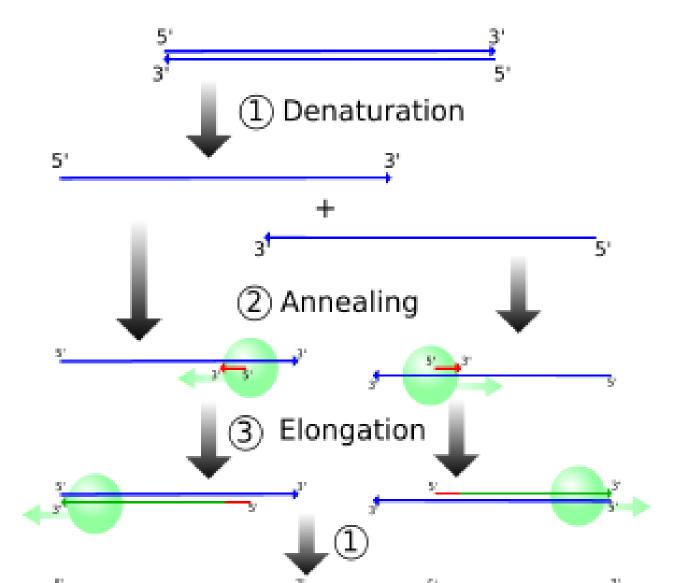
p.ex. 30 cycles donnent 30 copies de DNA

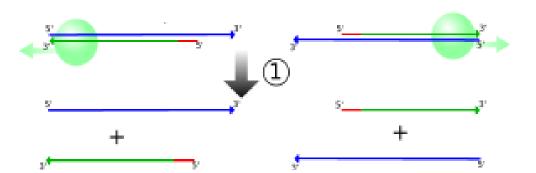


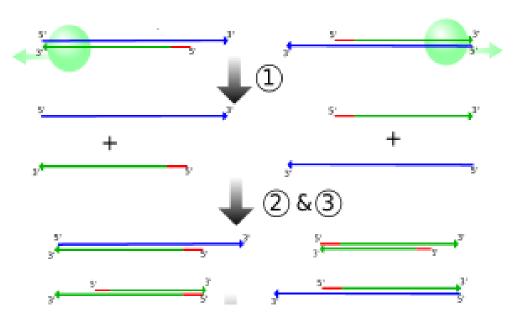
**Kary Mullis**Prix Nobel in 1993

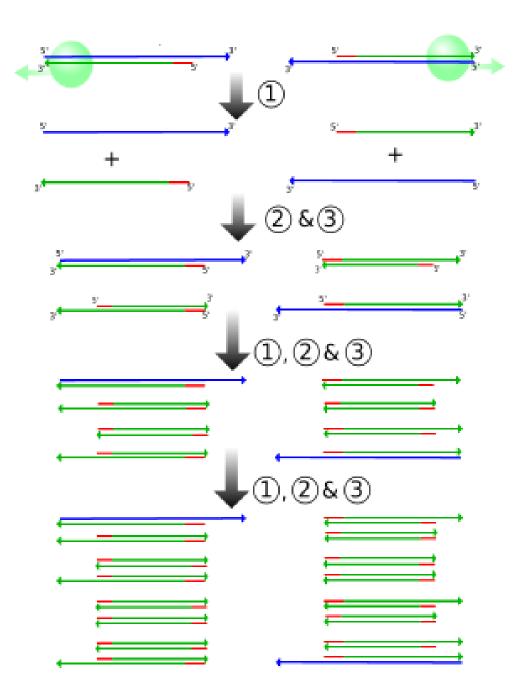












## **PCR vs réplication normale**

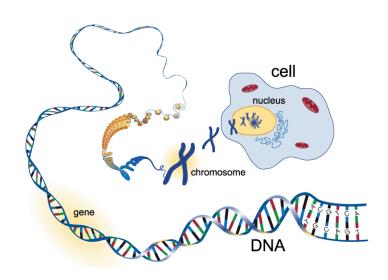
### Copies de DNA:

