

LES ACIDES NUCLEIQUES

On distingue 2 catégories d'acides nucléiques :

L'ADN: Acide DésoxyriboNucléique

Il est présent:

- chez les Eucaryotes: dans le noyau (chromosomes et chromatine)
dans les mitochondries et chloroplastes
 - chez les bactéries: chromosome
plasmides
 - chez les virus à ADN : enfermé dans une coque protéique avec éventuellement enveloppe lipidique
- Il est, chez les Eucaryotes, associé à des protéines (nucléoprotéines). Il est le support de l'information génétique.

L'ARN: Acide RiboNucléique

Ils sont présents:

- chez les Eucaryotes: dans le noyau (nucléoles, ARNr)
dans le cytoplasme : libres ou associés à des protéines (ribosomes)
dans les mitochondries et chloroplastes
- chez les bactéries : dans le cytoplasme
- chez les virus : idem plus haut

Les ARN permettent l'expression de l'information génétique portée par l'ADN. Chez certains virus, l'ARN est le support de l'information génétique.

1. Structure Primaire Des Acides Nucléiques

ADN et ARN sont des polynucléotides.

Ils sont formés de l'enchaînement des *nucléosides 5' monophosphates via les pentoses, grâce à des liaisons 3'-5'phosphodiesters*

fonction alcool en 3' de l'un est estérifiée par une fonction de l'acide phosphorique lié en 5' de l'autre.

Ainsi, l'acide phosphorique engage 2 liaisons acides dans des fonctions phosphodiester ; la 3ème fonction acide reste libre et confère donc des propriétés acides aux "acides" nucléiques.

Les **bases azotées** *ne sont pas impliquées dans les liaisons entre monomères.*

Il se forme ainsi un enchaînement de nucléotides du type 5'-3-5'-3', conduisant à un dinucléotide, puis à des polynucléotides.

La *séquences des nucléotides, donnée par celle des bases*, représente la **structure primaire** des acides nucléiques.

Ainsi, une chaîne polynucléotidique va être caractérisée par:

1- *La nature du pentose* des nucléotides engagés: ribose (--> ARN), désoxyribose (--> ADN)

2- Le nombre, la nature et la séquence de ces nucléotides: ainsi, comme pour les protéines, on appelle séquence l'ordre dans lequel les nucléotides sont engagés. L'ADN est donc une combinaison des 4 nucléosides dA, dT, dG, dC et l'ARN de A, U, G, C.

3- La présence d'une extrémité portant un groupement phosphate sur le C 5': *c'est l'extrémité 5'phosphate.*

4- La présence d'une extrémité portant un groupement OH sur le C 3': *c'est l'extrémité 3'OH*

5- **Conséquences : conventions d'écriture.**

La séquence d'un acide nucléique est représentée d'une façon linéaire; se lit de gauche à droite depuis le 5'phosphate au 3'OH. Chaque nucléoside est désigné par l'abréviation de la base azotée.

Exemple : ADN: 5' (P) A-G-G-T-C-G-C-G-T-(OH) 3'

2. L'ADN: Structures Et Propriétés

• Observations

L'ADN a été isolé en 1868 mais son rôle dans le support de l'information génétique n'a été démontré que plus tard (cf plus loin). Des travaux complémentaires sur sa structure n'ont donc eu lieu que dans les années 1950.

On a constaté un certain nombre de faits :

- dans l'ADN, *la quantité d'A = la quantité de T; [C] = [G]. Par conséquent on a l'égalité de concentration entre les bases Puriques et les bases pyrimidiques.*
- *Le rapport des [A+T] / [C+G] est caractéristique d'une espèce.* Il est supérieur à 1 chez les animaux et végétaux.
- sous sa forme native, l'ADN présente une *viscosité est une densité plus élevée* que ne le laisserait supposer une *fibre unique*,
- à pH physiologique, les fonctions aminés $-NH_2$ et les groupements $-CO-NH-$ sont masqués et ne réagissent que pour $5 < pH < 11$, ce qui laisse supposer la présence de *liaisons faibles*,
- l'ADN natif présente une *absorption dans l'UV < l'absorption théorique* calculée d'après l'absorption des nucléotides qui le composent.
- les études de diffraction aux rayons X suggèrent une forme hélicoïdale.

• Modèle de la double hélice (Watson et Crick, 1953)

W et C se sont servis des résultats précédents pour proposer leur modèle:

- La molécule d'ADN est formée de 2 chaînes de polydésoxyribonucléotides enroulées pour former une double hélice. Les bases azotées sont dirigées dans le centre de l'hélice et les plans formés par les cycles des bases sont parallèles les uns aux autres et perpendiculaires à l'axe de l'hélice.

