

2ème Année Pharma 2016
COURS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

ACIDES NUCLEIQUES : STRUCTURES ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

▪ Pr M. Makrelouf & Dr S. Moussaoui

1

Définition biologie moléculaire

- **Science consacrée à :**
 - l'étude des molécules porteuses du message héréditaire (ADN, ARN) (structure du génome),
 - La synthèse des protéines , altérations (mutations) chez les organismes vivants.
- La biologie moléculaire permet d'analyser, à travers les molécules, et les altérations du génome = **mutations**.
- La biologie moléculaire s'intéresse également au mécanisme de l'expression des gènes que celui-ci soit normal ou pathologique.
- La biologie moléculaire désigne également les **techniques** d'étude des gènes PCR , clonage, hybridation moléculaire, séquençage, puce à ADN (DNA Chips).

2

ACIDES NUCLEIQUES

INTRODUCTION

Les acides nucléiques ont été caractérisés chimiquement au début du 20^{ème} siècle même si leur rôle est resté relativement longtemps inexpliqué.

Les acides nucléiques ont été isolés initialement des noyaux des cellules. On distingue deux grands types:

- les acides désoxyribonucléiques (ADN) localisés dans le noyau des cellules
- les acides ribonucléiques (ARN) localisés dans le cytoplasme cellulaire.

Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont des macromolécules et comportent des sous-unités appelées nucléotides.

Ils jouent également un rôle fondamental dans le métabolisme sous forme di- et tri-phosphorylée ainsi que dans la transmission de l'information dans la cellule (AMPc et GMPc).

3

Historique de la découverte des Acides nucléiques

Date	Auteurs	Découverte
1869	Friedrich Miescher	Nucléine à partir des noyaux de globules blancs
1927	Kossel & Levene	Nucléine= ADN ; désoxyribose constituant de l'ADN
1928	Frederick Griffith	Transformation bactérienne
1944	Avery, McLeod et McCarty	Nature du matériel transformant = ADN
1950	Chargaff	Caractérisation de l'ADN
1952	Hershey & Chase	Confirmation que l'ADN est le matériel transformant
1952	Rosalind Franklin & Maurice Wilkins	Diffraction aux rayons X d'ADN cristallisé
1953	Watson & Crick	Structure en double hélice de l'ADN
2001	USA, GB, France, Allemagne, Japon	Séquençage complet du génome humain

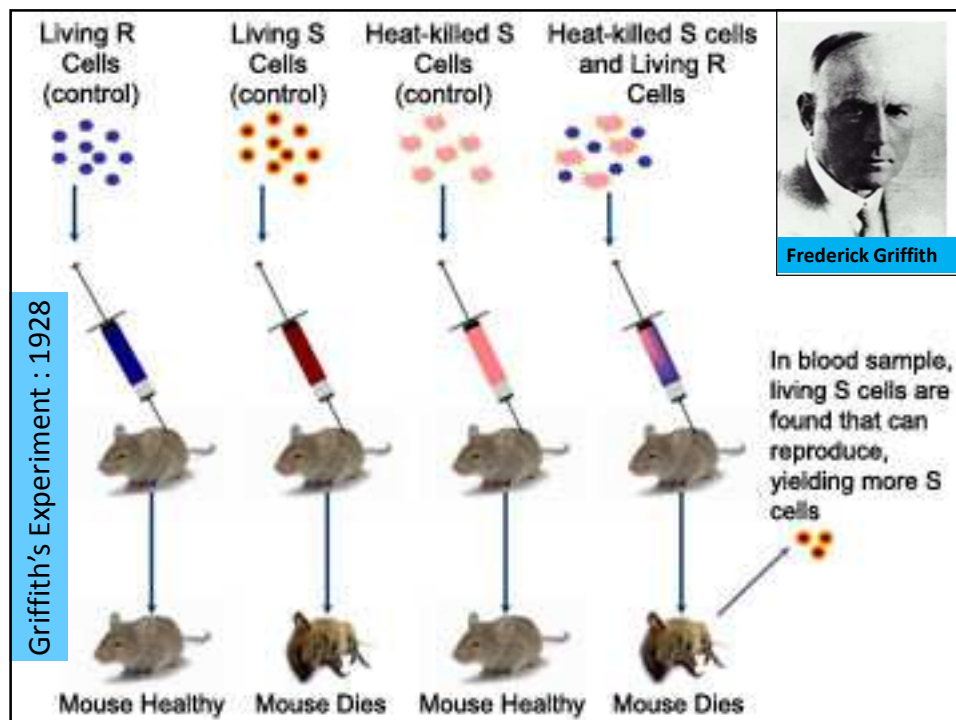
C'est en 1869 qu'un suisse, Friedrich Miescher isola un précipité issu de noyaux de globules blancs en lavant des bandages purulents (pus). Ce précipité après analyse contenait du C, H, O, N et du P. Il le baptisa nucléine (noyau)

Kossel et Levene démontrèrent que la nucléine était principalement constitué d'Acide DésoxyriboNucléique

4

Les expériences de Griffith

- Le premier phénomène qui allait permettre de progresser dans l'identification du support de l'hérédité est celui de la transformation bactérienne, rapporté en 1928 par l'anglais Fred Griffith (1877 - 1941).
- Griffith décrit deux souches de pneumocoques *Diplococcus pneumoniae*
 1. Souche R: inoffensive
 2. Souche S: mortel lorsqu'injectée à une souris
- Bactéries S chauffées deviennent inoffensives
- Or, si on injecte des bactéries S chauffées + bactéries R
 ⇒ **Les souris meurent !!!**
- Les bactéries R, au contact des bactéries S tuées, ont donc acquis un caractère pathogène qu'elles ne possédaient pas précédemment
- **Ce phénomène a été appelé transformation bactérienne**



ACIDES NUCLEIQUES

INTRODUCTION

● Expérience d'Oswald Avery (1944)

Souche R + protéines de S

Souche R + capsule de S

Souche R + lipides de S

Souche R + acides nucléiques de S

Souche R + ac.nucléiq. de S + DNase

Souche R + ac.nucléiq. de S + RNase

→ADN support chimique de l'hérédité

1877 - 1955

7

- Elle permet de savoir quel composant viral : A.N ou protéine, pénètre la cellule pour servir de plan pour la reproduction virale.
- On cultive d'une part des virus bactériophages T2 sur des bactéries elles-mêmes élevées sur un milieu contenant du soufre sous sa forme isotopique ^{35}S *
- Les protéines virales formées, qui contiennent du soufre, sont marquées R**
- En réalisant d'autre part une culture semblable sur un milieu où le phosphore est présent sous la forme de l'isotope radioactif ^{32}P , on marque distinctement les acides nucléiques viraux.
- Après avoir séparé, dans chacune des 2 cultures, les virus, tous marqués, des bactéries qui les ont reproduits, on infeste simultanément deux nouvelles cultures bactériennes, chacune avec une souche différente des phages marqués
- On constate, en analysant les culots bactériens grâce aux traceurs

Expérience de HERSHEY et CHASE, 1952

Martha Chase et Alfred Hershey

- On a pensé longtemps que l'ADN était composé d'une simple répétition d'un tétranucléotide (-ATGCATGCATGCATGC-)
- Pas possible de le considérer comme porteuse d'information
- En 1950, Erwin Chargaff fit une découverte importante qui porta un coup définitif à la théorie du tétranucléotide et donna à Watson et Crick une information vitale
- Chargaff, détermina la quantité relative des différentes bases dans des échantillons d'ADN.
- Si la théorie du tétranucléotide était correcte, chaque base devait représenter environ 25% du nombre total

Si on sépare une molécule d'ADN en nucléotides, on obtient toujours:



Erwin Chargaff (1950)



$$\frac{A+G}{T+C} = 1 \quad \frac{A}{T} = \frac{G}{C} = 1$$

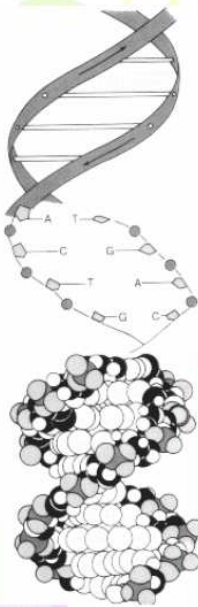
Equimolarité entre bases

Il peut y avoir plus de AT que de CG ou l'inverse (ça varie selon les espèces), mais il y a toujours autant de A que de T et de C que de G.


Animaux	Composition en bases moles				Rapports entre bases			Rapport AT/GC
	A	G	C	T	A/T	G/C	Pu/Py	
Homme	30,9	19,9	19,8	29,4	1,05	1,00	1,04	1,52
Mouton	29,3	21,4	21,0	28,3	1,03	1,02	1,03	1,36
Poule	28,8	20,5	21,5	29,2	1,02	0,95	0,97	1,38
Tortue	29,7	22,0	21,3	27,9	1,05	1,03	1,00	1,31
Saumon	29,7	20,8	20,4	29,1	1,02	1,02	1,02	1,43
Oursin	32,8	17,7	17,3	32,1	1,02	1,02	1,02	1,58
Sauterelle	29,3	20,5	20,7	29,3	1,00	1,00	1,00	1,41
Végétaux								
Germes de blé	27,3	22,7	22,8	27,1	1,01	1,00	1,00	1,19
Levure	31,3	18,7	17,1	32,9	0,95	1,09	1,00	1,79
Aspergillus niger	25,0	25,1	25,0	24,9	1,00	1,00	1,00	1,00
Bactéries								
<i>E. coli</i>	24,7	26,0	25,7	23,6	1,04	1,01	1,03	0,93
<i>Staphylococcus aureus</i>	30,8	21,0	19,0	29,2	1,05	1,11	1,07	1,50
<i>C. perfringens</i>	36,9	14,0	12,8	36,3	1,01	1,09	1,04	2,70
<i>Brucella abortus</i>	21,0	29,0	28,9	21,1	1,00	1,00	1,00	0,72
<i>Sarcina lutra</i>	13,4	37,1	37,1	12,4	1,08	1,00	1,04	0,35
Bactériophages								
T7	26,0	24,0	24,0	26,0	1,00	1,00	1,00	1,08
λ	21,3	28,6	27,2	22,9	0,92	1,05	1,00	0,79
ϕ X174, viral	24,6	24,1	18,5	32,7	0,75	1,30	0,95	1,34
ϕ X174, répliatif	26,3	22,3	22,3	26,4	1,00	1,00	1,00	1,18

- Les bases azotées des quatre nucléotides de l'ADN ne sont pas représentées dans des proportions de 1 : 1.
- Il y a des relations quantitatives invariantes entre purines et pyrimidines, indépendantes de l'origine de l'ADN.
- La somme des A + G = la somme des T + C
- Les quantités de A et de T sont toujours égales, tout comme les quantités de G et de C.

Watson, Crick & Wilkins Prix Nobel en 1962




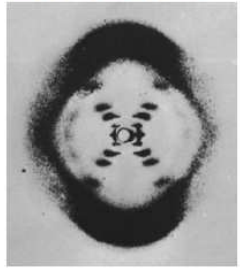
Structure en double hélice de l'ADN



Ont disposé des données suivantes: **1953**

- Composition chimique de l'ADN est sucre, base et phosphate
- Clichés de diffraction X en croix caractérisant la structure en hélice
- Travaux de Chargaff sur le contenu en bases (A=T et G=C)
- Travaux en microscopie électronique montrant que le diamètre de l'ADN est de 20 Å suggérant que cette molécule comportait 2 chaînes sucre-P

Rosalind Franklin: diffraction aux rayons X de l'ADN

11

UNITÉ de base de l'ADN = LE NUCLÉOTIDE

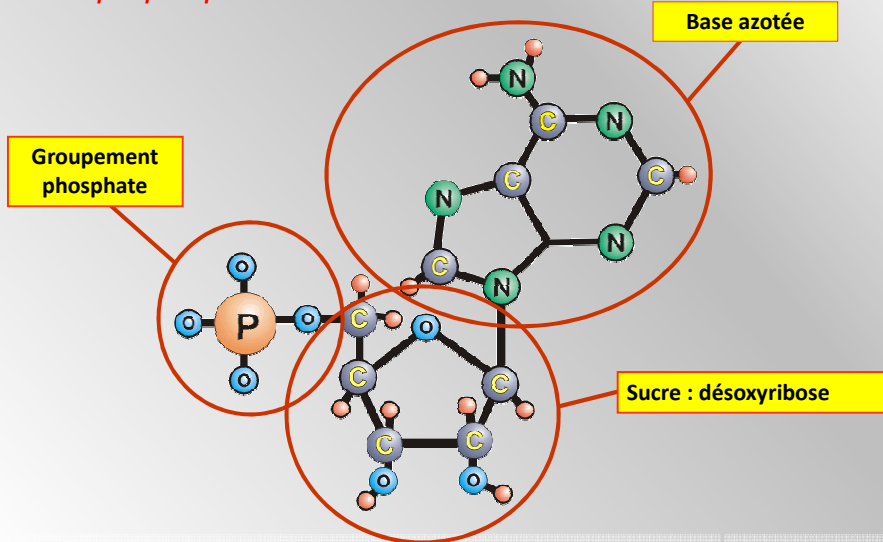
Les polynucléotides biologiques sont :

- le support moléculaire de l'information génétique : l'ADN (et ARN pour certains virus) est le support de l'hérédité et du codage des composés biologiques (les ARN, les protéines)
- des effecteurs de l'expression de l'ADN en peptides et protéines : acide ribonucléique dont l'abréviation est ARN (RNA : anglo-saxon) regroupés en trois classes :
 - les ARN messagers (ARNm)
 - les ARN de transfert (ARNt)
 - les ARN ribosomiaux (ARNr)

12

UNITÉ de base de l'ADN = LE NUCLÉOTIDE

Un nucléotide comporte **trois composants**:
de l'*acide phosphorique + un ose + une base.*

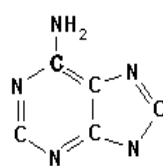


13

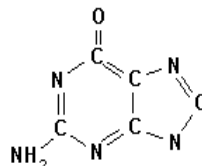
A- BASES AZOTÉES

Il y a 4 sortes de bases azotées: qui appartiennent à deux classes de molécules selon le noyau aromatique qui en constitue le squelette.