Cycles	PCR	Réplication normale
0	1	1
1	2	2
2	4	3
3	8	4
4	16	5
5	32	6
6	64	7
7	128	8
8	256	9
9	512	10
10	1024	11
••••	••••	••••

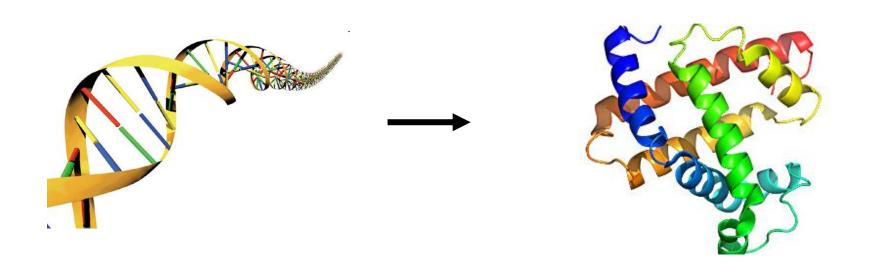
- Composition du DNA
  - Bases, sucres, phosphates
- Découverte du DNA
  - Histoire
  - Expériences importantes
- Structure du DNA
- DNA réplication, méthode de PCR

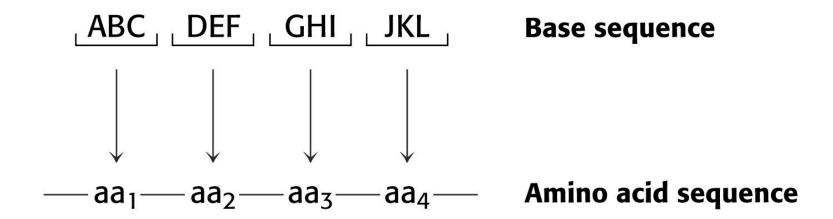


• Flux de l'information



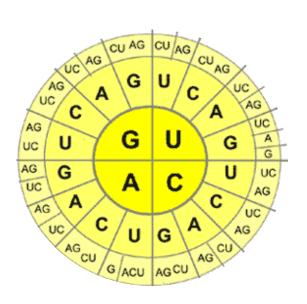
Comment est-ce que l'information contenue dans le DNA peut être transformée en protéines?



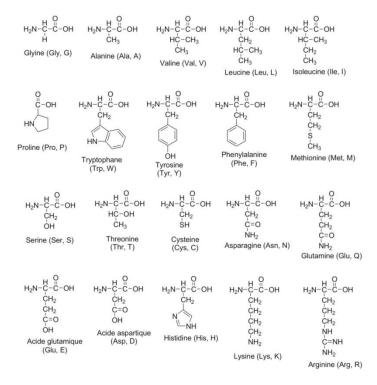


- Les aminoacides sont codés par des groupes de trois bases
- Le code n'a pas de ponctuation: ABCDEFGHI et pas ABC, DEF, GHI,

Combien de triplets de base différentes sont possible? p.ex. AAA, AAC, AAG, AAT, ACA, ACC, ....



$$4^3 = 64$$



## Le code génétique

TABLE 5.4	The	genetic	code
-----------	-----	---------	------

ABLE 5.4 The genetic code					
First position (5' end)	Second position			Third position (3' end)	
	U	C	Α	G	
	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
	Leu	D <sub>m</sub>	His	Arg	U
С	Leu	Pro	His	Arg	С
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln		G
	Ile	Thr	Asn	Ser	U
A	Ile	Thr	Asn	Ser	С
	Ile	Thr	Lys	ins	Α
	Met	Thr	Lys	Arg	G
	Val	Ala	Asp	Gly	U
G	Val	Ala	Asp	Gly	С
	Val	Ala	Glu	Gly	Α
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Note: This table identifies the amino acid encoded by each triplet. For example, the codon 5' AUG 3' on mRNA specifies methionine, whereas CAU specifies histidine. UAA, UAG, and UGA are termination signals. AUG is part of the initiation signal, in addition to coding for internal methionine residues.

