

Il n'existe que deux différences : on trouve de l'uracile à la place de la thymine (ce qui n'en change pas les propriétés d'appariement) et le sucre est un ribose au lieu d'un désoxyribose.

Le 2'-hydroxyle : petite différence, grands effets

La présence d'un groupement 2'-OH, qui différencie le ribose du désoxyribose, peut sembler être un changement mineur à première vue. Pourtant cette différence d'un atome d'oxygène a des répercussions à la fois structurales et chimiques sur les propriétés de l'ARN.

Effet structural

Le cycle à cinq atomes du ribose et du désoxyribose est un cycle furanose (dérivé du furane) qui est saturé et donc non-plan. Il en résulte que le sucre peut en principe adopter plusieurs conformations spatiales dont les plus favorables sont celles où les atomes C2' ou C3' sont décalés par rapport au plan défini par l'oxygène et les carbones C1' et C4'. On appelle ces deux conformations C2'-endo lorsque c'est le carbone C2' du sucre qui est au-dessus de l'oxygène du cycle et C3'-endo lorsque c'est le carbone C3' qui est au-dessus. On parle aussi de plissement du sucre (en anglais, sugar pucker) pour désigner ces deux conformations.

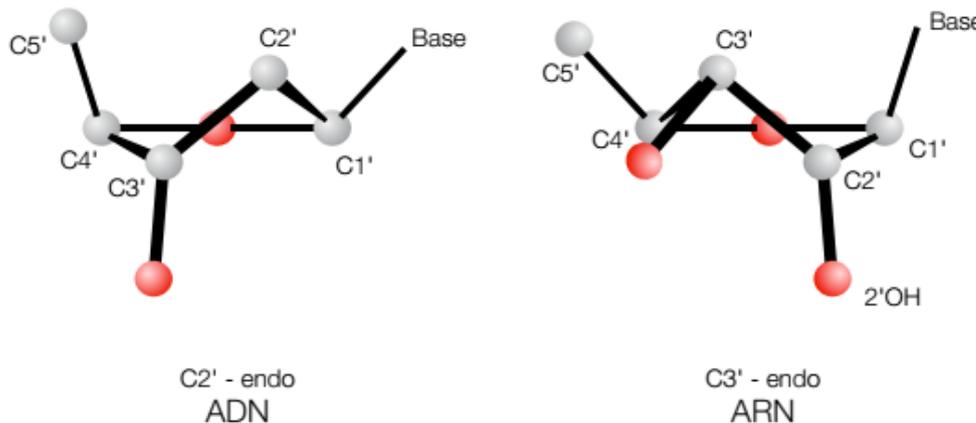


Figure : Deux conformations favorables du cycle furanose : C2'-endo et C3'-endo

Dans l'ARN, la présence du groupement 2'-OH sur le ribose influence l'équilibre entre ces deux conformations, en raison de l'encombrement stérique qu'il impose sur la géométrie des brins, en particulier dans le contexte de la formation d'un duplexe apparié.

Dans l'ADN en double-hélice classique, il existe deux conformations, l'hélice de forme A et l'hélice de forme B, qui sont connues depuis les clichés de diffraction de fibres d'ADN étudiés par Rosalind Franklin et Maurice Wilkins et utilisés par Watson et Crick pour élaborer leur fameux modèle de la double hélice en 1953. La forme A et la forme B diffèrent entre

autres par le plissement du sucre, qui est en conformation C3'-endo dans l'ADN A et C2'endo dans l'ADN B, cette dernière étant la conformation largement majoritaire. L'ARN, à l'inverse, forme exclusivement

des hélices de type A, avec un plissement de sucre C3'-endo. Ceci est une conséquence de la présence du 2'-OH qui conduit à des conflits stériques empêchant la formation de l'hélice B.

