

3. L'ARN: Structure, Différents Types Et Propriétés

• Structure

Les ARN sont des polymères de RiboNucléotides liés par des liaisons phosphodiester 5'-3'. Les bases azotées sont A-U, C-G. Le sucre est le Ribose.

L'ARN est une molécule monocaténaire, c'est-à-dire simple brin. Cependant il existe des structures où il y a un repliement en « doubles brins ».

• Classification des ARN

La classification des ARN est liée à leurs fonctions. Chaque type d'ARN possède des éléments structuraux propres.

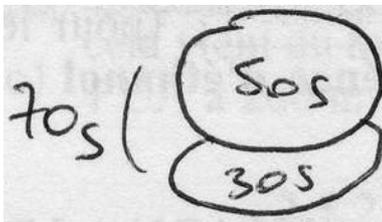
ARN ribosomiaux (ARNr) (80% de l'ARN)

➤ Structure

Les ARNr sont localisés au niveau des ribosomes : en effet, ces derniers sont en fait des particules à base de 35% de protéines et 65% d'ARN. On peut les isoler facilement à partir de broyats cellulaires par ultracentrifugation. On les désigne pour cette raison par leur constante de sédimentation, exprimée en Svedberg (S) (cf cours méthode centrifugation).

- Chez les bactéries:

Les ribosomes ont une constante de sédimentation de 70S. On peut les dissocier en 2 sous-unités de 50S et 30S (les constantes de sédimentation ne sont pas additives...). Ainsi:

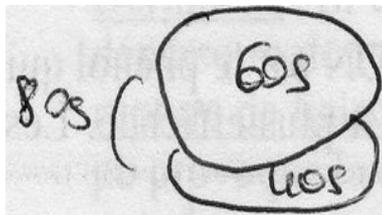


50S: 2 types d'ARN; 31 protéines

30S : 1 ARN; 21 protéines

- Chez les Eucaryotes:

Les ribosomes ont une constante de sédimentation de 80S \neq 60S + 40S.



60S: 3 types d'ARN; 45 protéines

40S: 1 type d'ARN; 31 protéines

➤ Localisation des ribosomes

Les ribosomes sont présents:

- dans le cytoplasme à l'état libre (synthèse des protéines cytoplasmiques).
- dans le cytoplasme, liés au réticulum endoplasmique (protéines à destination membranaire ou intra-organite).
- dans les mitochondries et les chloroplastes: toutefois, ces ribosomes se rapprochent de ceux des bactéries (cf théorie endosymbiotique...).

Noter que les ARNr sont **synthétisés dans le noyau** à partir de l'ADN et s'assemblent **au niveau des nucléoles** avec les protéines, puis passent dans le cytoplasme.

➤ Fonction des ribosomes

On le verra en 2^{de} année, les ribosomes interviennent dans la synthèse des protéines (appelée aussi "traduction"), à partir des ARNm.

ARN messagers (ARNm) (5% de l'ARN)

➤ Structure

Les ARNm sont monocaténaires et ont une durée de vie très courte. Ce sont des copies en ARN de l'ADN contenu dans les gènes : leur séquence est complémentaire de certaines séquences de l'ADN (cf chapitre notion de gènes).

➤ Localisation des ARNm

Ces copies d'ADN sont réalisées dans le noyau, puis exportées dans le cytoplasme (cf cours transcription), où elles sont ensuite traduites en protéines grâce aux ribosomes: cf localisation des ribosomes.

➤ Fonction des ARNm

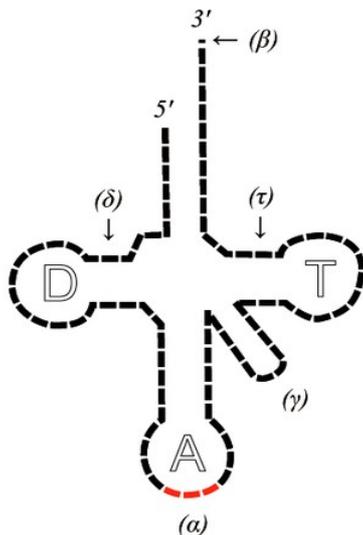
Ils sont les intermédiaires entre l'ADN et les protéines.