L'ADN est dit ainsi **bicaténaire**.

Le pas de l'hélice est de 3,4 nm, avec 10 plans par pas (soit une distance de 0,34 nm entre 2 plans).

L'hélice est **droite**.

Il existe 2 **sillons** de taille inégale, le petit et le grand sillon, qui permettent l'accessibilité de l'ADN aux protéines (enzymes de la réplication et de la transcription,...)

- Les 2 brins sont **complémentaires** : les bases A et T, ainsi que C et G sont dites complémentaires sont liées entre elles par des liaisons hydrogène (2 entre A et T, 3 entre C et G).

La connaissance de la séquence de l'un des brins permet de déterminer celle du brin opposé qui lui sera complémentaire.

- Les 2 brins sont **antiparallèles**, c'est-à-dire qu'ils "vont" dans des directions opposées: orientation tête-bêche 3'-5' pour l'un et 5'-3' pour l'autre.

La double hélice représente la structure seconde de l'ADN.

Rq: il existe une forme plus rare de l'ADN, dite **forme Z**, caractérisée par une hélice gauche, il semble que chez les eucaryotes, certaines régions sont sous forme Z, mais leur rôle exact est mal connu.

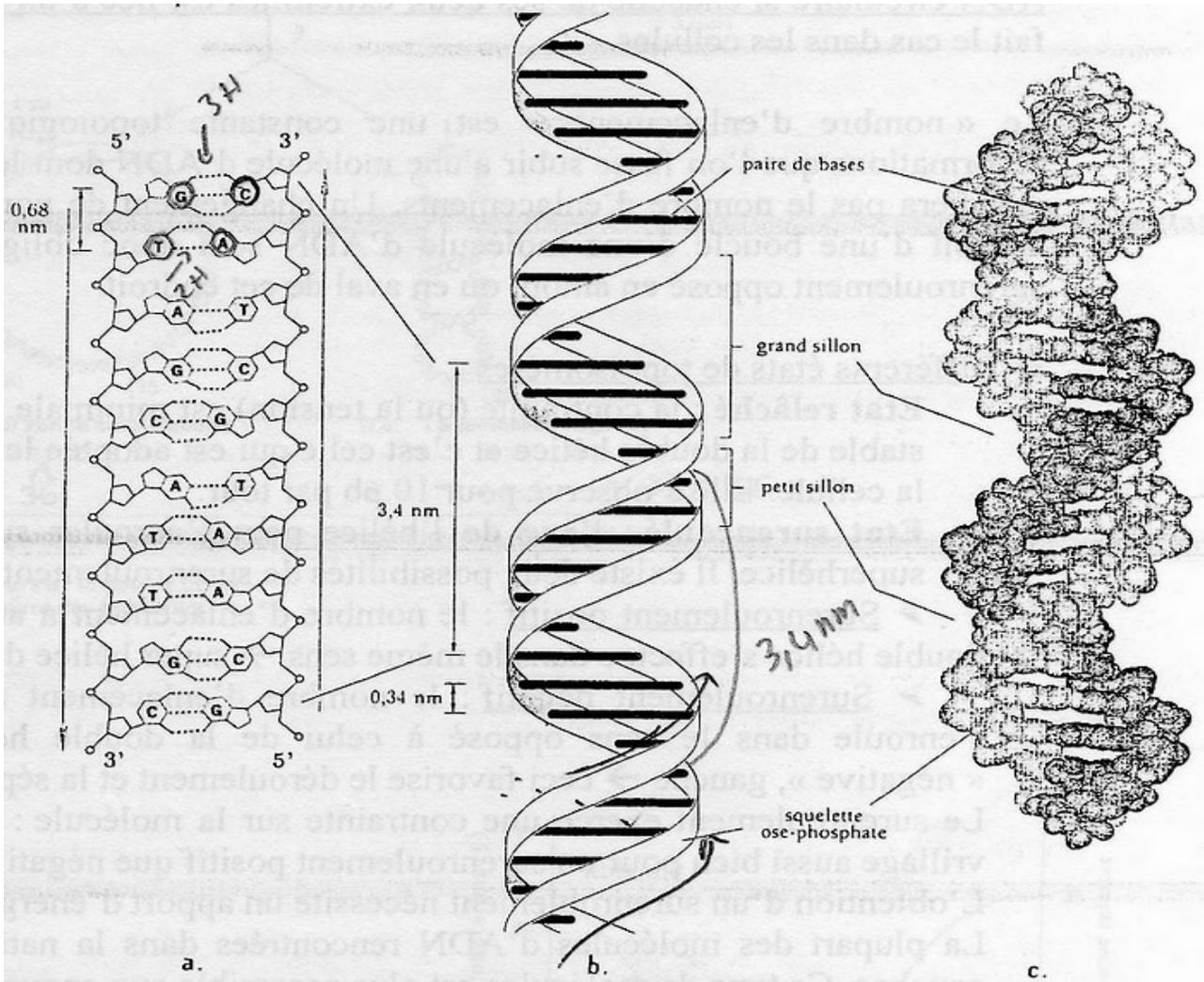
Ainsi, de même qu'une protéine est caractérisée par son nombre d'acides aminés, une molécule d'ADN sera caractérisée par son nombre de nucléotides, usuellement exprimé en **nombre de paires de bases (pb)**. Par exemple, un ADN de 1000 pb est formé de 2 brins complémentaires de 1000 nucléotides chacun.