#### p.ex. serine:

**TCT** 

**TCC** 

**TCA** 

**TCG** 

**AGT** 

**AGC** 

Le code génétique est presque universel

### Le code génétique

TABLE 5.4 The genetic code

First position (5' end)	Second position				Third position (3' end)
	U		A	G	
	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	С
	Leu	Ser	Stop	Stop	Α
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
	Leu	D <sub>w</sub>	His	Arg	U
С	Leu	Pro	His	Arg	С
	Leu	Pro	Gln	Arg	Α
	Leu	Pro	Gln	A-1	G
	Ile	Thr	Asn	Ser	U
Α	Ile	Thr	Asn	Ser	С
	Ile	Thr	Lys	1.5	Α
	Met	Thr	Lys	Arg	G
	Val	Ala	Asp	Gly	U
G	Val	Ala	Asp	Gly	С
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Note: This table identifies the amino acid encoded by each triplet. For example, the codon 5' AUG 3' on mRNA specifies methionine, whereas CAU specifies histidine. UAA, UAG, and UGA are termination signals. AUG is part of the initiation signal, in addition to coding for internal methionine residues.

p.ex. serine:

TCT

**TCC** 

TCA

**TCG** 

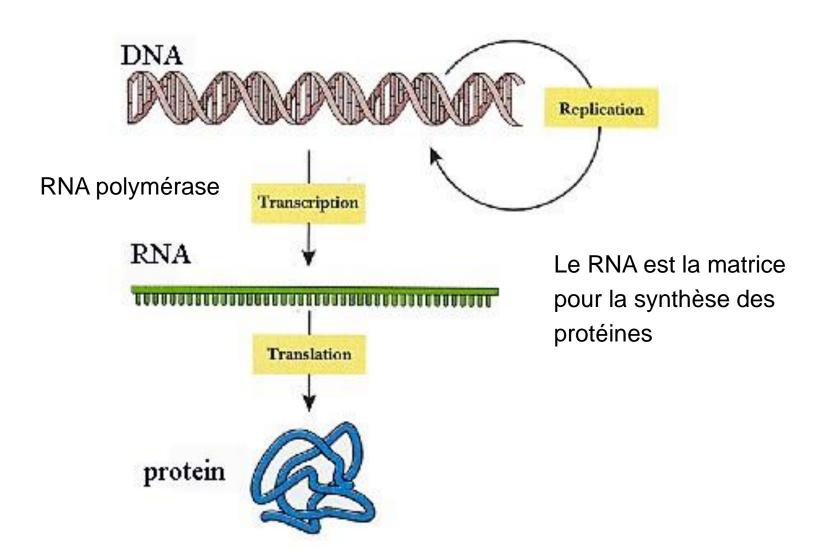
**AGT** 

**AGC** 

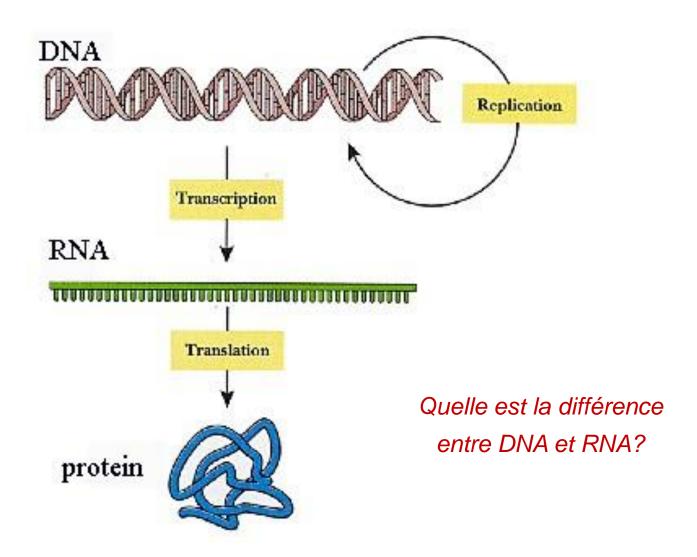
Le code génétique est presque universel

Comment est-ce que les codes de bases sont transformés en aminoacides?