Les hélices de forme A ont des propriétés géométriques assez différentes, ce qui a des conséquences importantes sur la nature des interactions que l'ARN peut avoir avec d'autres partenaires. En particulier, la forme des deux sillons est très différente : le petit sillon de l'hélice A est très peu marqué, et son grand sillon devient très pincé et profond (voir Figure). Cette étroitesse du grand sillon limite les interactions avec les protéines dont les chaînes latérales ne peuvent accéder facilement aux groupements fonctionnels présents sur les bases, à l'inverse de ce qui se passe dans l'ADN en forme B. Pour cette raison, les interactions ARN:protéine sont de nature différente des interactions ADN:protéine

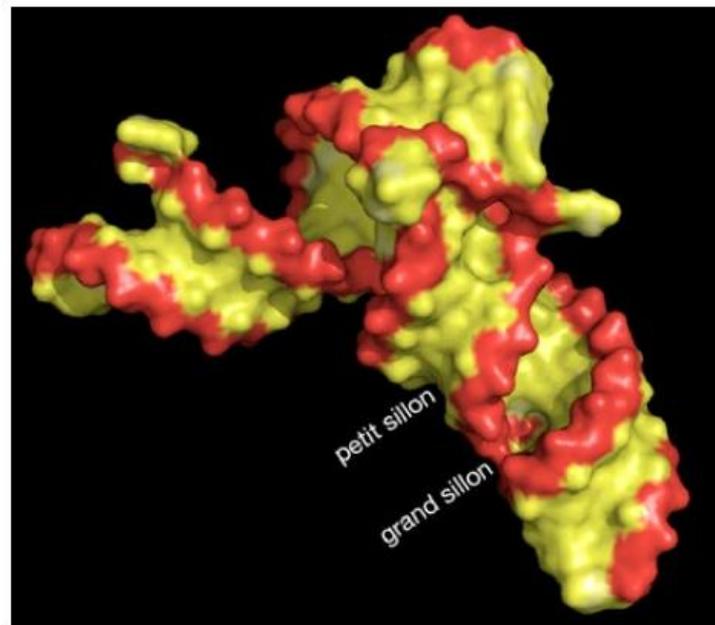


figure : Surface accessible d'un ARNt dont la structure est composée de deux hélices en forme A orthogonales. le petit sillon est très peu marqué et que le grand sillon est très profond et étroit..

Effet sur la stabilité chimique

La présence du 2'-hydroxyle a une autre conséquence importante sur l'ARN, elle modifie profondément sa réactivité chimique. Le 2'-OH rend la molécule d'ARN intrinsèquement plus labile que la molécule d'ADN. En conditions alcalines, par exemple, l'ARN s'autolyse par un processus de catalyse interne par le 2'-OH qui forme un phosphate cyclique : une base arrache

le proton du 2'-OH qui réagit alors avec le phosphate. Celui-ci se cyclise sur les positions 2' et 3', ce qui provoque la coupure du squelette phosphodiester

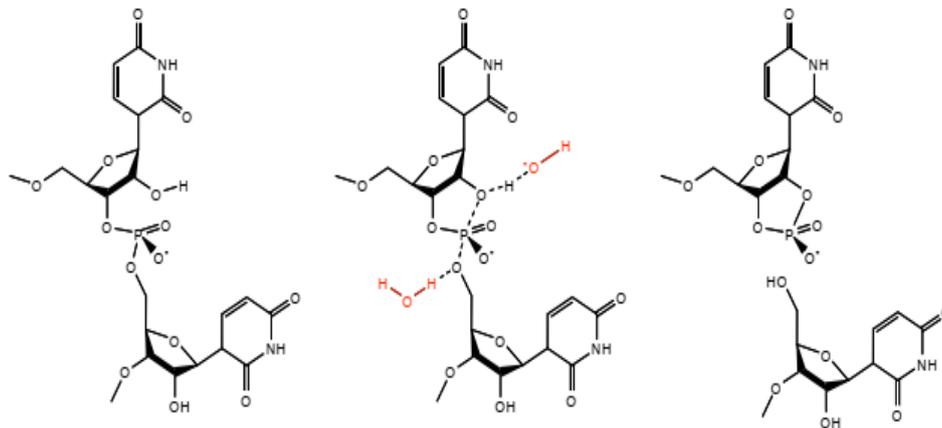


Figure: Autolyse de l'ARN en conditions alcalines. Une base arrache le proton du 2'-OH, ce qui provoque une cyclisation du phosphate. L'ARN est coupé, libérant une extrémité 5'-OH et une extrémité 2',3' phosphate cyclique

Ce mécanisme est spontané et peut être exploité et accéléré par certaines ribonucléases, des enzymes qui clivent l'ARN. Ceci fait de l'ARN une molécule chimiquement plus fragile que l'ADN. Il est donc plus adapté à des fonctions transitoires, comme celle d'ARN messager, qui nécessitent un recyclage de la molécule après usage.