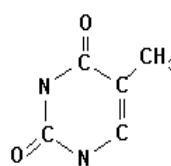
Bases azotées



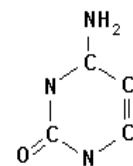
Adénine



Guanine



Thymine



Cytosine

Purines

Pyrimidines

Il peut y avoir plus de AT que de CG ou l'inverse (ça varie selon les espèces), mais il y a toujours autant de A que de T et de C que de G.

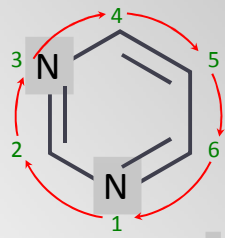
A = T et C = G

14

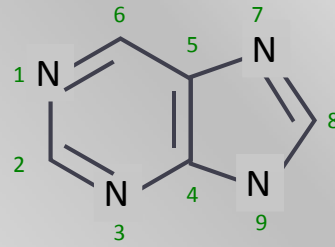
2 sortes de bases azotées hétérocycliques



bases pyrimidiques (noyau pyrimidine)



bases puriques (noyau purine)

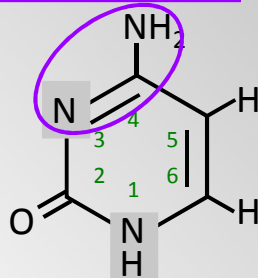


Le noyau pyrimidine est le plus simple : c'est un noyau aromatique hexagonal à six atomes, quatre carbones et deux azotes (n° 1 et 3).

15

1- Bases pyrimidiques

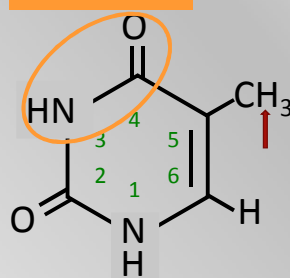
fonction imino-amine



cytosine (C)

ADN/ARN

fonction amide

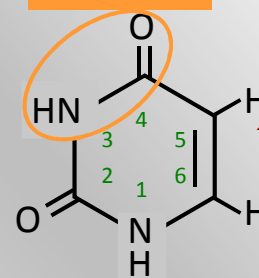


thymine (T)

5-méthyl-uracile

ADN

fonction amide



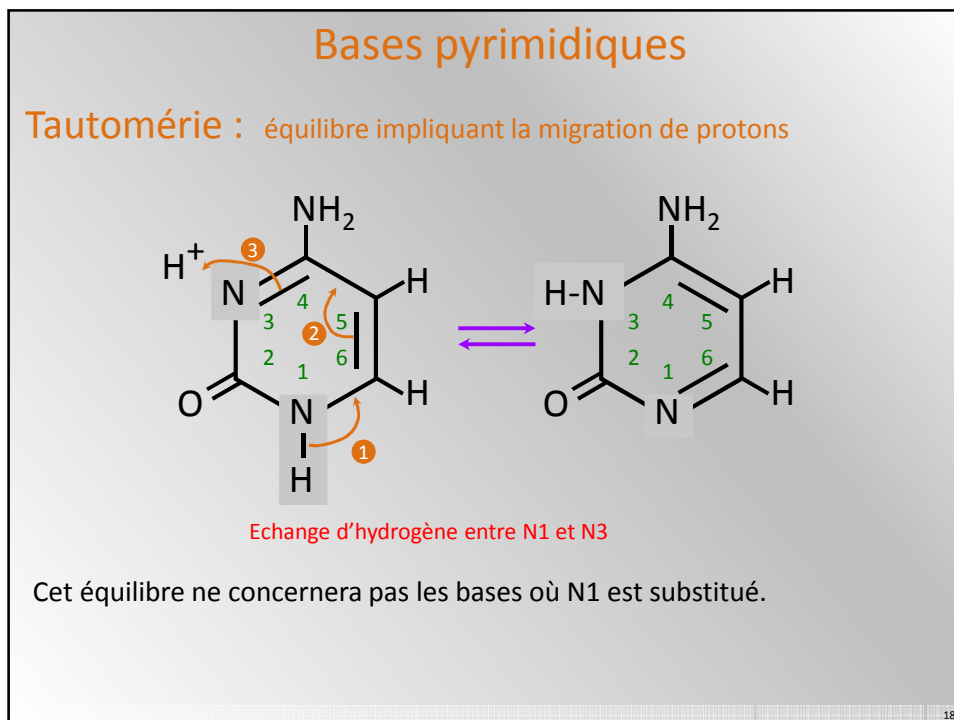
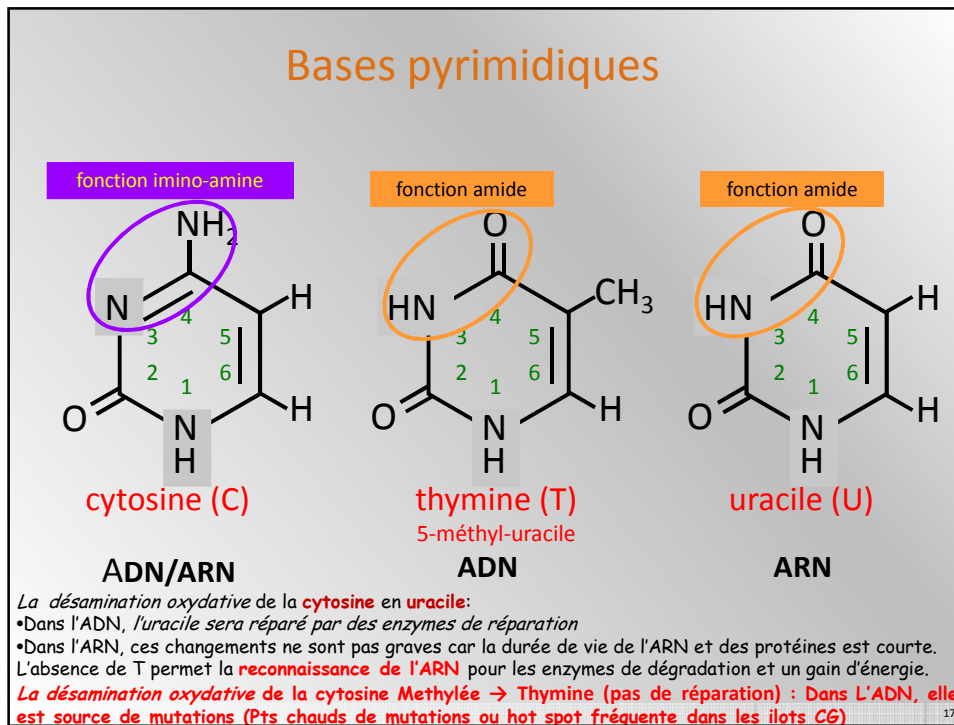
uracile (U)

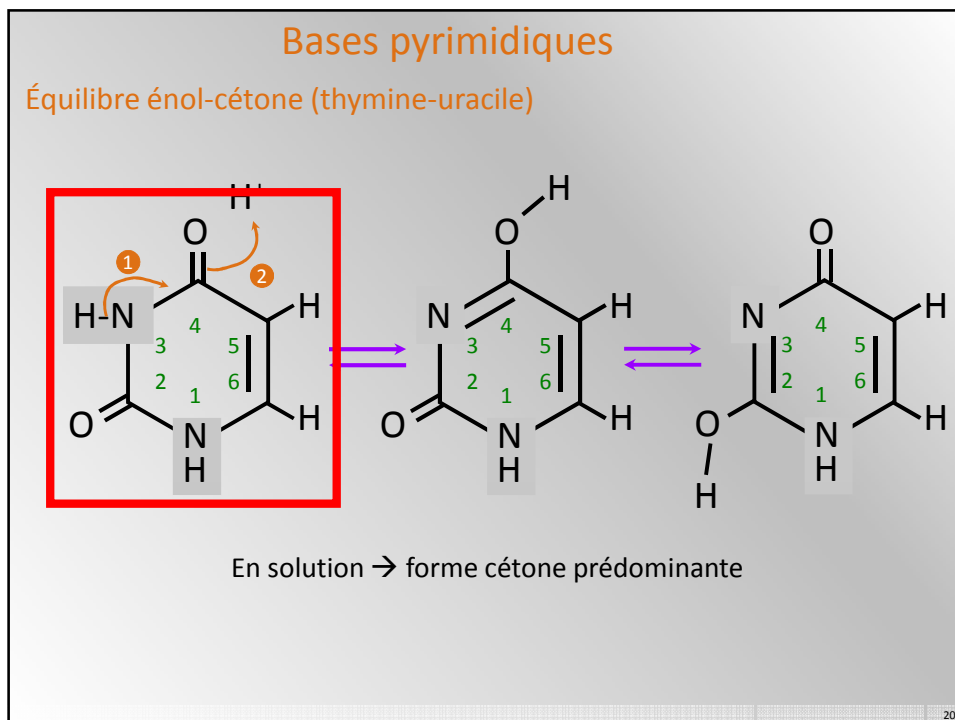
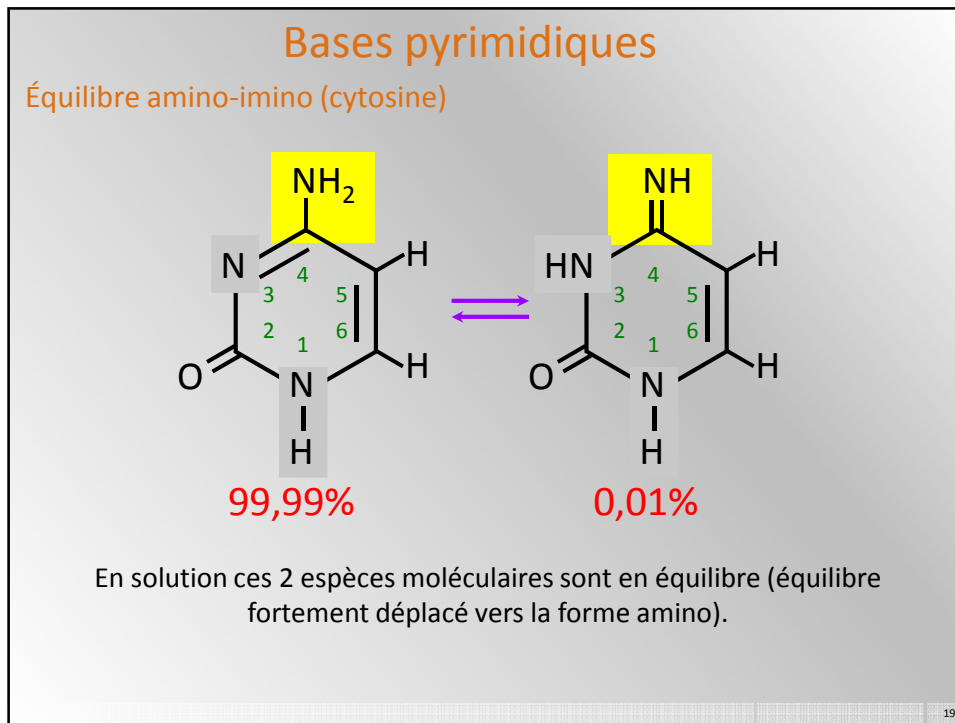
ARN