ARN de transfert (ARNt) (15% de l'ARN)

➤ Structure

Ils présentent plusieurs particularités structurales liées à leur fonction:

- petite taille: de 73 à 93 nucléotides.
- structure typique **en trèfle**, avec de nombreuses régions en structure II (appariement de bases).
- existence d'un **anticodon** : triplet de nucléotides, complémentaire des codons de l'ARNm
- l'extrémité 3'OH **fixe l'acide aminé** correspondant au codon de l'ARNm. Elle possède la séquence CCA (constante pour tous les ARNt)
- présence de nombreux **nucléotides modifiés** (environ 1 sur 10).



- (α): anti-codon (3 nucleotides)
- (β): site de fixation de l'acide aminé
- (γ): boucle variable
- (δ): branche D
- (τ): branche T
- A :Boucle de l'anticodon
- D: Boucle D
- T: Boucle T

➤ Localisation et fonction des ARNt

Les ARNt sont synthétisés, à partir de l'ADN, dans le noyau des cellules Eucaryotes. Ils passent ensuite dans le cytoplasme, où ils jouent un rôle fondamental dans la traduction. En effet, ils apportent les acides aminés aux ribosomes pour construire les protéines. Ils sont qualifiés **d'adaptateurs**. Il existe une soixantaine d'ARNt différents (compte tenu de dégénérescence du code génétique, cf plus loin).

ARN chez les Virus

De nombreux virus possèdent un génome à base d'ARN:

- Certains possèdent un ARN bicaténaire, en hélice, analogue à l'ADN. C'est le cas de virus des végétaux.
- les virus à ARN monocaténaire possèdent une ou plusieurs molécules d'ARN (cf le virus HIV qui en a 2).

• **Propriétés de l'ARN**

Ce sont globalement les mêmes que l'ADN.

* Comme l'ADN, il présente un maximum d'absorption à 260 **nm**, donc on peut le doser également à cette longueur d'onde

* Solubilité:

- Les propriétés de solubilité des ARN sont équivalentes à celles de l'ADN. Il existe cependant une petite différence: les ARN ne précipitent pas à 0,1 mol.L⁻¹ en NaCl,

mais restent solubles. Cela permet de les séparer facilement de l'ADN.

- Les ARN sont précipitables par les cations lourds (exemple : Li^+)

* L'ARN est **sensible à l'hydrolyse alcaline** (cf plus loin) contrairement à l'ADN.

4. Détermination Des Séquences Des Acides Nucléiques

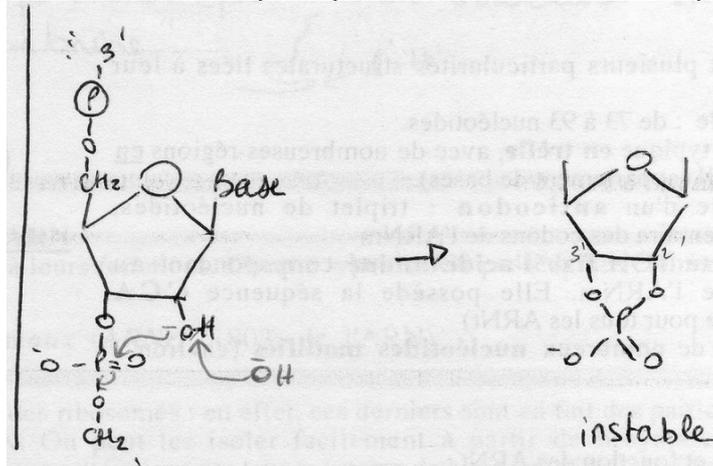
La détermination de la séquence des acides nucléiques est réalisée selon un procédé analogue à celui du séquençage des protéines, à savoir: *hydrolyse chimique ou enzymatique* suivie d'une *séparation des fragments par chromatographie ou électrophorèse*. Des méthodes modernes existent depuis une vingtaine d'années, que nous verrons également.