Différences entre ARN et ADN

- ▶ L'ARN est court (de quelques dizaines à quelques milliers de nucléotides). L'ADN est long (de quelques millions à quelques milliards de nucléotides).
- ▶ L'ARN est labile. Certains ARN messagers ont des durées de vie qui ne dépassent pas quelques minutes. Ils sont synthétisés, traduits et aussitôt dégradés. Certains ARN structurés sont beaucoup plus stables, sans que leur durée de vie atteigne celle de l'ADN qui est pérenne. L'ADN doit en effet perdurer pendant toute la vie de la cellule et être transmis à sa descendance, quitte à être réparé.
- ▶ Les ARN cellulaires sont simple-brin (les génomes de certains virus peuvent être toutefois constitués d'ARN double-brin). L'ADN est toujours sous forme de double brin apparié.

Structure secondaire

Appariements

La nature monocaténaire (simple-brin) de l'ARN ne signifie pas qu'il ne forme pas d'appariements, ça lui permet au contraire de se replier sur lui-même en formant des appariements intramoléculaires. Les bases de l'ARN peuvent former des appariements

Watson-Crick classiques, G-C et A-U (l'uracile remplaçant la thymine, mais conservant les mêmes propriétés d'appariement). De plus, l'ARN tolère un type d'appariement additionnel, la paire G-U, aussi appelé appariement bancal ou wobble. Les paires A-U et G-C sont superposables, la position des riboses étant identique. Ces appariements sont dits isostères. C'est cette propriété d'isostéricité qui permet à la double hélice d'être constituée d'une séquence quelconque de paires de bases, puisque la nature des appariements n'influe pas sur la structure du squelette. La paire bancale, en revanche, impose une légère distorsion du squelette ribose-phosphate, le ribose du U du G-U n'étant pas superposable à celui du C d'une paire G-C canonique

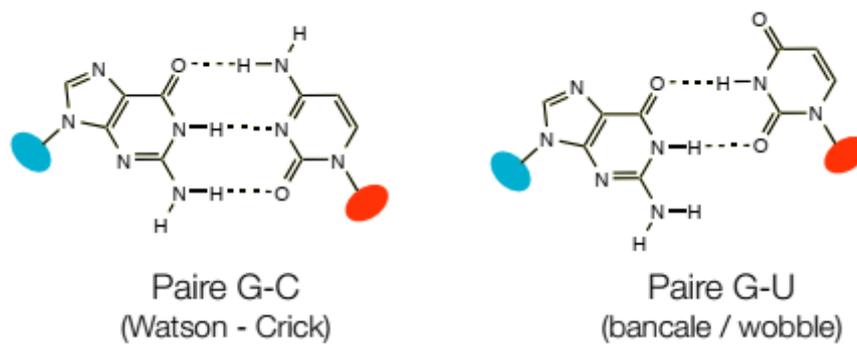
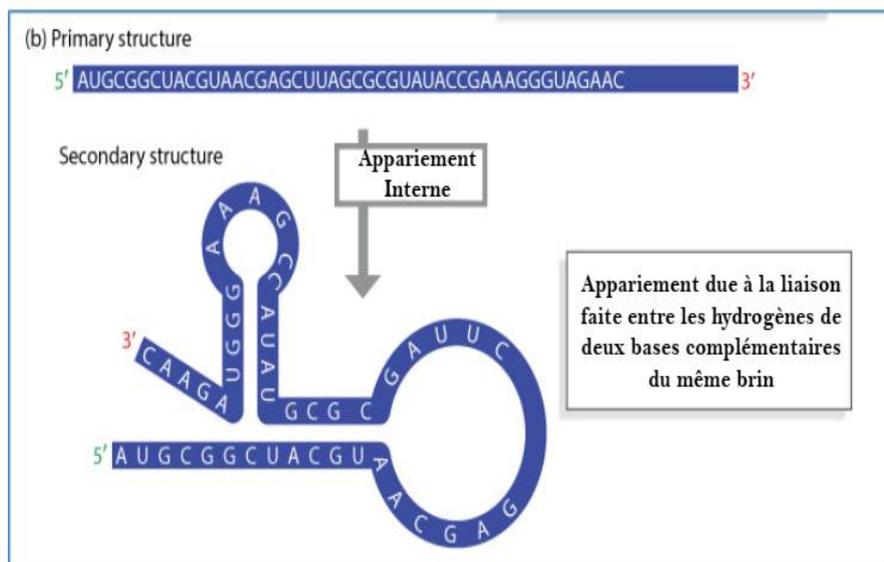


Figure: Paire G-C canonique et paire bancale G-U.