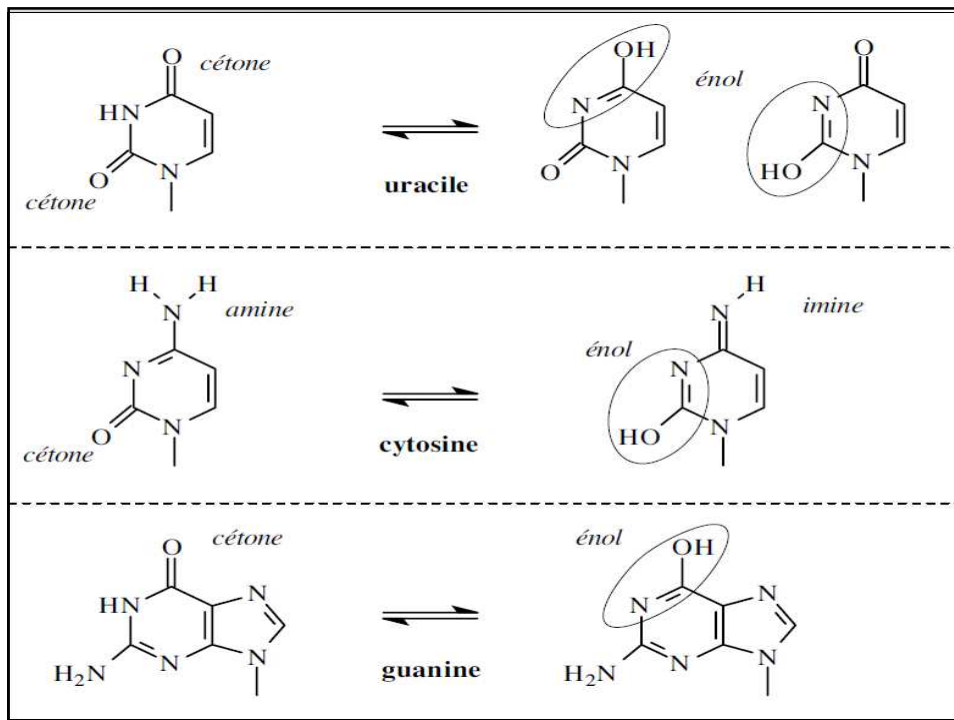
Les bases pyrimidiques sont au nombre de 3 : la cytosine, la thymine et l'uracile

- La cytosine : le carbone 4 est substitué par une fonction amine et le carbone 2 par une fonction cétone.
- L'uracile : les carbones 2 et 4 portent des fonctions cétone.
- La thymine : les carbones 2 et 4 portent des fonctions cétone, le carbone 5 est substitué par un méthyl.

16

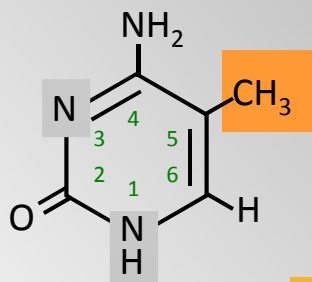






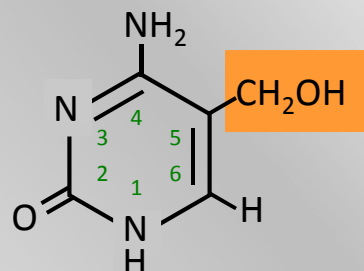
Bases Pyrimidiques Modifiées

Il existe des bases pyrimidiques modifiées (chez les phages par exemple...).



5-méthylcytosine

Méthylation de l'ADN : 70 à 80 % des cytosines de dinucléotides CpG peuvent être méthylés chez les mammifères.



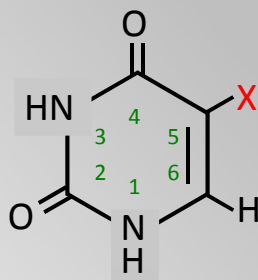
5-hydroxyméthylcytosine

- produite par oxydation de la 5-méthylcytosine
- observée pour la 1ère fois chez des bactériophages
- puis a été observée en abondance dans le cerveau chez les humains les souris et dans les cellules souches embryonnaires.
- Elle joue un rôle important en épigénétique

22

Bases Pyrimidiques Modifiées

Des analogues de l'uracile (5-halogéno-uracile) sont utilisés en thérapeutique anti-tumorale (Anticancéreux).

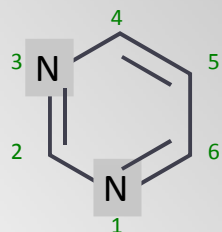


X = F, Cl, Br, I

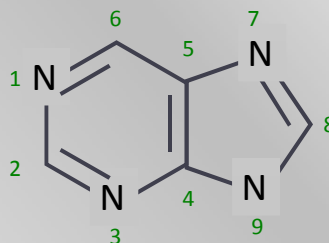
23

2 - Bases puriques

bases pyrimidiques
(noyau pyrimidine)



bases puriques
(noyau purine)

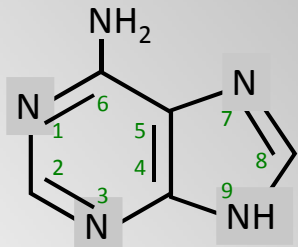


Les purines ont un double noyau aromatique comportant :

- à gauche : un cycle hexagonal de 4 carbones et 2 azotes
- à droite : un cycle pentagonal de 3 carbones (dont 2 communs avec le précédent) et 2 azotes.

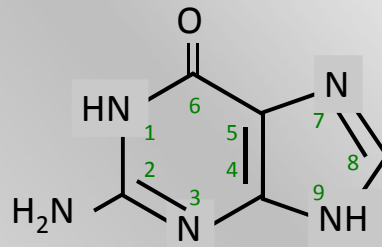
24

BASES PURIQUES



adénine (A)

ADN/ARN



guanine (G)

ADN/ARN

Les bases puriques sont au nombre de 2 : l'adénine et la guanine.

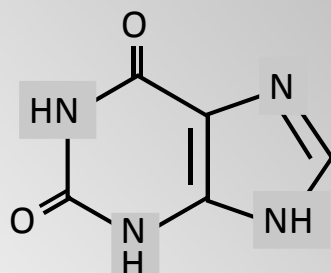
L'adénine : le carbone 6 est substitué par une fonction amine. Elle est **la seule** des bases nucléiques dont la formule ne contient **pas d'atome d'oxygène**.

- La guanine : le carbone 2 est substitué par une fonction amine et le carbone 6 par une fonction cétone.

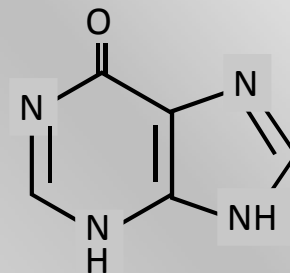
25

BASES PURIQUES

D'autres purines existent : xanthine, hypoxanthine, acide urique, caféine...



xanthine



hypoxanthine


Intermédiaire du métabolisme de l'adénine et de la guanine

26

BASES PURIQUES


CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C2=O

Théobromine (Cacao du chocolat)




CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2C

caféine



CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2

théophylline

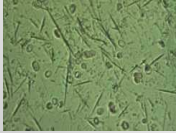


27

- L'acide urique une molécule quasiment insoluble dans l'eau résultant de la dégradation et de l'excrétion des purines.
- Une augmentation de sa concentration dans le sérum sanguin, appelée hyperuricémie, entraîne la **goutte**, responsable d'arthropathies et de lithiase rénale par formation de cristaux dans les reins, appelés calculs rénaux.


BASES PURIQUES

O=C1NC(=O)NC(=O)N1




\rightleftharpoons

O=C1NC(=O)NC(=O)N1



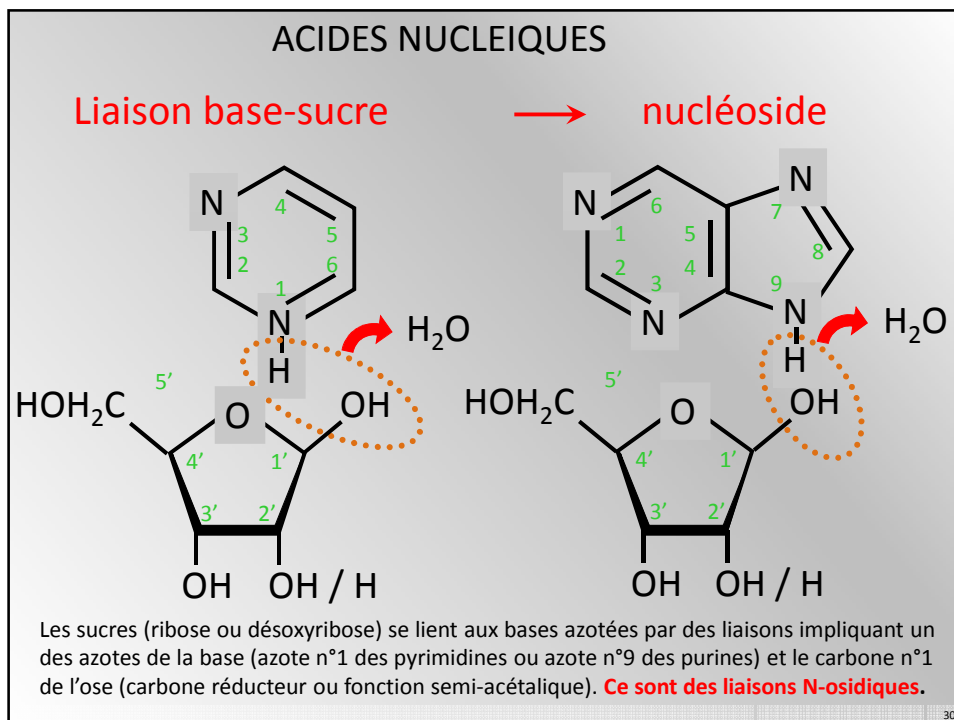
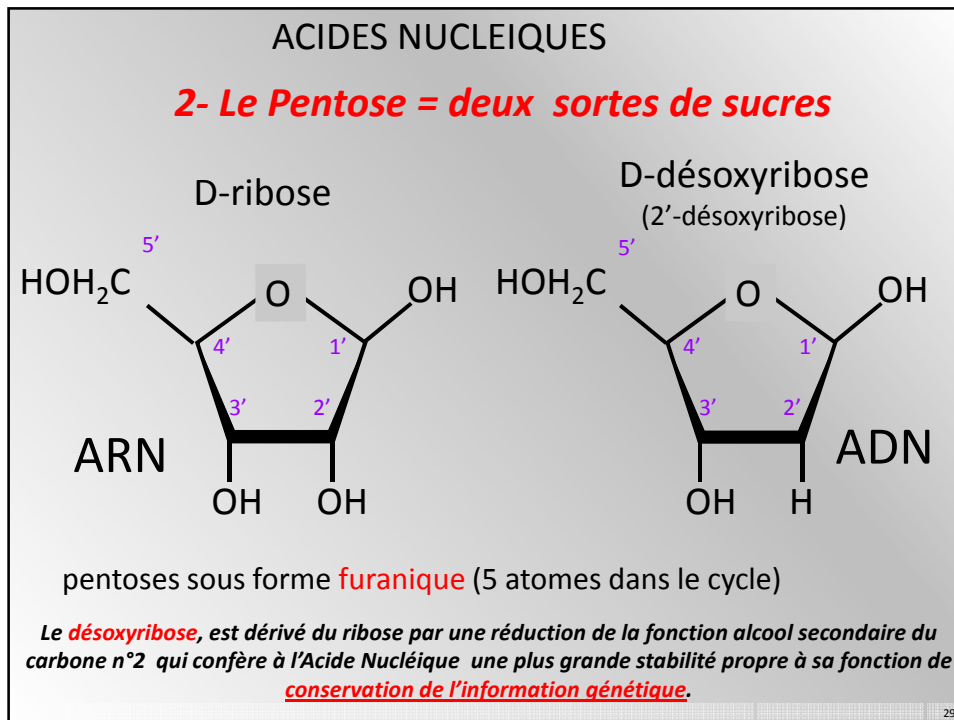
(goutte)