A retenir: **MM 1 pb = 600 g. mol⁻¹ environ**

Configuration bicaténaire hélicoïdale

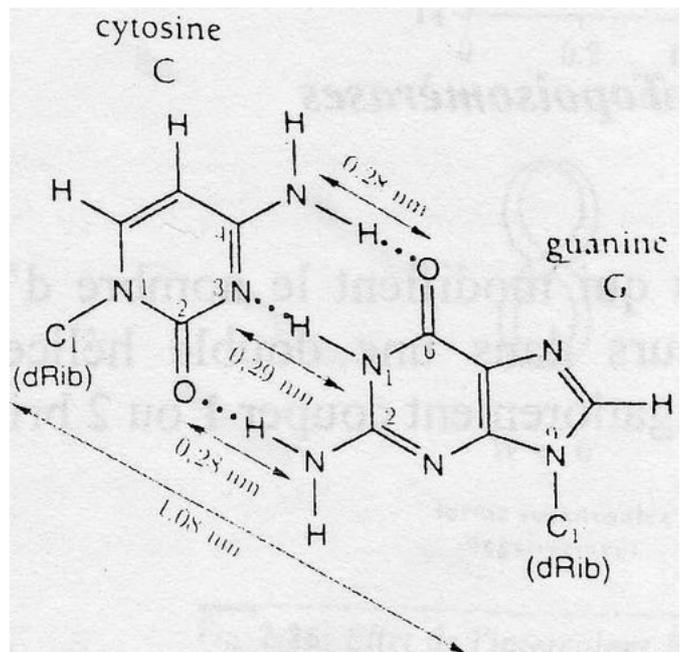
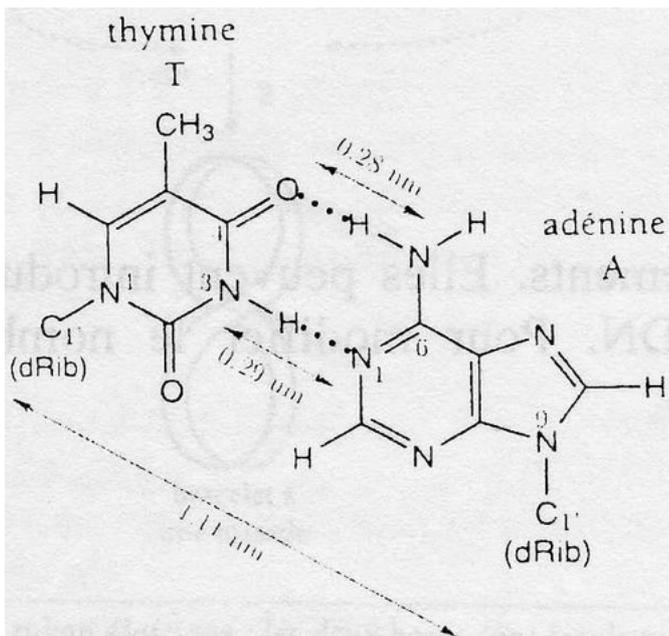
Représentation de la double hélice d'ADN

a-structure chimique déroulée ("en escabeau") de deux brins complémentaires et antiparallèle appariés; b-modèle montrant l'enroulement droit des deux brins; c-modélisation en mode compact d'un fragment de 21 paires de bases.



Liaisons hydrogène entre les bases

Dans la double hélice, les 2 chaînes sont reliées par des liaisons hydrogène entre bases azotées: **2 liaisons H entre A et T, 3 liaisons H entre G et C.**



• Structures d'ordre supérieur: topoisomères et topoisomérases

Topoisomères

➤ Définition

On considère 2 molécules d'ADN bicaténaire circulaire ayant exactement la même séquence de bases. Elles peuvent différer entre elles par ce que l'on appelle le nombre d'enlacements, c'est-à-dire le nombre de tours que fait l'un des brins autour de l'autre brin. On appelle alors «topoisomères» ces 2 ADN ne différant que par le nombre d'enlacements.