Pour pouvoir former des appariements intramoléculaires, un ARN simple-brin doit nécessairement se replier sur lui-même. Il peut former des régions en duplexe apparié à chaque fois qu'il existe une séquence répétée inversée (inverted repeat). Il s'agit de deux segments de l'ARN qui sont complémentaires l'un de l'autre et qui sont séparés d'un certain nombre de nucléotides. Ce type de séquence d'ARN peut former une structure en tige et boucle (en

anglais, hairpin) où les deux régions complémentaires s'apparient pour former la tige et la région entre les deux, la boucle.

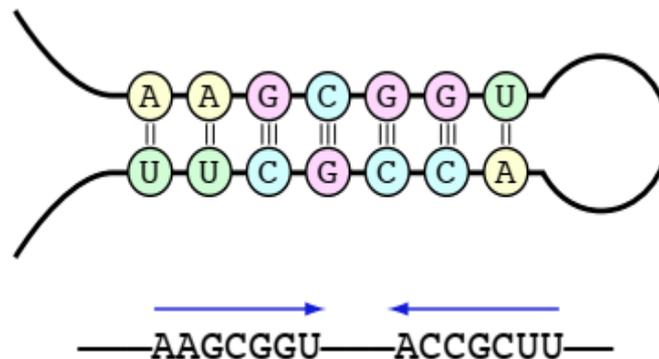


Figure: Séquence répétée inversée et structure en tige et boucle. La séquence figurée en bas comprend deux segments qui sont complémentaires (flèches). L'ARN peut alors se replier pour former une tige appariée encadrant une boucle non-appariée..

Fonctions de l'ARN dans la cellule

Les ARN sont une classe de molécules extrêmement importantes dans la cellule. Ce sont des composés très abondants, dans une bactérie comme *Escherichia coli*, par exemple, ils représentent environ 25 % du poids sec de la cellule, à comparer à seulement 2 % du poids sec pour l'ADN (le reste est essentiellement composé de protéines, de lipides et du peptidoglycane de la paroi). Ce sont surtout des molécules qui jouent des rôles extrêmement divers dont certains n'ont été découverts que très récemment.

Rôles génétiques

Comme l'ADN, l'ARN joue un rôle bien connu de support de l'information génétique. Les ARN messagers sont des copies de l'information contenue dans l'ADN, correspondant à un gène ou parfois quelques-uns. Ils ne portent donc qu'une information réduite par rapport à l'ensemble du génome et leur durée de vie est limitée, les ARN messagers étant dégradés après usage. Cette information portée par les ARN possède toutefois un rôle opérationnel très important puisque les ARN messagers sont les copies «actives» des gènes, celles qui vont servir à la machinerie cellulaire pour fabriquer les protéines. On verra plus loin que ce caractère limité et «périssable» des ARN messagers est en fait essentiel à l'expression de l'information contenue dans le génome.

Un autre rôle génétique plus pérenne est supporté par l'ARN. Chez de nombreux virus, en effet, le génome est exclusivement constitué d'ARN. Lorsqu'ils se répliquent, certains passent

par un intermédiaire constitué d'ADN, c'est le cas des rétrovirus comme le VIH, le virus du SIDA, mais d'autres restent exclusivement à l'état d'ARN. C'est le cas des virus de la grippe, de la poliomyélite, de la dengue, de l'hépatite C...

Rôles enzymatiques

La fonction très importante des ARN messagers dans la cellule est trompeuse car elle donne souvent l'impression que ceux-ci constituent l'essentiel des ARN cellulaires. Il n'en est rien. En terme de masse totale, les ARN majoritaires dans la cellule sont des ARN stables, non-codants. Parmi ceux-ci, on trouve principalement :

- ▶ Les ARN ribosomiques, constituants majoritaires du ribosome.
- ▶ Les ARN de transfert qui participent à la traduction au niveau du ribosome.
- ▶ Les petits ARN nucléaires (ARNsn), constituants de la machinerie d'épissage des ARN messagers.