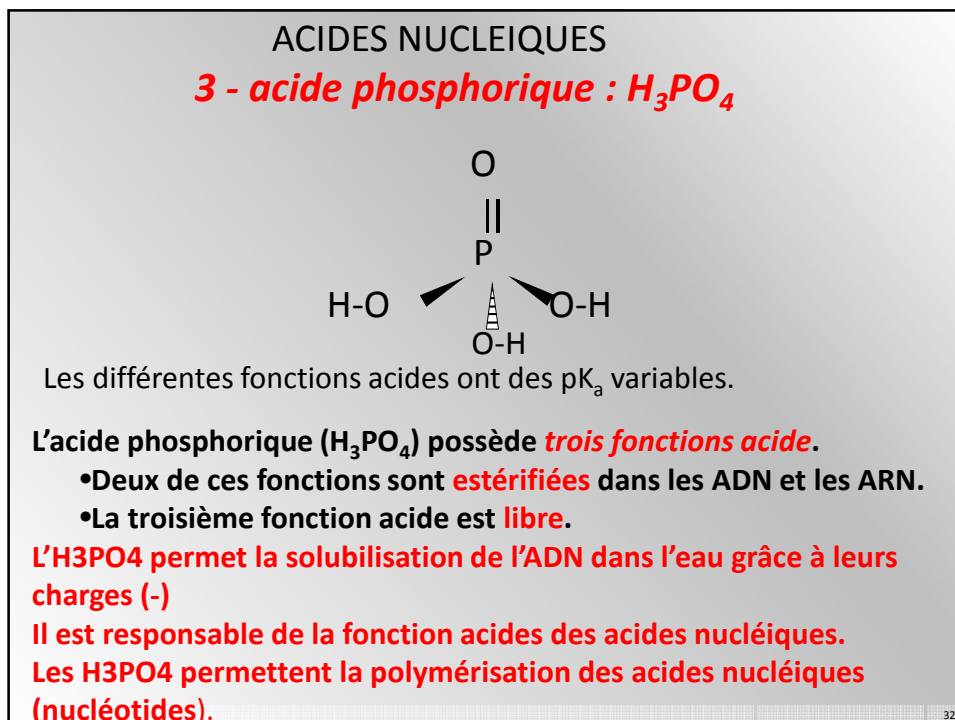
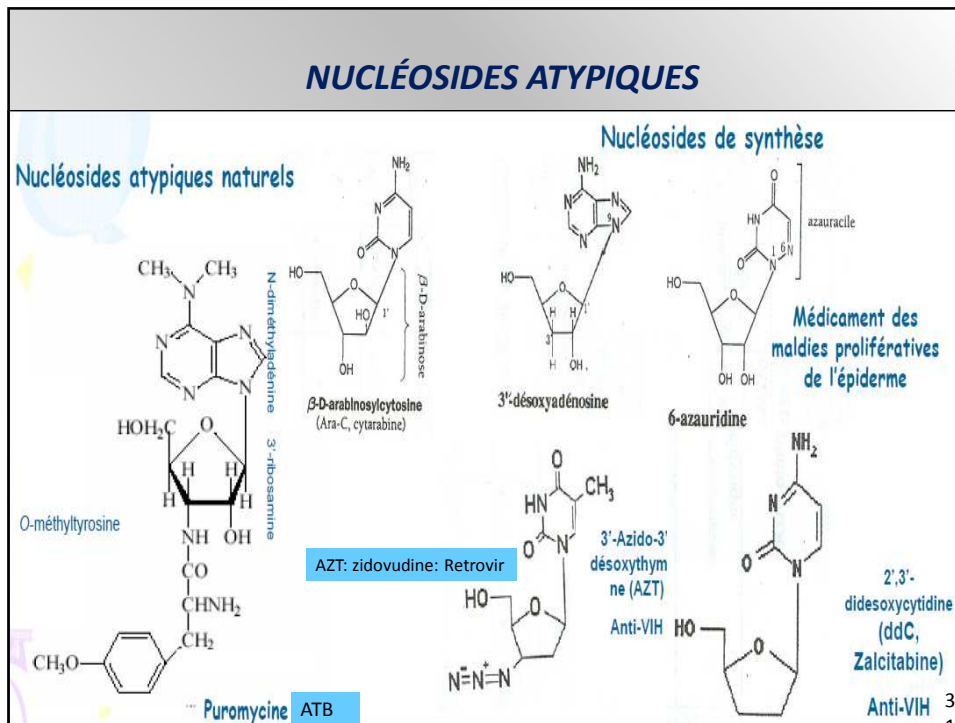


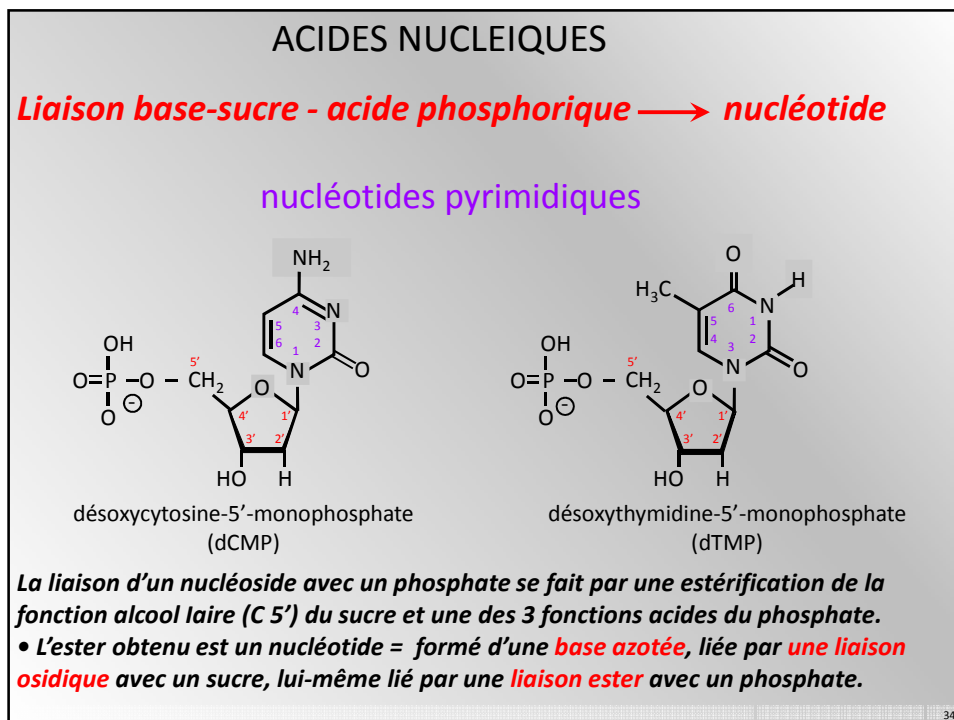
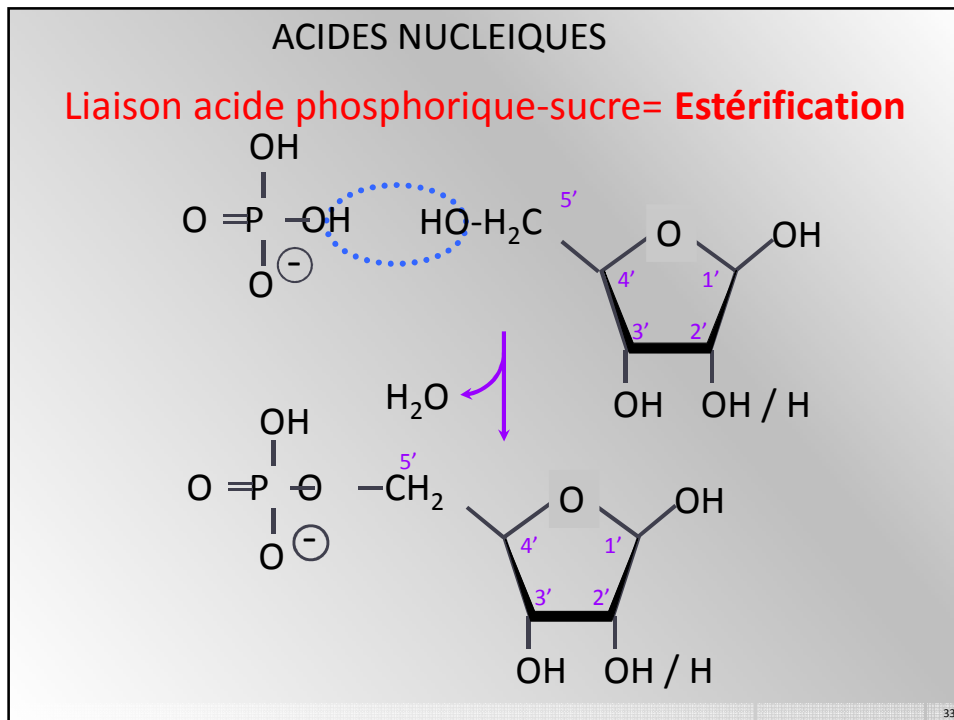
acide urique

(goutte)

28

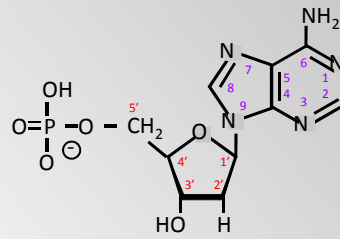
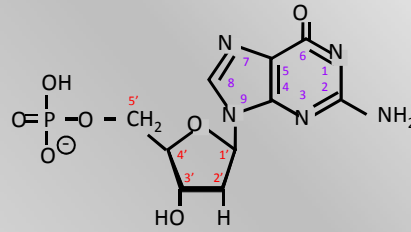






ACIDES NUCLEIQUES

nucléotides puriques

désoxyadénosine-5'-monophosphate
(dAMP)désoxyguanosine-5'-monophosphate
(dGMP)

La liaison d'un nucléoside avec un phosphate se fait par une estérification de la fonction alcool 1aire (C 5') du sucre et une des 3 fonctions acides du phosphate.

- L'ester obtenu est un nucléotide = formé d'une **base azotée**, liée par une **liaison osidique** avec un sucre, lui-même lié par une **liaison ester** avec un phosphate.

35

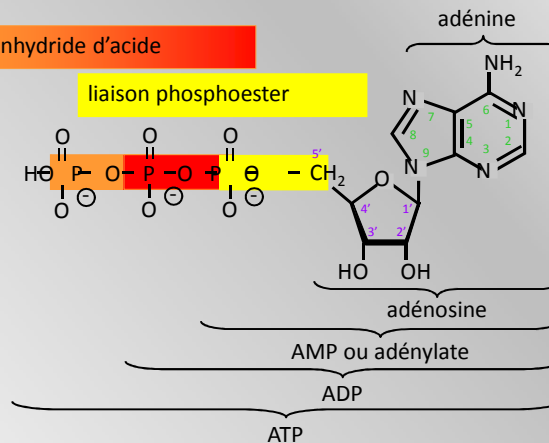
ACIDES NUCLEIQUES

Dans les cellules les nucléotides sont retrouvés sous forme nucléosides **mono, di- et triphosphates**

liaisons anhydride d'acide

liaison phosphoester

pKa = 7



36

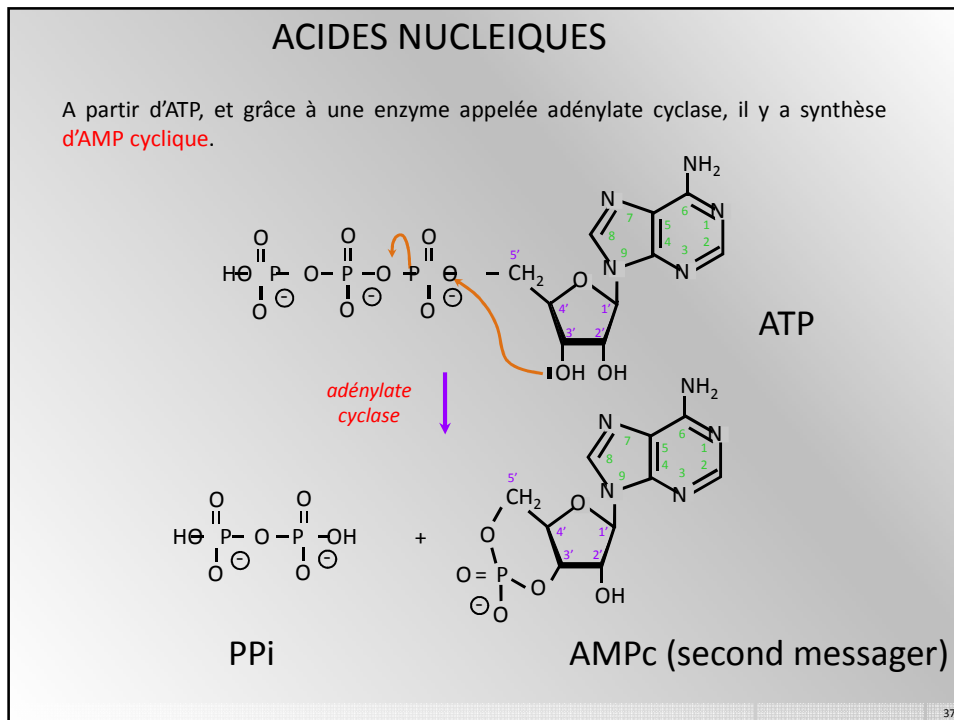


TABLEAU I. Nomenclature des principaux nucléotides.

BASE	NUCLEOSIDE	NUCLEOTIDE	ARN monophosphate	ADN monophosphate	CODE
adénine	adénosine	acide adénylique	AMP	dAMP	A
guanine	guanosine	acide guanylique	GMP	dGMP	G
cytosine	cytidine	acide cytidylique	CMP	dCMP	C
thymine	thymidine	acide thymidylique		dTMP	T
uracile	uridine	acide uridylique	UMP		U

➤ On désigne par nucléotides les nucléosides monophosphates : AMP ou acide adénylique, dTMP ou acide désoxythymidylique, etc...
 ➤ Les nucléosides polyphosphates sont des diphosphates : ADP ou GDP... ou encore des triphosphates, les plus riches en énergie : ATP ou GTP ; etc...
 ➤ Les acides nucléiques sont formés par une polycondensation de nucléotides AMP, CMP, GMP et UMP pour les acides ribonucléiques, dAMP, dCMP, dGMP et dTMP pour les acides désoxyribonucléiques

38

La liaison phosphodiester

Les acides nucléiques sont des enchaînements de nucléosides 5'-phosphate dont l'assemblage est réalisé par une liaison phosphodiester :

condensation par liaison ester

pont phosphodiester

La chaîne est **vectorisée** : elle est écrite de gauche à droite et dans le sens, extrémité phosphate 5' → 3'. C'est le sens dans lequel les séquences d'acides nucléiques sont utilisées comme molécules informationnelles (transcription, traduction).