Les notions qui vont suivre ne s'appliquent théoriquement qu'aux ADN circulaires, c'est-à-dire qui n'ont pas d'extrémité libre. Cependant, un ADN linéaire peut se comporter comme un ADN circulaire si chacune de ses deux extrémités est liée à un point d'ancrage, ce qui est en fait le cas dans les cellules.

Le «nombre d'enlacements» est une constante topologique: quelles que soient les déformations que l'on fasse subir à une molécule d'ADN dont les extrémités sont fixes, on ne changera pas le nombre d'enlacements. Un changement de nombre de paire de bases en un endroit d'une boucle d'une molécule d'ADN sera donc obligatoirement compensé par un surenroulement opposé en amont ou en aval de cet endroit.

➤ Différents états de topoisomères

- **Etat relâché:** la contrainte (ou la tension) est minimale. C'est la configuration la plus stable de la double hélice et c'est celle qui est adoptée le plus souvent par l'ADN dans la cellule. Elle s'observe pour 10 pb par tour.

- **Etat surenroulé:** l'axe de l'hélice peut s'enrouler sur lui-même en formant une superhélice. Il existe deux possibilités de surenroulement.

> Surenroulement positif: le nombre d'enlacement a augmenté, l'enroulement de la double hélice s'effectue dans le même sens -> super hélice droite.

> Surenroulement négatif: le nombre d'enlacement a diminué, l'axe de l'hélice s'enroule dans le sens opposé à celui de la double hélice, selon une superhélice «négative», gauche --> ceci favorise le déroulement et la séparation locale des deux brins. Le surenroulement exerce une contrainte sur la molécule: cette contrainte provoque un vrillage aussi bien pour un surenroulement positif que négatif.

L'obtention d'un surenroulement nécessite un apport d'énergie.

La plupart des molécules d'ADN rencontrées dans la nature forment des superhélices gauches. Ce type de molécules est plus accessible aux enzymes de la transcription et de la réplication.

On peut séparer des topoisomères sur gel: plus un anneau d'ADN est désenroulé (= superenroulé négativement), plus il est vrillé, donc plus il est compact : théoriquement, il migrera plus qu'un ADN sous forme linéaire. Cependant, ce n'est pas toujours le cas, car la migration dépend de nombreux autres facteurs.

Topoisomérases

➤ Définition

Ce sont des enzymes qui modifient le nombre d'enlacements. Elles peuvent introduire ou éliminer des supertours dans une double hélice d'ADN. Pour modifier le nombre de supertours, il faut obligatoirement couper 1 ou 2 brins.

➤ Les différentes topoisomérases

II en existe de 2 types:

Les topoisomérases I: elles ne coupent qu'un brin de l'ADN bicaténaire. La coupure d'un des brins se fait au niveau d'une liaison phosphodiester, l'extrémité 3'OH reste libre tandis que le phosphate en 5' estérifie momentanément une tyrosine de l'enzyme. Le brin coupé peut alors tourner librement autour du brin intact, puis la liaison phosphodiester est rétablie.

Ces topoisomérases permettent de relâcher des superhélices sous tension. Elles existent chez les Procaryotes et les Eucaryotes.

Les topoisomérases II: Elles coupent les 2 brins de l'ADN bicaténaire. Elles sont dimériques, chaque brin étant coupé par une sous-unité.

➤ Intérêt des topoisomérases

- Virus et procaryotes:
 - L'ADN vrillé est plus compact, donc est plus facile à emballer dans un petit volume.
 - Les topoisomérases facilitent la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN: l'ARN polymérase ne se liera à l'ADN que s'il est déenroulé.
- Eucaryotes:
 - En plus des deux intérêts ci-dessus, les topoisomérases peuvent démêler les nœuds d'ADN.

➤ Application médicale des topoisomérases

Les inhibiteurs de la gyrase bactérienne sont des antibactériens. Ils bloquent la réplication de l'ADN donc la multiplication bactérienne.

Les inhibiteurs des topoisomérases humaines sont des anticancéreux.