La détermination de la séquence de acides nucléiques est bien plus difficile que celle des protéines, car il n'existe que 4 bases dans un acide nucléique donné (au lieu de 20). Les premières séquences ont été réalisées sur des ARNt, du fait de leur faible taille et de la présence de bases "anormales" qui servent de point de repère..

• Méthodes d'hydrolyse de l'ADN et de l'ARN

Hydrolyse alcaline des ARN

L'hydrolyse alcaline se fait selon un mécanisme impliquant un composé intermédiaire cyclique 2'-3' (via le phosphate). Après rupture des liaisons phosphodiester, on obtient un mélange de nucléosides 2' et 3' monophosphates et l'hydrolyse des ARN est ainsi totale. En revanche, les ADN sont résistants à l'hydrolyse alcaline car ils n'ont pas de -OH sur le C2'.

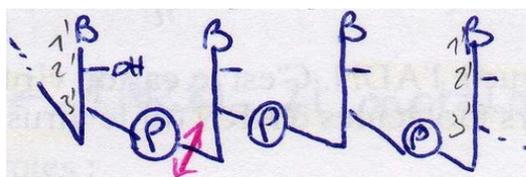


Hydrolyse par les RNases

➤ RNase pancréatique

- Il s'agit d'une endonucléase: elle coupe à l'intérieur des chaînes d'ARN. Elle agit selon le même mécanisme que lors de l'hydrolyse alcaline (d'où l'explication que les ADN y soient résistants).

- Elle a une certaine spécificité: elle ne coupe que si le nucléotide du côté 3 est pyrimidique. Elle libère donc des oligonucléotides 3'phosphate.



➤ RNase T1

C'est une endonucléase qui coupe lorsqu'il y a du côté 3' une guanosine (ou une inosine, nucléotide rare trouvé dans les ARNt). Elle libère également des nucléotides 3'P.

➤ RNase U2

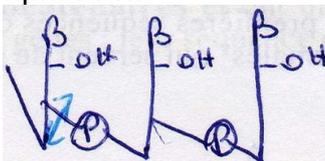
C'est une endonucléase, mais sa spécificité est plus large: A ou G côté 3'. Elle libère également des nucléotides 3'P.

Son intérêt est de l'utiliser *en complément de la RNase 77*. En effet, on fait agir dans un premier temps la RNase TI, puis, sur les fragments obtenus, on fait agir la U2 qui coupe alors du côté des A.

Hydrolyse par les phosphodiesterases

* Phosphodiesterase de venin de serpent

- Il s'agit d'une exonucléase: elle attaque les oligonucléotides à partir de leur extrémité 3' **si celle-ci n'est pas phosphorylée**.
- Elle libère cette fois des nucléosides 5'P et agit de manière récurrente.
- Elle agit sur l'ADN et sur l'ARN simple brin.



* Phosphodiesterase de rate

- C'est une exonucléase qui agit sur l'ADN et sur l'ARN, simple brin.
- Elle hydrolyse à partir du côté 5', **si celui-ci est non phosphorylé**.
- Elle libère des nucléosides 3'P et agit de manière récurrente.

Hydrolyse par la phosphatase alcaline

- Il s'agit d'une enzyme qui détache les groupements phosphates situés aux extrémités d'un polynucléotide. On qualifie ce type d'enzyme, pour cette raison, de phosphomonoestérase (et non plus de phosphodiesterase).

Action des DNases

Il s'agit d'endonucléases. Les premières DNases connues étaient moins spécifiques que les RNases. On peut citer:

- **la DNase I** (= DNase pancréatique): elle engendre des nucléosides **5'P**.
- **la DNase II** (= DNase acide): elle engendre des nucléosides **3'P**.