ACIDES NUCLEIQUES : NOMENCLATURES

5'

CH₃

Thymine (T)

Guanine (G)

Adénine (A)

Cytosine (C)

3'

5'-P-3' T

5'-P-3' G

5'-P-3' A

5'-P-3' C

HO-3'

5'pTpGpApC 3'

- TGAC
- TgAC
- tgac

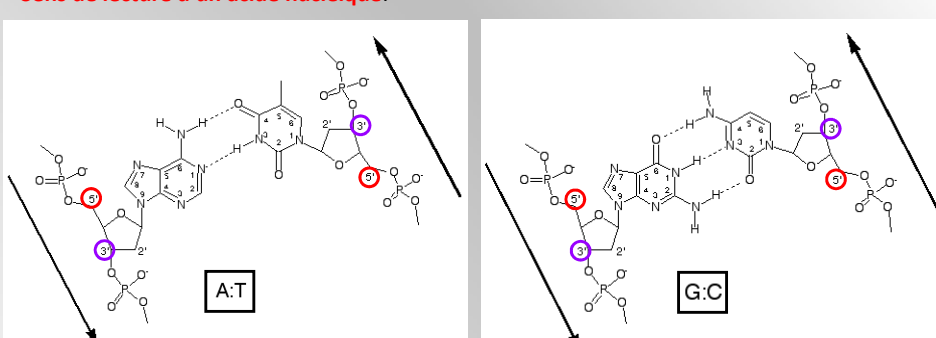
C-O-P-O-C

Liaison phosphodiester

les nucléotides sont liés entre eux par des liaisons ester.
L'H₃PO₄ présente ses deux fonctions acides bloquées dans la formation d'ester :
liaison phosphodiester :
- a la liaison ester entre H₃PO₄ et l'OH en 3' de l'ose,
- b à la liaison ester en 5' de l'ose

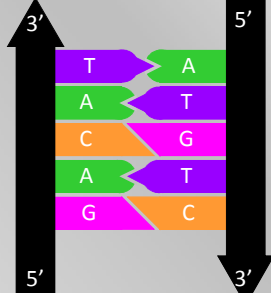
40

Sens de lecture d'un acide nucléique:



• Par convention, on lit toujours un acide nucléique dans le sens de l'**extrémité 5'** comportant en règle un groupement phosphate) vers l'**extrémité 3'** qui possède un **OH libre**.

La séquence des bases d'un ADN par convention sera écrite soit dans le sens vertical ou dans le sens horizontal en précisant les extrémités 5' et 3' et on indique seulement les bases correspondantes (A, T, G ou C).



41

ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES

Les ADN présentent des plusieurs caractéristiques propres et qui les opposent aux ARN:

- *L'ose*: le 2'-désoxyribose (remplacé par le ribose dans les ARN).
- *Les bases*: **A, C, G et T**, soit 2 bases puriques A et G et 2 bases pyrimidiques :C et T. Dans les ARN, **T** est remplacé par **U** (uracile).
- *Les polymères de nucléotides*: La molécule d'ADN est constituée en règle de **deux chaînes** (ou brins) de nucléotides contrairement aux molécules d'ARN qui sont le plus souvent sous forme d'un seul brin.

42

Structure des acides nucléiques

1. ADN

5' 3'

Adenine

Thymine

Guanine

Cytosine

3' bases 5'

Squelette sucre-phosphate

- L'ADN est formé de deux chaînes de polynucléotides **antiparallèles** (vont dans des directions opposées);
- Les bases sont presque **perpendiculaires** à l'axe (inclinaison de 6°);
- Les bases sont enfouies à l'intérieur de la structure, avec le squelette sucre-phosphate à l'extérieur;
- Les deux chaînes sont maintenues ensemble via la formation de ponts H entre bases azotées:
 - A forme 2 ponts H avec T (paire de base AT)
 - G forme 3 ponts H avec C (paire de base GC)
- Cette relation A:T et G:C dicte la **complémentarité** des deux chaînes:
 - La nature de la base sur un brin donne immédiatement la nature de la base sur le brin opposé;

43

5' 3'

3' 5'

A T

G C

Legend: C (Carbon), N (Nitrogen), O (Oxygen), H (Hydrogen)

- polarité 5' - 3' : séquence = 5' ACGT---
- 2 brins antiparallèles
- les bases sont complémentaires et forment des paires (pb) : A / T et G / C
- les bases sont associées par des liaisons hydrogène
- liaisons hydrophobes, Van der Waals, cations...
- A+T / G+C = constante d'espèce

44

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
<i>Escherichia coli</i>	1.09	0.99	1.05

LE GENOME DU VIRUS DE L'HEPATITE B	LE GENOME DE E. COLI	LE GENOME D'UNE CELLULE HUMAINE
3182 PAIRES DE BASES	3 MILLIONS DE PAIRES DE BASES ($3 \cdot 10^6$ bp)	3 MILLIARDS DE PAIRES DE BASES ($3 \cdot 10^9$ bp)
1 page de 3000 caractères	une encyclopédie de 1000 pages (3000/page)	1000 encyclopédies de 5 cm d'épaisseur: 50 m de haut (20 étages) 1,40 m d'information génétique Dans un individu: une fois la distance terre-lune

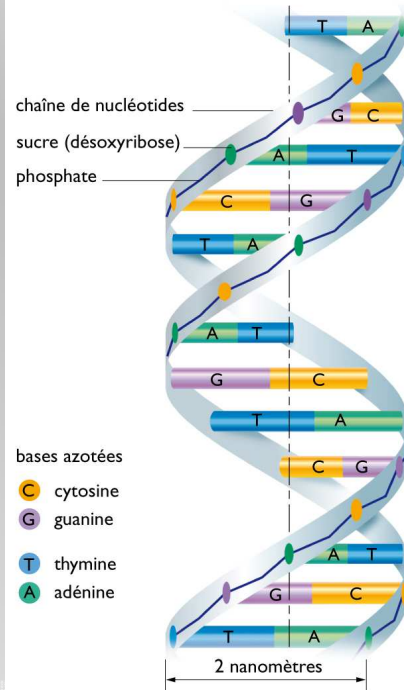
45

La structure secondaire:

L'ADN est formé de deux chaînes antiparallèles, complémentaires et hélicoïdales.

L'ADN est bicaténaire: c'est un original, il faut une sauvegarde.

Chaque brin est le back up de l'autre.



Structure des acides nucléiques

1. ADN

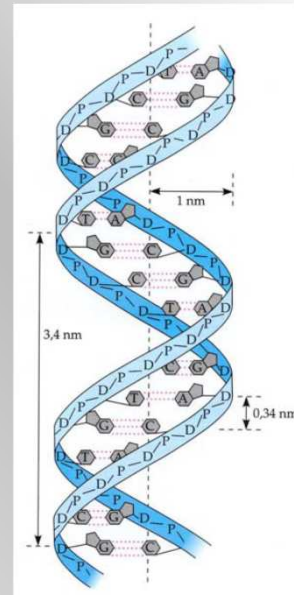
Les deux chaînes polynucléotidiques forment une hélice droite:

- Environ 10 paires de bases par tour d'hélice;
- 3.4 Å entre 2 bases
- 34 Å par tour
- 20 Å de diamètre

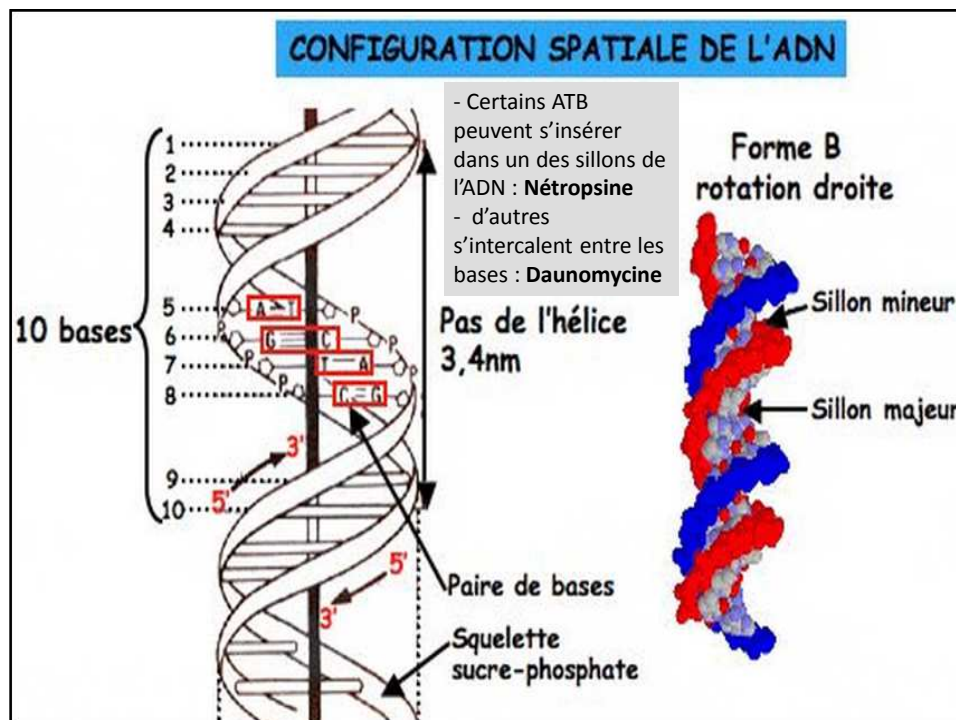
Présence de deux crevasses sillons à la surface de l'hélice:

- Petit sillon faible distance entre les deux chaînes;
- Grand sillon: plus grand espace entre les deux chaînes;

- Certains antibiotiques peuvent s'insérer dans un des sillons de l'ADN (**Nétropsine**)
- d'autres s'intercalent entre les bases (**Daunomycine**).



$$1 \text{ \AA} (\text{Ångstrom}) = 0.1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$$



Les formes de l'ADN.

La forme B de l'ADN est la forme biologique la plus importante.

- décrite en 1953 par Crick et Watson.
- Les caractéristiques de l'hélice régulière sont les suivantes:
 - **10** paires de bases par tour de spire
 - le pas de l'hélice est de 3,4 nm
 - et le diamètre de l'hélice est de 2-2,4 nm.
- Dans les cellules, la forme de l'hélice est un peu plus compacte et comporte environ **10,5** paires de bases par tour de spire.
- Une caractéristique importante de la forme B de l'ADN est la présence de deux types de sillons appelés sillon majeur (1,2 nm de large) et sillon mineur (0,6 nm de large).

49



James Watson
(1928-)

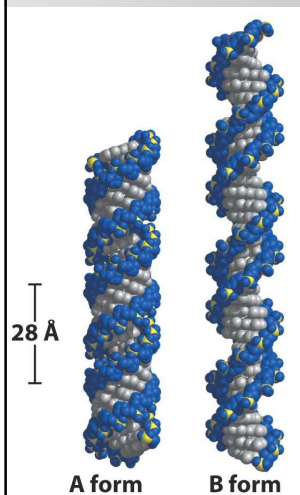
Francis Crick
(1916-2004)

Nobel 1962

2003 : 50 ans après la découverte de la structure de l'ADN

50

Helice A= Duplex ARN/ARN et ADN/ARN



- Plus large: 26 Å
- Plus courte: 11 bp/turn
- Distance par paire de base: 2,6 Å
- Les bases sont plus inclinées (20°)
- **Rôle :**
 - structure secondaire du RNA; complexes RNA/RNA ; hybrides RNA/DNA (réplication et transcription).
 - Comme pour l'ADN : les molécules hybrides ADN/ARN et les duplexes d'ARN/ARN suivent les mêmes règles de complémentarité et d'antiparallélisme. Cependant, le 2'OH de l'ARN affecte la structure de l'hélice.

51

La forme Z de l'ADN

- Initialement : réaction de laboratoire (Rich, 1979) avec l'oligonucléotide artificiel d(CGCGCG).
- Actuellement, on peut obtenir du Z-DNA dans des conditions plus physiologiques.
- Le Z-ADN forme une double hélice à **rotation gauche** avec **12** paires de bases par tour d'hélice.
- le pas d'hélice est plus important (**4,5nm**)
- le diamètre de l'hélice est plus petit **1,8**
- contient seulement un sillon.
- **Localiation des Helices de type Z:**
 - séquence alternée de Pu et Pyr: séquences riches en **(GC)_n** dans le génome : îlots **GC**.
 - Peut être reconnu par des Ac anti-Z DNA.
 - De telles séquences peuvent se retrouver dans des opérateurs comme "lac operator" ce qui augmente l'affinité pour le lac repressor d'env. 1000X.