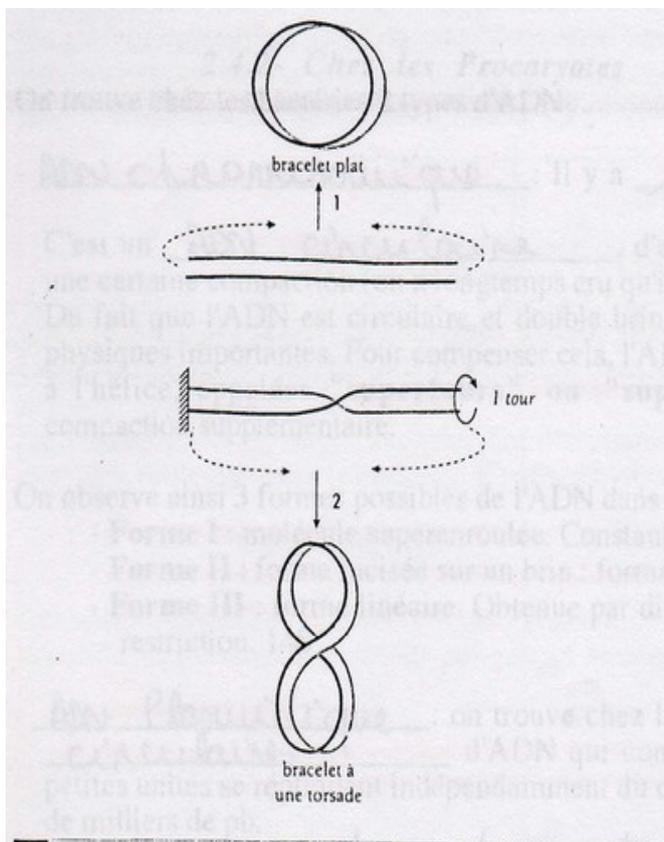


Fig. 2.25: Modèle du ruban élastique : les deux bords sont les deux brins de la double hélice.

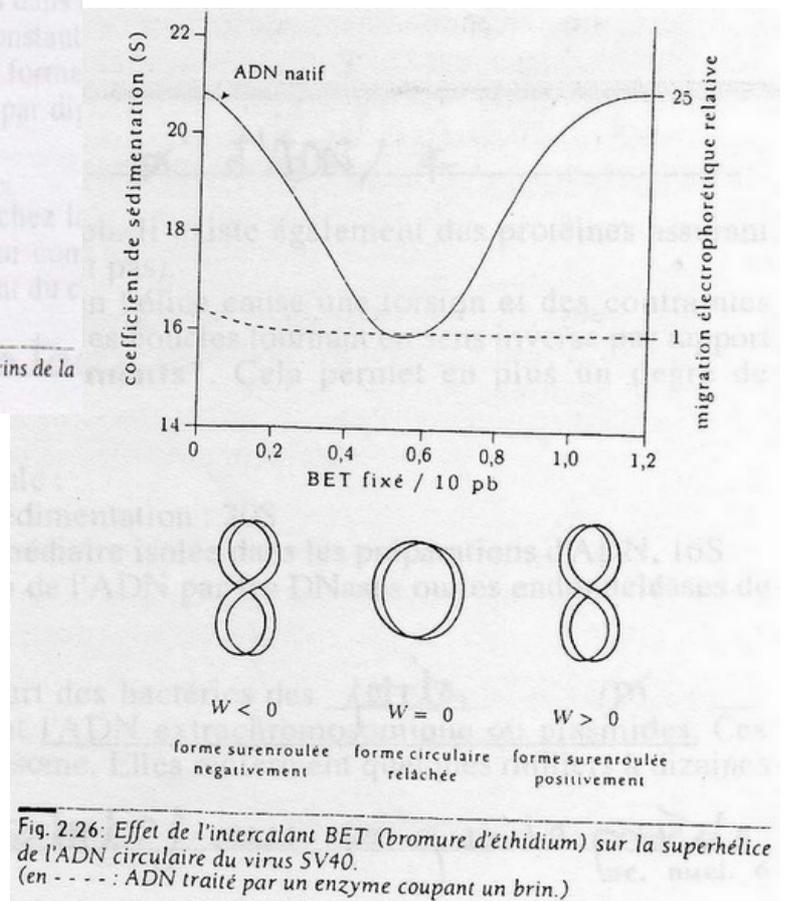


Fig. 2.26: Effet de l'intercalant BET (bromure d'éthidium) sur la superhélice de l'ADN circulaire du virus SV40. (en - - - : ADN traité par un enzyme coupant un brin.)