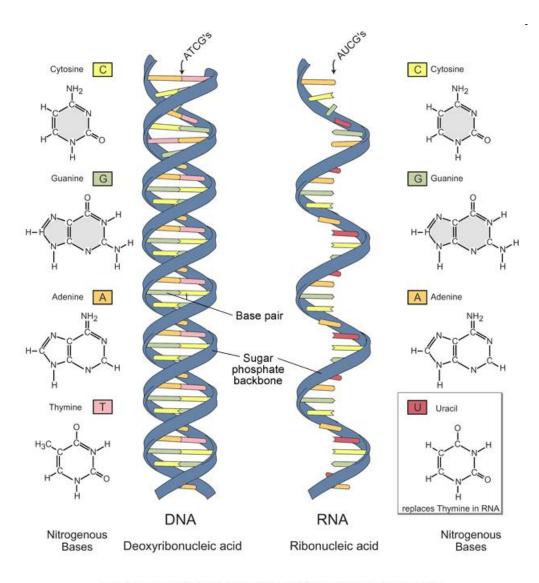
## DNA → RNA → protéine



## DNA → RNA → protéine



#### Les différences entre DNA et RNA



#### Structure:

• Le sucre:

DNA: deoxribose

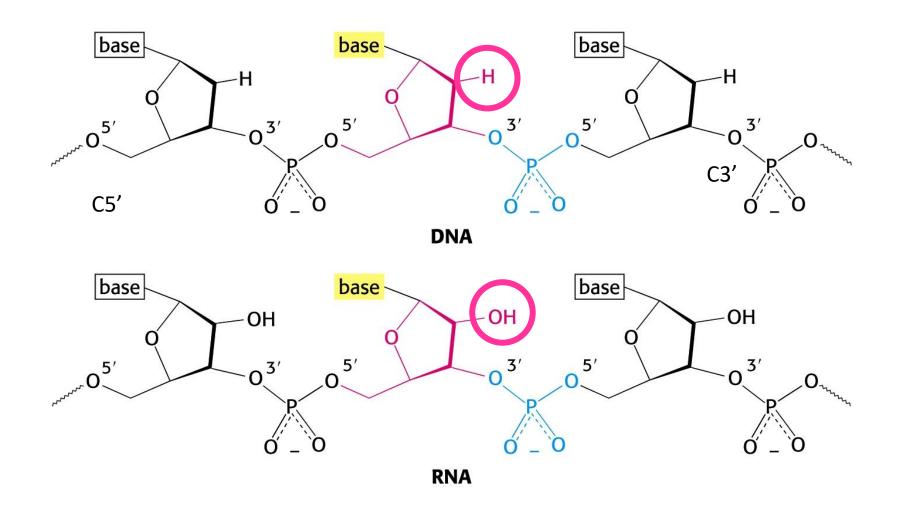
RNA: ribose

Les bases:

DNA: thymine

RNA: uracil

## Le squelette sucre-phosphate du DNA et du RNA



### Les bases de DNA et de RNA

**DNA** 

thymine

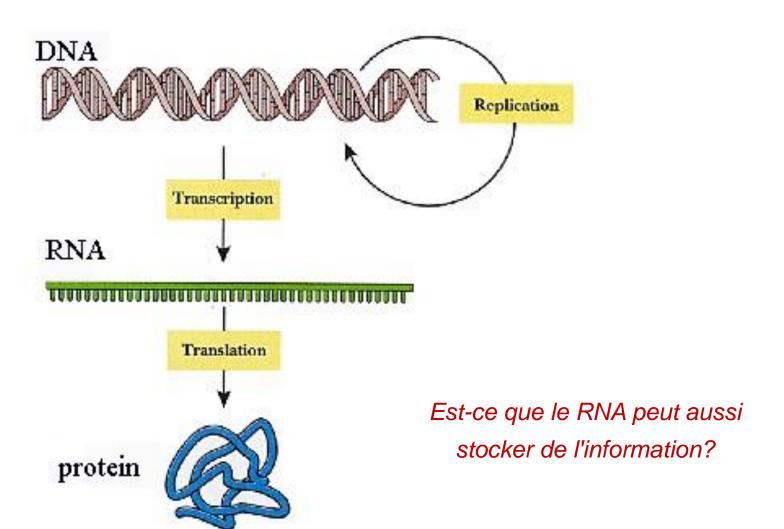
thymidine

**RNA** 

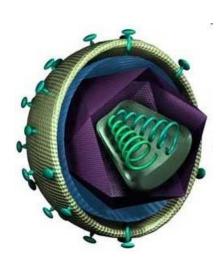
uracile

uridine

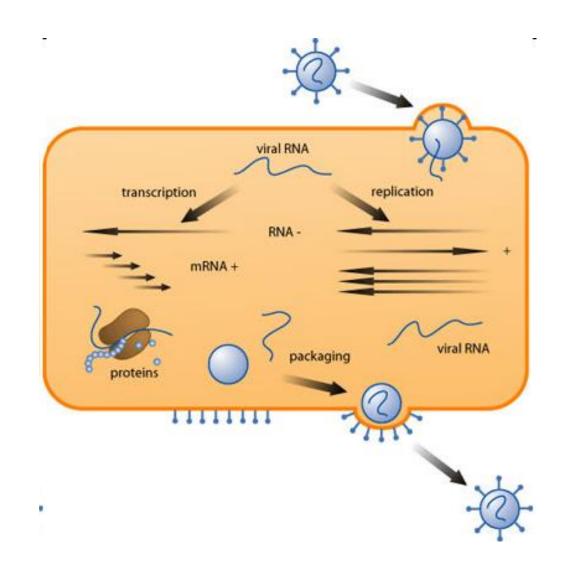
## DNA → RNA → protéine



## Virus de RNA

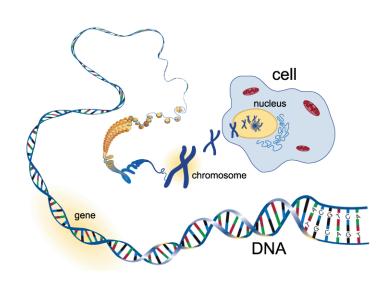


p.ex. VIH



## **DNA**

- Composition du DNA
  - Bases, sucres, phosphates
- Découverte du DNA
  - Histoire
  - Expériences importantes
- Structure du DNA
- DNA réplication, méthode de PCR
- Flux de l'information



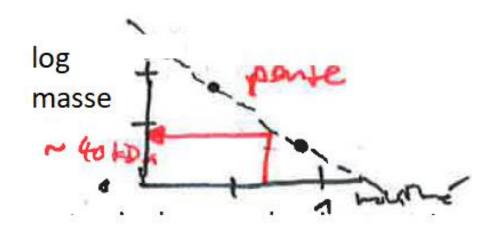
### Question 1

$$A = 1.796$$

Question 1

% lumière transmis: 1.6%

## Question 2



Log (masse) = -0.89 x (mobilité) + 5.28 m = 34.1 kDa

#### Question 3

Comparer les masses: ils sont différents  $\rightarrow$  chromatographie par gel filtration

Comparer les points isoélectriques: ils sont différents  $\rightarrow$  chromatographie par échange d'ions

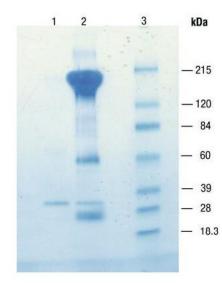
Cherchez si il existe des ligands (en pubmed, google, etc.)  $\rightarrow$  chromatographie d'affinité

### Question 4

Ligne 1: une protéine, environ 30 kDa, petit quantité

Ligne 2: environ 4 protéines, environ 200, 60, 30 et 25 kDa, une en grande quantité

Ligne 3: marker de 7 protéines connus



Question 5

Spectrométrie de masse

SDS-PAGE