52

	Hélice A	Hélice B	Hélice Z
Sens de l'hélice	droit	droit	gauche
Diamètre	≈ 2,6 nm	≈ 2,0 nm	≈ 1,8 nm
Résidus par tour	11	10	12 (6 dimères)
Ecart entre 2 pb	0,26 nm	0,34 nm	0,37 nm
Pas de l'hélice	2,8 nm	3,4 nm	4,5 nm

28 Å

A form B form Z form

ARNs

Structure : polymère linéaire de ribonucléotides liés par des liaisons phosphodiester

bases = A, G, C, **U**

sucres = ribose

uracile

Propriétés

1 seul brin

Formation de structures II et III :

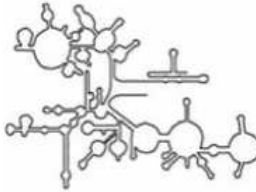
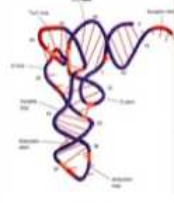
Hybrides ADN/ARN

Présence de bases modifiées : dihydrouracile, pseudouridine...

OH en 2' → pas de duplex de type hélice B
 → réactivité chimique
 → sensibilité au traitement alcalin

Sensibilité aux nucléases : Rnase A, H

Durée de vie variable des ARNm : quelques minutes à quelques heures...

LES ARNs

Acides ribonucléiques

- **rRNA = Acides ribonucléiques ribosomiques (82 %)**
 - RNA 28 S : 4718 nt RNA 5,8 S : 160 nt
 - RNA 18 S : 1874 nt RNA 5 S : 120 nt
 - **tRNA = Acides ribonucléiques de transfert (16%)**
 - tRNA-Phe : 76 nt, au moins un par acide aminé ≥ 20
 - **snRNA (<1%) Small nuclear)**
 - riches en Uracile, participent à l'excision-épissage des introns
 - **RNA 7 S (<1%)**
 - dans la particule de reconnaissance du signal-peptide
 - **mRNA = Acides ribonucléiques messagers (2%)**
 - produits de la transcription, modèles pour diriger la traduction
- **gRNA : ARN génomique (qui constitue le génome de certains virus)**
- **RNA antisens : petit ARN complémentaire d'une portion d'un autre ARN et inhibant sa fonction (peuvent être naturels ou obtenus par génie génétique)**

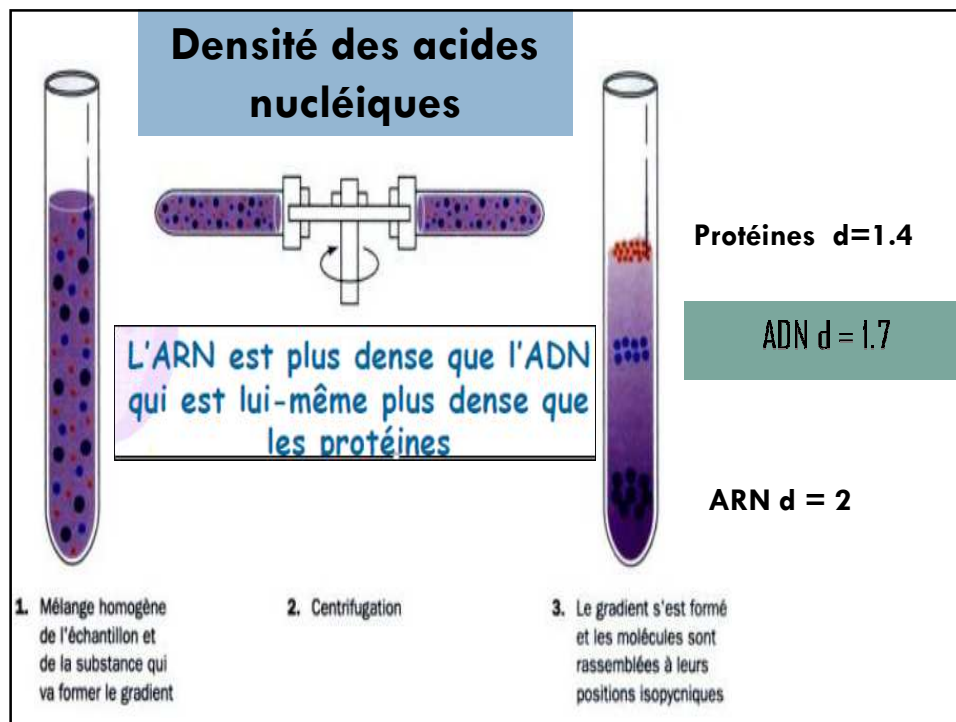
Plusieurs types d'ARN sont produits par la cellule

Type d'ARN	Fonctions
ARN messenger (ARNm)	codent les protéines
ARN ribosomal (ARNr)	forment la structure de base des ribosomes et participe à la synthèse des protéines
ARN de transfert (ARNt)	adaptateurs spécifiques des acides aminés agissant au niveau des ARNm
Small nuclear ARN (ARNsn)	impliqués dans plusieurs événements nucléaires, dont l'épissage des introns
Small nucleolar ARN (ARNsno)	modifient les ARNr
microARN (miRNA)	Contrôle de l'expression des gènes par blocage de la traduction
Petits ARN interférant (siRNA)	Contrôle de l'expression des gènes par dégradation d'ARNm et par établissement d'une structure chromatinienne compacte
autres ARNs non codant	impliqués dans différents processus: inactivation du chromosome X, synthèse des télomères, transport des protéines dans le Réticulum Endoplasmique

Propriétés physico-chimiques de l'ADN

1. Densité

- On exploite la densité par centrifugation dans un gradient de chlorure de césium (CsCl).
- Au cours de la centrifugation il se forme un gradient de chlorure de césium, l'ADN se concentre en une bande à l'endroit où la densité de la solution de CsCl est égale à la sienne.
- Si on centrifuge des protéines, de l'ADN et de l'ARN on remarquera la répartition de l'ARN au fond du tube (plus dense), l'ADN au milieu et les protéines en haut (moins dense). Ceci est dû à leur différence de densité



Poids moléculaire

- Le poids moléculaire de l'ADN est très élevé.
- Il est déterminé par:
 - Diffusion de la lumière,
 - Mesures de constante de sédimentation et de viscosité intrinsèque,
 - Microscopie électronique.
- L'ADN humain fait en moyenne un PM de 6×10^{10} par chromosome. Ce paramètre est mis à profit lors de méthodes comme la chromatographie et l'électrophorèse.

Solubilité et viscosité

- La présence de **groupements phosphates (OH ionisés)** donne un caractère **acide** aux acides nucléiques.
- A pH physiologique les acides nucléiques portent une **charge négative**, qui est uniquement due aux groupements phosphates car **à ce pH les bases ne portent aucune charge**. De ce fait, les acides nucléiques sont **solubles dans l'eau**.
- L'ADN se dissout facilement dans les solutions salines diluées et entraîne une augmentation importante de la viscosité de la solution.
- A forte concentration en sels l'ADN et l'ARN précipitent et peuvent être récupérés après centrifugation.

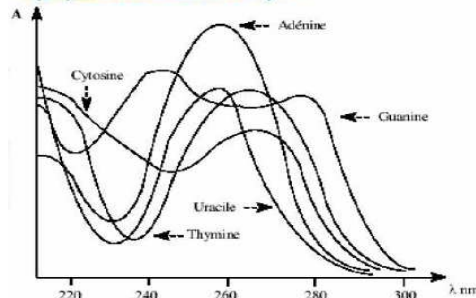


- Les **alcools**, comme l'éthanol, précipitent également les molécules d'ADN sous forme d'agglomérat en **longues fibres**.
- Les solutions d'ADN ont une très grande viscosité résultant de la structure longue et rigide de la double hélice.
- Un ADN double brin possède une viscosité supérieure à celle d'ADN simple brin.

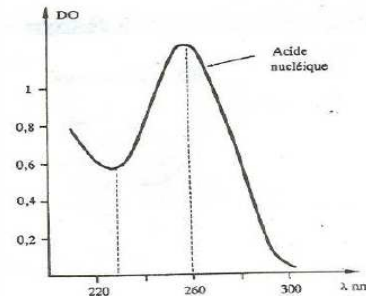
Propriétés spectrales

Absorption dans l'UV

Spectre d'absorption dans l'ultra-violet (UV) des bases azotées à pH 7



Spectre d'absorption d'un acide nucléique



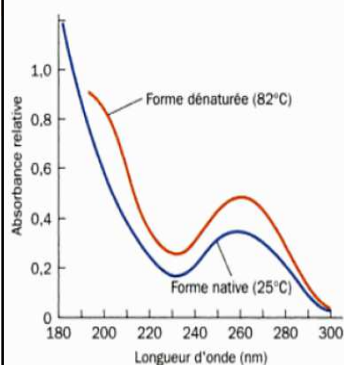
Bases azotées absorbent toutes dans l'UV à 260 nm environ.

Absorption de la molécule d'ADN est **nettement inférieure** à celle que l'on obtiendrait avec un mélange des mêmes bases libres aux mêmes concentrations

car le coefficient d'extinction molaire ϵ des bases libres est bien supérieur à celui des bases appariées (si ϵ diminue pour une même concentration (c), A diminue aussi)

Donc cette différence d'absorption (environ 30%) entre ADN et mêmes bases libres est due à l'appariement des bases par liaison H. Ce phénomène est appelé effet **hypochrome**.

Propriétés spectrales -suite-



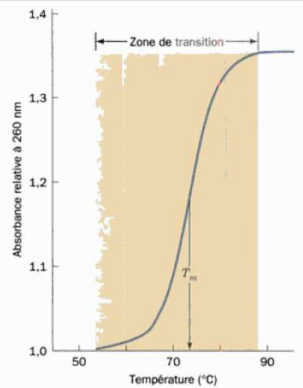
Autre phénomène: **hyperchromie**

Les solutions d'ADN présentent le maximum d'absorption à la longueur d'onde de 260 nm.

MAIS pour une longueur d'onde donnée, **l'ADN monocaténaire absorbe plus que l'ADN bicaténaire**.

Dans l'ADN double brin, les bases sont masquées ou se chevauchent, alors que dans l'ADN simple brin il n'y a pas de structure qui cache les bases, donc l'absorbance est plus importante.

Si on chauffe une solution d'ADN bicaténaire à différentes températures et qu'on suit l'absorbance de cette solution pour chacune de ces températures : on peut construire une courbe $A=f(T^{\circ}\text{C de traitement}) =$ **courbe de dénaturation thermique de l'ADN**.



Observation : l'absorbance de l'ADN augmente avec la température.

L'ADN monocaténaire présente une absorption plus importante qu'un ADN bicaténaire.

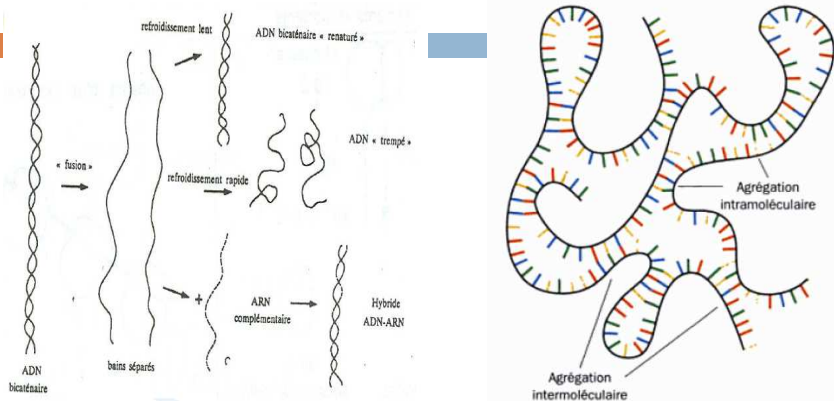
La courbe a une allure de **sigmoïde**.

Le point d'inflexion de cette courbe correspond, sur l'axe des abscisses, au **Tm (Melting temperature)**.