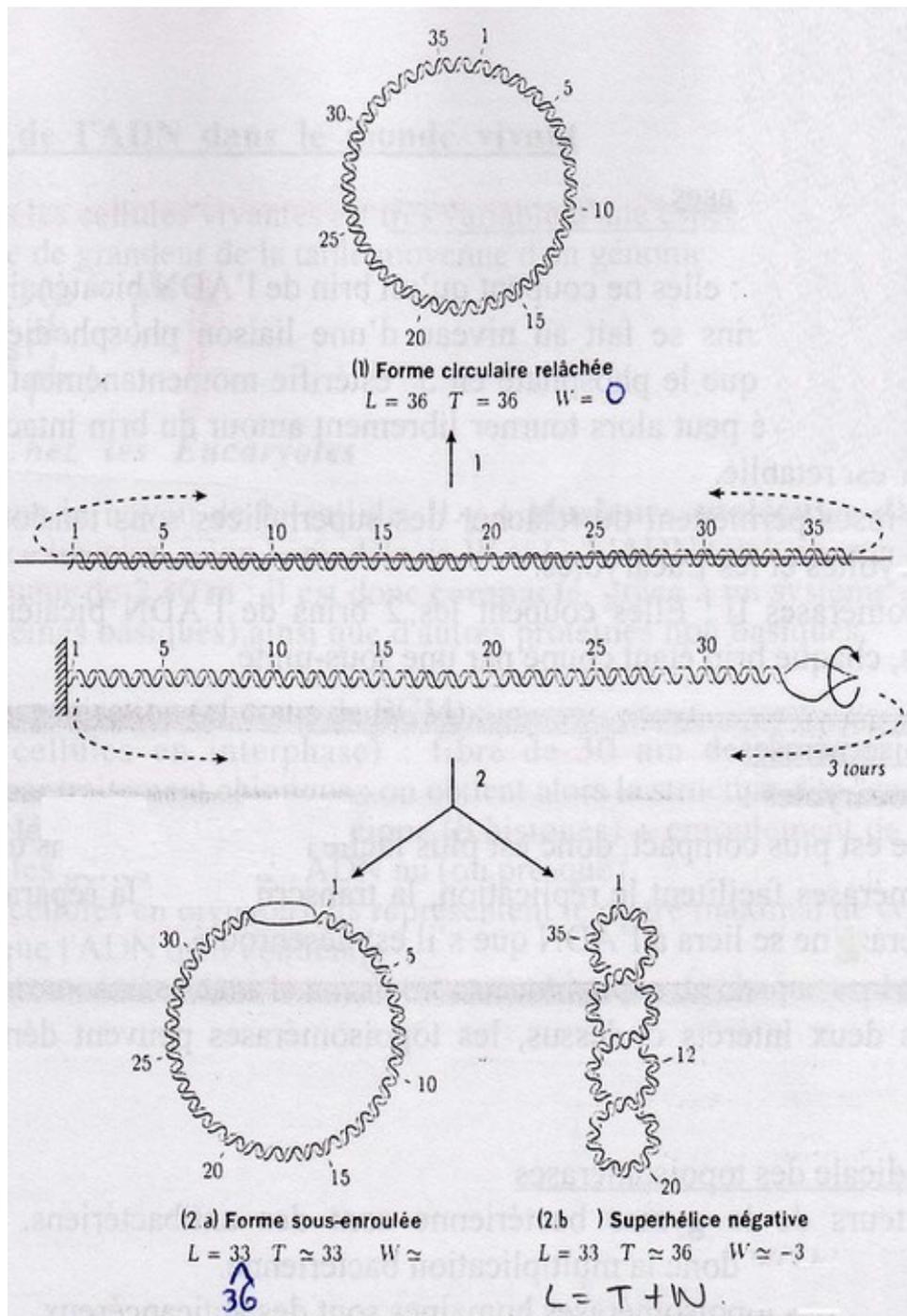


Fig. 2.24: Représentation schématique de formes différentes d'un ADN circulaire.

nombres : tours de la double hélice;

- - - : soudure des extrémités;

• **Diversité de l'ADN dans le monde vivant**

La quantité d'ADN dans les cellules vivantes est très variable d'une espèce à l'autre. Bien avoir en tête l'ordre de grandeur de la taille moyenne d'un génome:

- viral 10^4 à 10^5 pb
- bactérien 10^6 pb
- humain 10^9 pb

Chez les Eucaryotes:

L'ADN est contenu dans le noyau de la cellule. Il y a **plusieurs molécules d'ADN par cellule**. Il est organisé en double hélice linéaire, selon le modèle de W et C. L'ADN total, chez un homme, s'il était déroulé, représenterait une longueur de 2,30m: il est donc **compacté**, grâce à un système de protéines, les **histones** et les **protamines** (protéines basiques) ainsi que d'autres protéines non basiques.

On distingue 2 types d'organisation (cf cours de BCM):

- **chromatine** (cellules en interphase): fibre de 30 nm de diamètre, que l'on peut dérouler artificiellement par traitement chimique; on obtient alors la structure dite "en collier de perles". Chaque perle est un **nucléosome** = noyau protéique (8 histones) + enroulement de 146 pb d'ADN autour de ce noyau. Entre les perles, on a de l'ADN nu (ou presque).
- **chromosomes** (cellules en division), ils représentent le degré maximal de compaction (longueur 8000 fois plus petite que l'ADN qu'il contient).

Le nombre de chromosomes dans le noyau est caractéristique de chaque espèce.