Il existe chez les bactéries des endonucléases beaucoup plus spécifiques, qui digèrent l'ADN au niveau de séquences très particulières (double brin). Ce sont les endonucléases de restriction. Elles servent aux bactéries à digérer tout ADN étranger qui s'introduirait dans la cellule, comme celui des bactériophages (l'ADN homologue est protégé par méthylation d'une base sur chaque brin au niveau du site de coupure). Elles coupent l'ADN **bicaténaire** au niveau de courtes séquences (4 à 6 nucléotides), le plus souvent symétriques (= **palindromes**) et présentes en très petit nombre dans les molécules d'ADN.

Exemple:

endonucléase	origine	site de coupure
EcoR I	<i>Escherichia coli</i>	G↓AATTC CTTAAG↓
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G↓GATCC CCTAGG↓
Hae III	<i>Haemophilus aegyptus</i>	GG↓CC CCGG↓

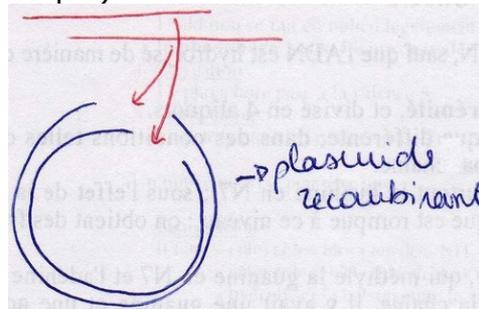
Formation d'extrémités à bouts cohésives, dits à "bouts collants"

Formations d'extrémités à bouts francs

- Application:

La coupure par une endonucléase du type EcoR I ou BamHI produit des fragments possédant des **extrémités cohésives**= des extrémités monocaténares ayant des séquences complémentaires : ceci permet de souder spécifiquement 2 fragments d'ADN ayant des origines différentes, mais ayant été hydrolysés par la même endonucléase de restriction. Cette propriété est utilisée lors d'expérience de recombinaison *in vitro*, en particulier pour introduire des séquences d'ADN d'origine diverse dans des phages ou des

plasmides (cf cours génie génétique).



• Détermination de la séquence des acides ribonucléiques

Le séquençage de l'ARN est utilisé pour déterminer la séquence des ARNr, ARNt, ou encore l'ARN génomique de certains virus (= à ARN). Pour cela, plusieurs techniques sont utilisables.

Hydrolyse enzymatique suivie de séparation des fragments

A l'aide des différentes techniques vues au §4.1, on réalise l'hydrolyse partielle ou totale puis on sépare les fragments obtenus:

- par chromatographie d'exclusion en colonne: méthode lourde car elle nécessite une grande quantité de matériel, mais permet par la suite la caractérisation des nucléotides, en particulier les nucléotides rares.
- par électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide: cette technique requiert le marquage radioactif des ARN au ^{32}P , pour permettre la visualisation des fragments d'ARN (par application d'un film d'autoradiographie sur l'électrophorégramme).

Rq: marquage radioactif de l'ARN:

- *in vivo*, en cultivant les cellules sur un milieu contenant du ^{32}P ,
- *in vitro*, après coupure par les enzymes,
- en remplaçant le phosphate en 5' par du phosphate contenant du ^{32}P ,
- ou en ajoutant en 3'-OH un phosphate contenant du ^{32}P .

Cas d'ARN courts (<70 nucléotides)

- Seule l'extrémité 5' de l'ARN est marquée au ^{32}P (par une polynucléotide kinase et de l'ATP $^{32}\text{P}\gamma$).
- On soumet ensuite différents aliquotes à une digestion enzymatique par différentes enzymes spécifiques (cf §4.1) dans des conditions, où, statistiquement il n'y aura qu'une coupure par chaîne.
- Les fragments sont ensuite fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide: seuls les fragments marqués au ^{32}P seront visualisables par autoradiographie.
- Parallèlement une hydrolyse alcaline plus ou moins partielle permet de générer des fragments de toutes les tailles possibles = repères.