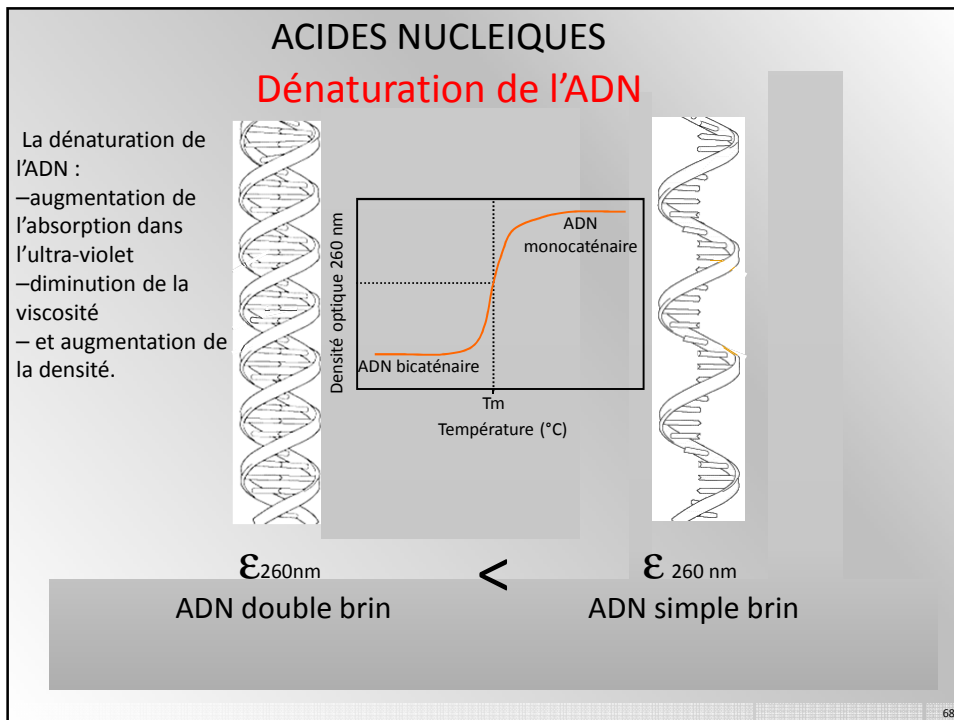
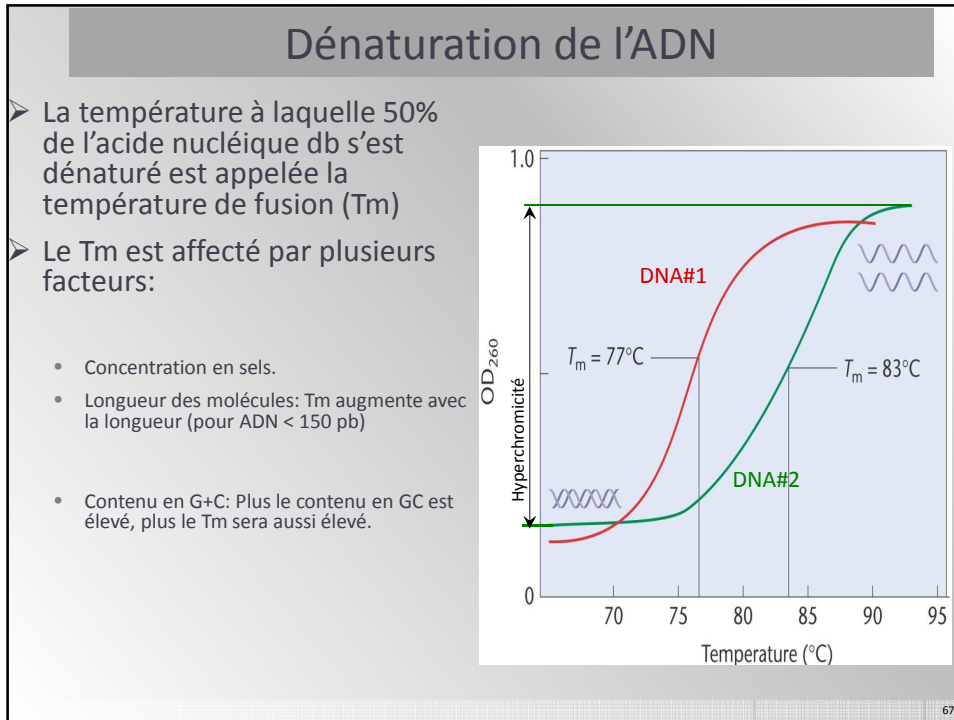
Tm = température de fusion de l'ADN
= température moyenne pour laquelle la moitié de cet ADN est dénaturé.

Dénaturation \rightarrow diminution de la viscosité de la solution
 \rightarrow augmentation de la densité de l'ADN.

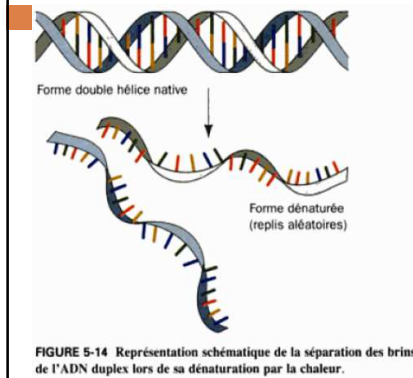
Température et Renaturation de l'ADN



- ❑ Si une solution d'ADN dénaturé est **refroidie rapidement** bien en dessous de sa T_m , l'ADN résultant ne sera que **très partiellement apparié** car les brins complémentaires n'ont pas le temps de se réassocier convenablement.
- ❑ Cependant si on **refroidit lentement** la solution d'ADN dénaturé, l'ADN **se renature complètement**. De la même façon, des brins complémentaires d'ADN et d'ARN peuvent s'hybrider pour former une double hélice.



Dénaturation/Renaturation



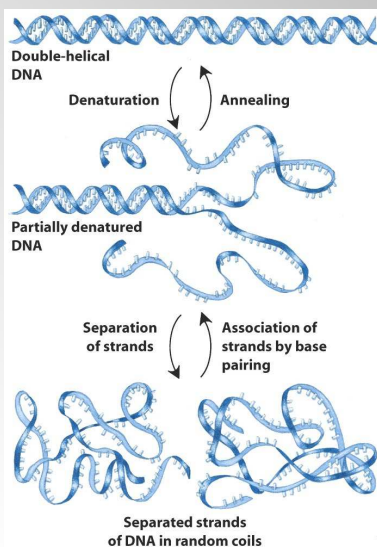
Dénaturation d'une molécule = perte de sa structure tridimensionnelle sans altération de la structure primaire.

Pour une molécule d'ADN double brins = **rupture des liaisons hydrogène entre les bases** : on obtient de l'ADN monocaténaire.

Phénomène coopératif

On peut obtenir une dénaturation de l'ADN par des **moyens physiques** (température, pH extrême, diminution de la concentration en sel) et des **moyens chimiques** (utilisation de l'urée, de soude, de formaldéhyde).

Dénaturation de l'ADN



Les acides nucléiques double brins (db) (ds) peuvent être convertis en acides nucléiques simple brins (sb) (**dénaturés**) de plusieurs façons:

- **Augmentation de la température**
- **Diminution de la concentration de sel**
- **Produits chimiques:**
NaOH/formamide/formaldéhyde (brisent les ponts H)
- Inversement, l'ADN sb ou SS peut être **renaturé** de la façon suivante: :
 - **Diminution de la température**
 - **Augmentation de la concentration en sel**
- Ce phénomène **Denaturation-Renaturation** peut être suivi par spectrophotométrie:
 - Les acides nucléiques sb absorbent davantage à 260 nm que les acides nucléiques db: **hyperchromicité**;
 - **Renaturation = Hypochromicité**

70

Hybridation des acides nucléiques et des sondes nucléiques

- L'hybridation est une propriété fondamentale des acides nucléiques qui repose sur les règles de complémentarité.
- Il est possible d'apparier des brins d'ADN (ou d'ARN) avec des oligonucléotides ou polynucléotides qui reconnaissent spécifiquement des séquences sur les brins d'ADN de manière anti-parallèle et complémentaire.
- Ces oligo ou polynucléotides sont appelés *sondes nucléiques*

Remarque : Oligonucléotide (oligomère) < 50 nucléotides

71

Hybridation des AN

Transcription of one strand of DNA-3

RNA transcript complementary to one strand of DNA-3

Isolated DNA fragments

Heat

Single strands of DNA

RNA added to DNA

Hybridization conditions

Hybrid

Complementary duplexes formed, including a DNA/RNA hybrid

Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

- Les acides nucléiques sb ayant des séquences **complémentaires** vont se **renaturer** lorsqu'elles seront mélangées ensemble (**hybridation**);
 - ADN-ADN
 - ADN-ARN
 - ARN-ARN

La renaturation se produira même si les deux brins ne sont pas parfaitement complémentaires

Cependant, le T_m diminue avec le nombre de différences dans la complémentarité (**mismatch**)

Ce phénomène est très utilisé lors de l'étude des acides nucléiques (techniques de BM) :

- Séquençage
- PCR
- Analyse Southern
- Analyse Northern
- Analyse FISH
- Puces à ADN

72

Paramètres influençant la dénaturation		
Si le paramètre(cı-dessous) augmente	il augmente :	il stabilise l'ADN et augmente la Tm ?
le coeff de Chargaff %GC	le nombre de liaisons hydrogène	oui
le pH qui ionise les phosphates	la force de répulsion électrostatique	non → dénaturant
la concentration en cation, force ionique	neutralise les charges	oui → effet stabilisant
la concentration en urée, formamide	compétiteur des liaisons hydrogène entre bases	non → dénaturant
la concentration en ADN, Activité de l'eau	affecte la constante diélectrique	oui → effet stabilisant
la longueur de la molécule d'ADN	le nombre de zones riches en GC	oui → effet stabilisant

Extraction, Purification et quantification de l'ADN

- Dans un premier temps, on doit détruire la structure cellulaire du tissu par broyage puis on isole les noyaux par centrifugation.
 - Dans un deuxième temps, on extrait et on purifie l'ADN des noyaux par élimination successives des protéines associées, des lipides et de l'ARN.
 - Il existe de nombreuses techniques de purification des acides nucléiques comme :
 - La chromatographie sur colonne de gel en présence d'un dénaturant
 - La chromatographie d'adsorption
- Le plus souvent on se contente de multiples précipitations par l'éthanol qui suffisent à débarrasser l'ADN des protéines contaminantes et des enzymes.

ADN: Absorbance

Les acides nucléiques absorbent à ~260 nm (à cause des bases puriques/pyrimidiques);

Généralement: les préparations d'acides nucléiques pures donnent un rapport A_{260}/A_{280} d'environ 1.8;

Des valeurs de A_{260}/A_{280} inférieures à 1.8 sont généralement indicatives de la contamination des acides nucléiques par des protéines.

une absorbance de 1 à 260 nm donne:

50 μg / ml d'ADN

40 μg / ml d'ARN

Calcul de la Tm

• Oligonucléotide inférieur à 20 nt

$$\bullet (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4 = T_m \text{ en } ^\circ\text{C}$$

• Oligonucléotide supérieur à 20 nt

$$\bullet [(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] \times (1 + [(N-20)/20]) = T_m \text{ en } ^\circ\text{C}$$

Effets des acides et alcalis sur les A.N

- Acide fort = augmentation de la T° = hydrolyse complète de AN.
- Acide faible = hydrolyse ménagée = coupure de la liaison N-osidique : AN apuriniques ou apyrimidiniques
- Hydrolyse alcaline: changement tautomérique:
 - PH neutre : forme ceto (oxo) (forme physiologique).
 - PH alcalin : forme enol

HYDROLYSE ENZYMATIQUE des Acides Nucléiques

Exemple de nucléases avec leurs spécificités

Nucléases	Substrats	Coupure		Produits
		type	spécificité	
Exonucléases				
- Phosphodiesterase de venin de serpent	ARN, ADN (s)	a	extrémité 3'	5'-NMP , 5'-dNMP
- Phosphodiesterase de la rate	ARN, ADN (s)	b	extrémité 5'	3'-NMP , 3'-dNMP
- Exonucléase I d' <i>E. Coli</i>	ADN (s)	a	extrémité 3'	5'-dNMP
- Exonucléase III d' <i>E. Coli</i>	ADN (d)	a	extrémité 3'	5'-dNMP + ADN (s)
Endonucléases				
- Endonucléase S1 d' <i>Aspergillus oryzae</i>	ARN, ADN (s,d)	a	Aléatoire	5'-NMP + oligonucléotides 5'-P 5'-dNMP + oligonucléotides 5'-P
- Ribonucléase T1 d' <i>A. oryzae</i>	ARN (s)	b	-G↓N-	3'-NMP + oligonucléotide 3'-P
- Ribonucléase de pancréas	ARN (s)	b	Pyr↓N-	3'-NMP + oligonucléotides 3'-P
- DNase II de thymus	ADN (s)	b	dPyr↓dPur	désoxyoligonucléotides 3'-P

(S): simple brin, (d): double brin, N: nucléotide, NMP: nucléosides monophosphate, dNMP: désoxynucléosides monophosphates

77

Types de coupures (a, b) d'un pont phosphodiester

Coupure de l'ARN par les nucléases

Hydrolyse par la ribonucléase T1 Coupe en b après une guanine

cytosine adénine guanine uracile uracile cytosine guanine

→ pCpApGp + UpUpCpGp

Hydrolyse par la ribonucléase pancréatique Coupe en b après une PY

cytosine adénine uracile uracile guanine cytosine uracile

→ Cp + ApUp + Up + GpCp + Up

Hydrolyse par la phosphodiesterase de venin de serpent Coupe en a

adénine uracile guanine cytosine

→ pC + pG + pU + pA + ...