Il existe un **ADN particulier dans les mitochondries (et dans les chloroplastes):**

- composé de 2 brins
- circulaire
- il code des ARNr, t, et m.
- le code génétique mitochondriale et légèrement différent du code nucléaire.
- *l'hérédité de l'ADN mitochondrial est cytoplasmique: seul l'ADN mitochondriale de la mère est transmis (car le spermatozoïde ne transmet pas de mitochondrie).*

Chez les Procaryotes:

On trouve chez les bactéries 2 types d'ADN:

- *ADN chromosomique*: Il y a *une seule molécule d'ADN par cellule*.

C'est un *ADN circulaire* d'environ 1Mpb. Il existe également des protéines assurant une certaine compaction (on a longtemps cru qu'il n'y en avait pas).

Du fait que l'ADN est circulaire et double brin, la forme en hélice cause une torsion et des contraintes physiques importantes. Pour compenser cela, l'ADN réalise des boucles tournant en sens inverse par rapport à l'hélice, appelées "**supertours**" ou "**superenroulements**". Cela permet en plus un degré de compaction supplémentaire.

On observe ainsi 3 formes possibles de l'ADN dans la cellule:

- **Forme I**: molécule superenroulée. Constante de sédimentation: 20S
- **Forme II**: forme incisée sur un brin: forme intermédiaire isolée dans les préparations d'ADN, 16S
- **Forme III**: forme linéaire. Obtenue par digestion de l'ADN par les DNases ou les endonucléases de restriction. 14S
- *ADN plasmidique*: on trouve chez la plupart des bactéries *des petites molécules circulaires* d'ADN qui constituent *l'ADN extrachromosomique ou plasmides*. Ces petites unités se répliquent indépendamment du chromosome. Elles renferment quelques milliers à dizaines de milliers de pb.

Il a pour rôle *d'apporter un avantage sélectif aux bactéries qui le possèdent*.

Ils sont souvent transmissibles entre bactéries (--> l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques dans les hôpitaux). En outre, ces plasmides sont des outils essentiels au génie génétique (voir plus tard).

Chez les Virus à ADN:

Les virus sont des particules formées de **l'association d'un seul acide nucléique et des protéines**, constituant la **nucléocapside**. Certains virus ont en plus une enveloppe

lipidique (cf Microbio). Ils possèdent les acides nucléiques les plus courts... et parfois simple brin.

Le virus a dans son ADN les gènes codant pour ses protéines de capsidie ou d'enveloppe, ainsi que pour des enzymes particuliers. Il est donc parasite obligatoire et va détourner le métabolisme cellulaire à son profit (pour cette incapacité à se reproduire seul et pour cette absence de métabolisme, les virus ne sont pas considérés par les biologistes comme des êtres vivants).

• Propriétés de l'ADN

Elles sont dues d'une part à sa composition (nucléotides) et à sa structure (longues chaînes, double hélice).

Absorption dans l'UV:

Nous avons vu dans le 1er chapitre que les bases azotées; du fait de leur *structure aromatique*, absorbent fortement dans l'*UV*, avec un maximum à *260nm*.

On peut ainsi, à condition de posséder un spectrophotomètre ayant une lampe UV et d'opérer dans des cuves spéciales (cuves en quartz, mais maintenant cuves en polystyrène plus économiques...), doser l'ADN par mesure de l'absorbance à 260 nm.

Nécessité technique: la solution d'ADN *doit être pure*. En effet, dans les protocoles de purification de l'ADN, on peut contaminer la- préparation d'ADN par des protéines (qui absorbent elles aussi fortement dans l'UV): on mesure alors le *rapport A260/A280 nm*.

Rq: *L'ADN simple brin absorbe plus que l'ADN double brin*: cela vient du fait que dans l'ADN double brin, les bases sont partiellement masquées.

1 UA à 260 nm correspond à 50 ng.mL⁻¹ d'ADN db et à 40 ng.mL⁻¹ d'ADN sb.

Effet de la température: notions de dénaturation et de renaturation:

➤ Dénaturation

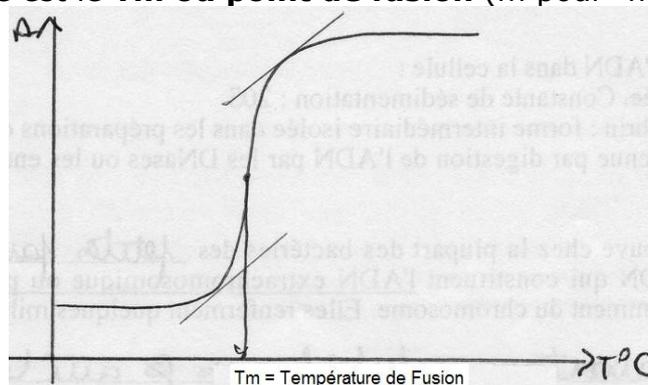
* Définition: Si on chauffe une solution d'ADN, on rompt les liaisons hydrogène entre les deux brins et on démasque donc les bases azotées: la dénaturation est la perte de la structure tridimensionnelle, sans rupture de liaisons covalentes, de la chaîne polynucléotidique. La rupture des liaisons hydrogène entre les pb provoque la séparation des 2 brins de la double hélice: *L'ADN totalement dénaturé est monocaténaire*.