• Détermination de la séquence des acides désoxyribonucléiques

Depuis 20 ans, des méthodes ont été mises au point pour déterminer la séquence de l'ADN. L'ADN à séquencer étant parfois de taille importante, on procède en plusieurs étapes:

- hydrolyse de l'ADN par les endonucléases de restriction
- séparation des fragments et séquençage de ceux-ci. Pour ce séquençage, 2 méthodes existent.

La méthode de Maxam et Gilbert

Le principe est semblable à celui présenté pour les ARN, sauf que l'ADN est hydrolyse de manière chimique et non enzymatique.

- 1- Le fragment d'ADN est **marqué au ^{32}P à une extrémité**, et divisé en 4 aliquots.
- 2- Chacun d'eux est soumis à une hydrolyse chimique différente, dans des conditions telles qu'il n'y ait qu'une coupure (ou un faible nombre de coupures) par chaîne.

- un traitement au diméthylsulfate, qui méthyle surtout la guanine en N7 ; sous l'effet de la chaleur, la guanine est détachée et la chaîne polynucléotidique est rompue à ce niveau: on obtient des fragments se terminant par une guanine.
 - un traitement au diméthylsulfate en milieu acide, qui méthyle la guanine en N7 et l'adénine en N3: on obtient des fragments se terminant là où dans la chaîne, il y avait une guanine et une adénine. Par comparaison avec la réaction précédente, on en déduit la position des adénines.
 - un traitement par l'hydrazine en milieu NaCl 1 mol.L⁻¹ permet de déterminer les fragments se terminant par C
 - un traitement par l'hydrazine sans NaCl permet de couper au niveau des C et des T. Par comparaison avec la réaction précédente, on en déduit la position des thymidines.
- 3- Les fragments engendrés par ces 4 réactions sont séparés en parallèle par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en fonction de leur taille. Le fragment le plus court se retrouve au bas du gel, le plus long en haut.
Deux fragments successifs ont une taille qui ne diffère que d'un seul nucléotide.
- 4- La révélation se fait par **autoradiographie**. On lit ainsi, de bas en haut, la séquence de l'ADN sur une autoradiographie.
 Actuellement, on sépare des fragments allant de 1 à 300 nucléotides (gels de 40 cm de long). Pour établir la séquence de fragments d'ADN plus longs, on répète l'opération sur des fragments de préférence légèrement chevauchants obtenus par différentes enzymes de restriction.

La méthode de Sanger, dite des « didéoxynucléotides » (Nobel en 1976)

Cette méthode est pratiquement utilisée à l'heure actuelle à la place de la précédente.

- L'ADN à séquencer est clone (c-à-d inséré) sous forme **simple brin** dans un vecteur particulier, le phage M13.
- On utilise ce fragment pour réaliser, au moyen de l'ADN polymérase I, le brin complémentaire (on fait en fait, grâce à une amorce, une réplication in vitro). La réplication nécessite des nucléotides triphosphates dNTP. L'un d'eux est marqué par du ³²P sur le Pu.
- On réalise 4 réactions de polymérisation indépendantes, en introduisant dans chaque cas un type de **didéoxynucléotide** = ne possédant d'-OH ni en 2', ni en 3'. Lorsqu'un tel nucléotide est incorporé, il y a donc arrêt de la synthèse. Le rapport ddNTP/dNTP (pour 1 N donné) est tel que qu'on arrive à avoir une incorporation de ddNTP au hasard et donc des fragments de tailles différentes ayant tous le ddNTP en 3'.
- On obtient ainsi une série de fragments d'ADN ne différant que d'un seul nucléotide et se terminant par un didéoxynucléotide. On peut alors, après électrophorèse et autoradiographie, lire de bas en haut la séquence du brin néosynthétisé (= complémentaire du brin ayant servi de matrice), et donc en déduire la séquence du brin d'ADN de départ.