78

ENZYMES de RESTRICTION

Les enzymes de restriction sont des hydrolases agissant sur des liaisons esters : sont des **estérases**. Elles sont produites par les bactéries lorsqu'elles sont infectées par un bactériophage. Elles sont des ciseaux moléculaires qui hydrolysent l'ADN double brin

3 = Hydrolase 3.1.21.4
 3.1 = Esterase
 3.1.21 = Endonucléase produisant un 5'-phosphate
 3.1.21.4 = Enzyme avec Mg (seul cofacteur)

EcoRI

Genre : *Escherichia*
 Espèce : *coli*
 Variété : R

Numéro d'ordre (s'il y a plusieurs enzymes)

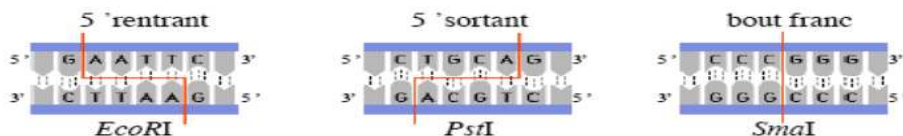
Les enzymes de restriction sont des ciseaux moléculaires qui hydrolysent l'ADN. Il existe 3 types d'enzymes classés en fonction des sites qu'elles reconnaissent:

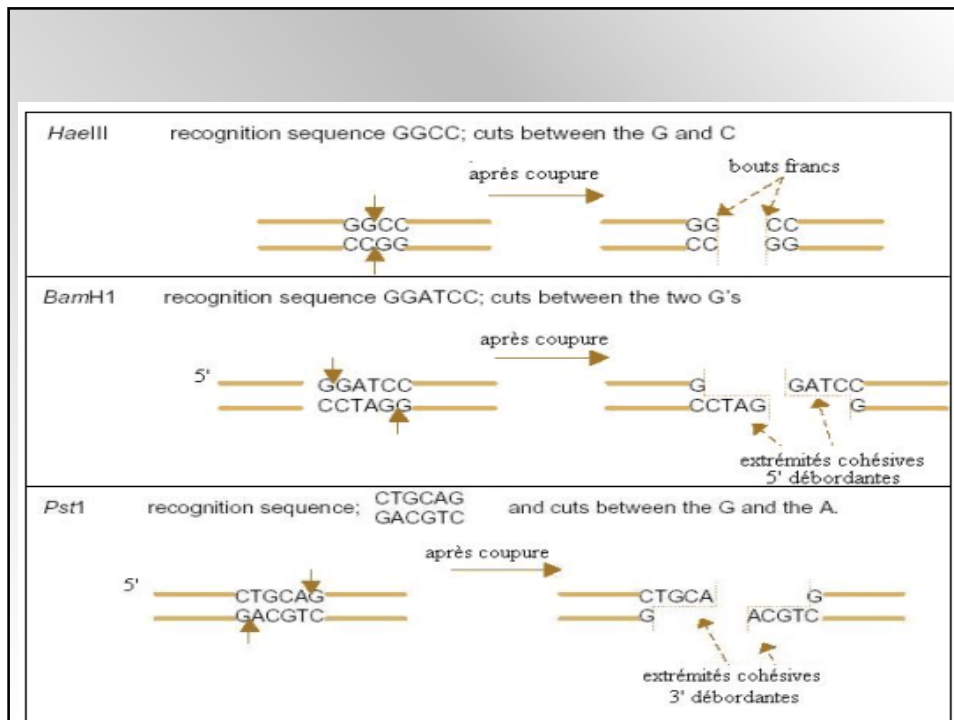
1. enzymes de type I : l'enzyme reconnaît un site particulier et coupe à environ 1000 jusqu'à 5000 nucléotides plus loin.
2. enzymes de type II : ce sont les plus nombreuses et les plus utilisées aux laboratoires de BM. Leurs sites de restrictions de 4 à 8 paires de bases sont des séquences palindromiques.
3. enzymes de type III : l'enzyme reconnaît une séquence mais coupe à une vingtaine de paires de bases plus loin.

- La plupart des sites de reconnaissance sont des séquences inversées répétées (palindromes)

Cas de *EcoRI* : 5' GAATTC 3'
 3' CTTAAG 5'

- Formation de bouts collants ou de bouts francs

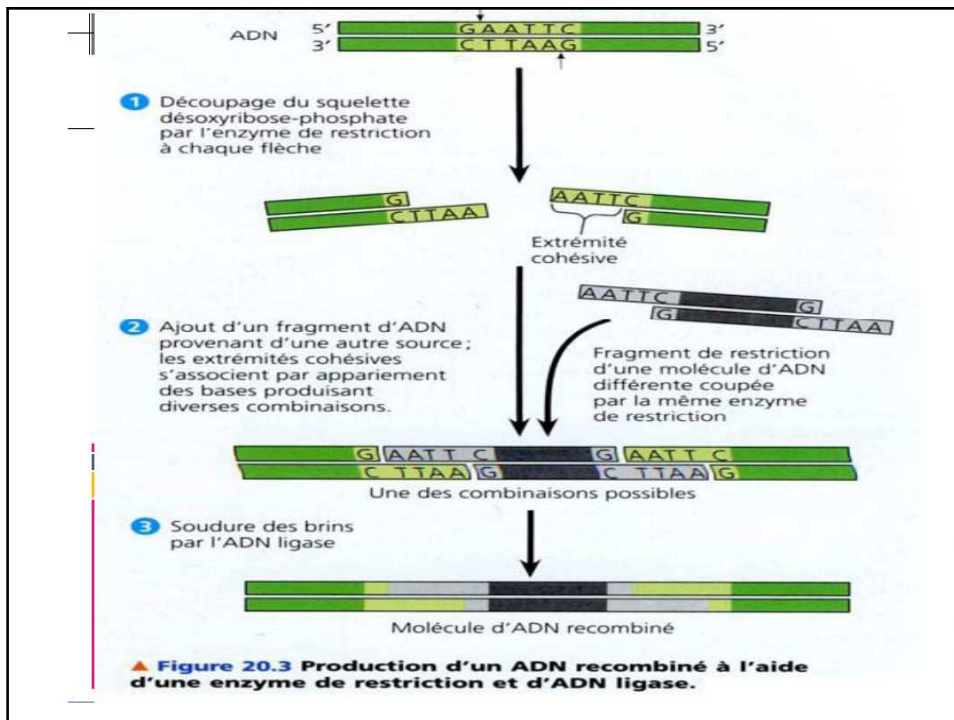
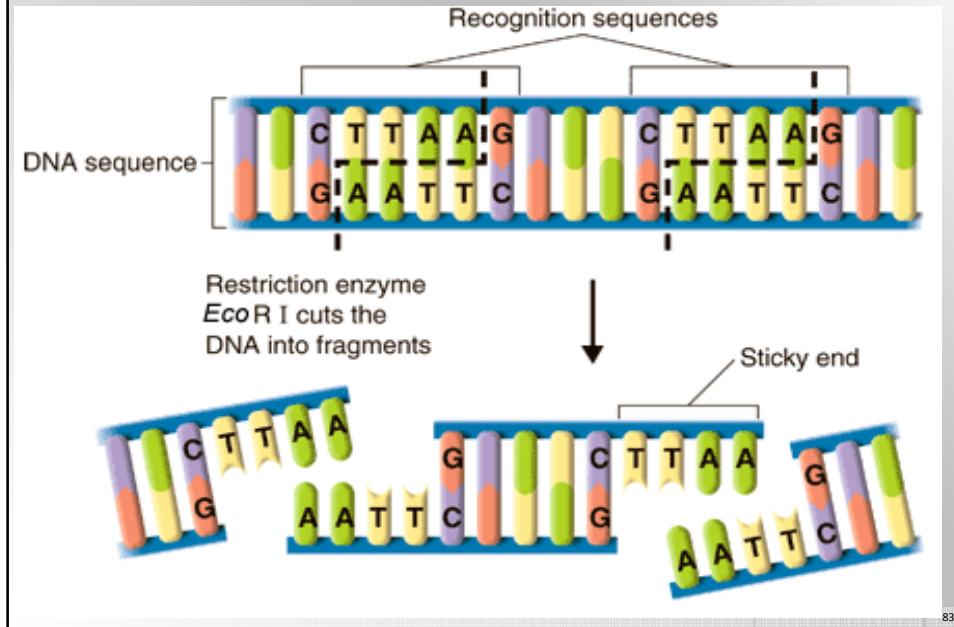


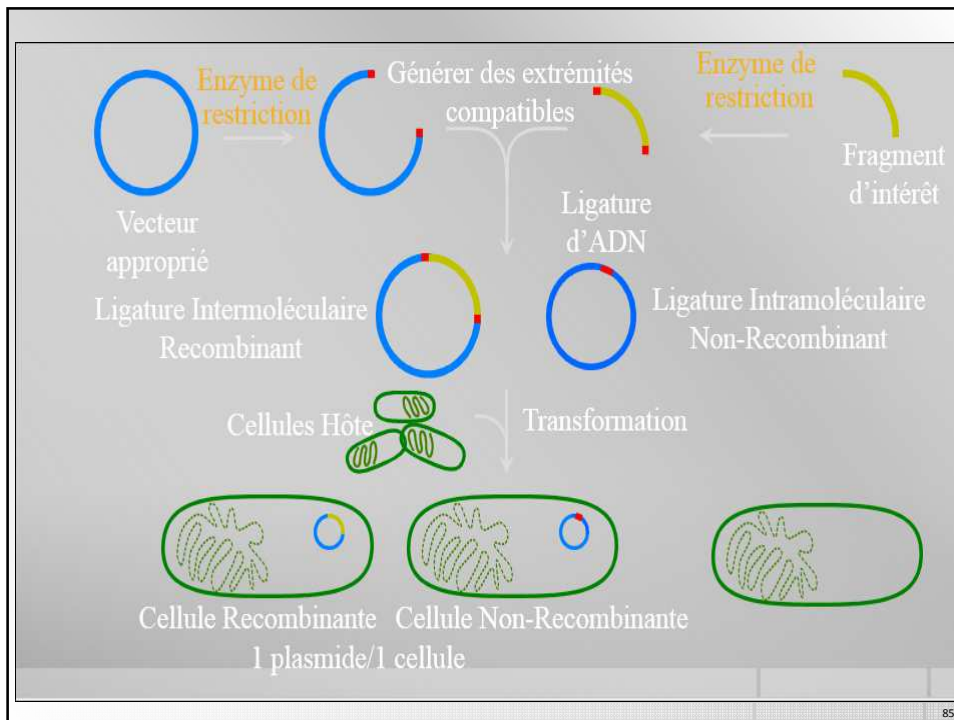


Liste non exhaustive des enzymes de restriction

Enzyme	Origine bactérienne	Site de restriction
Alu I	<i>Athrobacter luteus</i>	AG/CT
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G/GATCC
Bgl II	<i>Bacillus blobiggi</i>	A/GATCT
Eco RI	<i>Escherichia coli</i>	G/AATTC
Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i>	A/AGCTT
Hea III	<i>Haemophilus aegyptus</i>	GG/CC
Hpa II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C/CGG
Mbo I	<i>Moraxella bovis</i>	GA/TC
Pst I	<i>Providentia stuartii</i>	CTGCA/G
Taq I	<i>Thermophilus aquaticus</i>	T/CGA
Wba I	<i>Xanthomonas badrii</i>	T/CTAGA

Applications des enzymes de restriction : clonage moléculaire





85

Applications : clonage moléculaire

Afin que des extrémités collantes s'associent pour former une population de molécules chimériques les squelettes sucre-phosphate doivent être soudés ensemble par l'utilisation de l'ADN ligase qui crée des liaisons phosphodiester.

Domaines applications

Protéines recombinantes (médicaments):

- Insuline
- Hormone de croissance
- Albumine
- Facteur VIII
- Erythropoïétine (EPO)
- Interféron

Animaux transgéniques (modèles Mdies)

86

On distingue des sites de restriction obligatoires (toujours présents) et des sites de restriction variables

↑ Polymorphisme

Mst II

1 2 3 4 5

20Kb

Après digestion avec la même enzyme, la longueur des fragments diffère d'un individu un autre

*

Variabilité par la taille des fragments qui constitue un polymorphisme de restriction = RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) : peut être utilisé comme marqueur génétique

Forme 1 EcoRI ne coupe pas GCCGCATTCTA CGGCGTAAGAT	Forme 2 EcoRI coupe GCCGAATTCTA CGGCTTAAGAT
2 possibilités	

2 formes alléliques pour la même région

Site polymorphe

Forme 2

Forme 1

site EcoRI

5kbp

sonde unique marquée radioactivement

2kbp

5kbp	5kbp	5kbp	non coupé
2kbp	2kbp	2kbp	coupé
1	2-1	2	Phenotype
homozygote pour la forme 1	hétérozygote possédant les 2 formes	homozygote pour la forme 2	