* Conséquences: Comme l'ADN dénaturé est simple brin,

- la viscosité diminue;

- l'absorbance augmente: c'est *l'effet hyperchrome*.

On peut suivre l'absorbance en fonction de la température; on obtient la courbe de dénaturation. Celle-ci a une allure sigmoïde. Elle possède un point d'inflexion qui correspond à la température à laquelle des molécules d'ADN est dénaturée. Cette température particulière est le **Tm ou point de fusion** (m pour "melting").



* Facteurs de variation du Tm d'un ADN:

- le Tm dépend *du pH et de la force ionique*. En effet, la double hélice est d'autant plus stable que les forces de répulsion entre groupements phosphates de chaque brin vont être faibles.

- mais surtout, le Tm dépend *de la composition en bases de l'ADN*. On a vu que

la température rompt les liaisons hydrogène entre chaque brin d'ADN. Or, il y a 2 liaisons à rompre entre chaque A-T et 3 entre chaque G-C ; ainsi, la **Tm dépend de la teneur de l'ADN en GC** : le Tm augmente de 0,4°C lorsque le % de GC augmente de 1%.

* Applications:

- la mesure du Tm permet d'avoir une idée de la composition en bases de l'ADN.
- le % en GC est utilisé comme **critère de classification des bactéries**. En effet, des espèces d'un même genre bactérien ont des % en GC proches.

➤ Renaturation:

* Définition: Une solution d'ADN dénaturé peut être refroidie. 2 cas sont possibles:

- refroidissement rapide (ex: mettre l'ADN ayant été chauffé dans la glace). L'ADN reste dénaturé en grande partie.
- refroidissement lent (ex: on laisse le tube sur la pailleasse). Les 2 brins complémentaires se réassocient et on retrouve l'ADN db de départ. l'ADN est dit **renaturé ou encore rehybridé**.

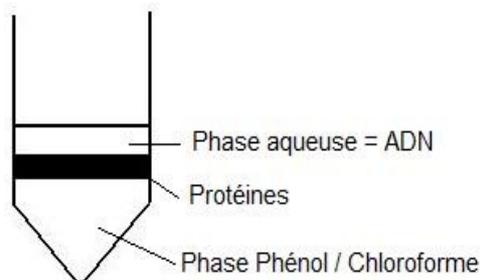
* Application: Le chauffage de l'ADN suivi d'un refroidissement lent est à la base d'une technique importante de biologie moléculaire: **l'hybridation**. Celle-ci est possible dès que l'on dispose de 2 simple brins complémentaires (ADN/ADN ou ARN/ADN). Cela permet de repérer un fragment d'ADN ou d'ARN connu dans un milieu (sur un gel d'agarose, sur une coupe de tissus,...) en y fixant un fragment de séquence complémentaire, en général radioactif ou fluorescent que l'on appelle alors **sonde moléculaire**.

Solubilité

- L'ADN est soluble *dans l'eau et les solutions salines à faible concentration*.
- En concentration saline plus importante, *l'ADN précipite (phénomène de « relargage »)* (pour les mêmes raisons que les protéines). De plus cette précipitation est facilitée **en présence d'éthanol** (ou d'isopropanol) car l'ADN y est insoluble.

Ces propriétés sont utilisées dans les protocoles de purification et de fractionnement-dé l'ADN (cf TP extraction ADN).

* Application: Un procédé classique de purification de l'ADN consiste à traiter une solution aqueuse d'ADN par le phénol qui dénature les protéines. Le mélange phénol-chloroforme est généralement utilisé car il est plus efficace. Les phases sont séparées par centrifugation:



Les traces de phénol (qui pourrait inhiber les enzymes utilisées dans les étapes suivantes) sont éliminées par un nouveau traitement au chloroforme.

Rq: lorsque l'acide nucléique provient directement d'extraits cellulaires, il est généralement traité par des enzymes protéolytiques (protéinase K) afin d'hydrolyser les protéines au préalable.

Viscosité

Les solutions d'ADN ont une grande viscosité en raison de la grande longueur de la double hélice et de sa rigidité ; les mesures de viscosité permettent de suivre la dénaturation de l'ADN.