Ces ARN ont une structure tridimensionnelle stable, bien définie. Ils sont parfois associés à des protéines au sein d'un complexe ribonucléoprotéique. On sait maintenant que certains d'entre eux sont doués de capacités de fixation spécifique de ligands et/ou de propriétés catalytiques. Ce sont des enzymes constituées d'ARN, que l'on appelle donc des ribozymes. Dans le ribosome, par exemple, on sait maintenant que c'est l'ARN ribosomique qui catalyse la formation de la liaison peptidique, non les protéines qui ne jouent vraisemblablement qu'un rôle de stabilisation structurale.

ARN guides

Il existe enfin une dernière classe de fonction pour les ARN, celle de guide pour des enzymes ciblant d'autres acides nucléiques, ARN ou ADN. Ces ARN guides sont associés au sein de complexes ribonucléoprotéiques, ils peuvent s'apparier par une région de leur séquence avec un ADN ou un ARN de séquence complémentaire.

Cette interaction ARN:ARN ou ARN:ADN permet ensuite à l'enzyme associée d'agir sur un site précis, ciblé par la séquence de l'ARN guide.

Parmi les ARN guides, on trouve entre autres :

- ▶ Les petits ARN nucléolaires (snoRNA) qui interviennent dans la maturation du ribosome. Ils servent à guider l'introduction de bases modifiées dans l'ARN ribosomique.
- ▶ Les micro-ARN qui interviennent de le processus d'interférence par ARN où ils permettent d'éteindre sélectivement l'expression de certains ARN messagers.
- ▶ L'ARN de la télomérase qui sert de guide pour la synthèse de l'ADN télomérique

Classification des ARN

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

1- ARN ribosomiaux (ARNr) (80% de l'ARN)**➤ Structure**

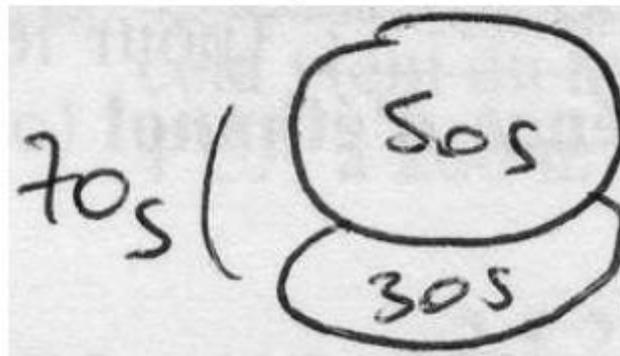
Les ARNr sont localisés au niveau des ribosomes : en effet, ces derniers sont en fait des particules à base de 35% de protéines et 65% d'ARN. On peut les isoler facilement à partir de broyats cellulaires par ultracentrifugation. On les désigne pour cette raison par leur constante de sédimentation, exprimée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

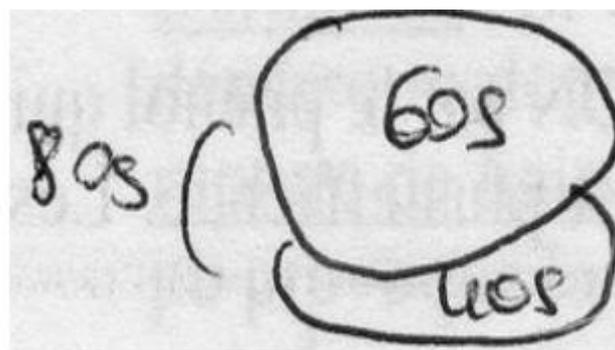
30S : 1 ARN; 21 protéines

**Chez les Eucaryotes:**

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

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

les ribosomes interviennent dans la synthèse des protéines (appelée aussi "traduction"), à partir des ARNm.

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

➤ Structure

Les ARNm sont monocaténaire 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

Localisation des ARNm

Ces copies d'ADN sont réalisées dans le noyau, puis exportées dans le cytoplasme, où elles sont ensuite traduites en protéines grâce aux ribosomes.

➤ Fonction des ARNm

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

3- 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).

Localisation et fonction des ARNt

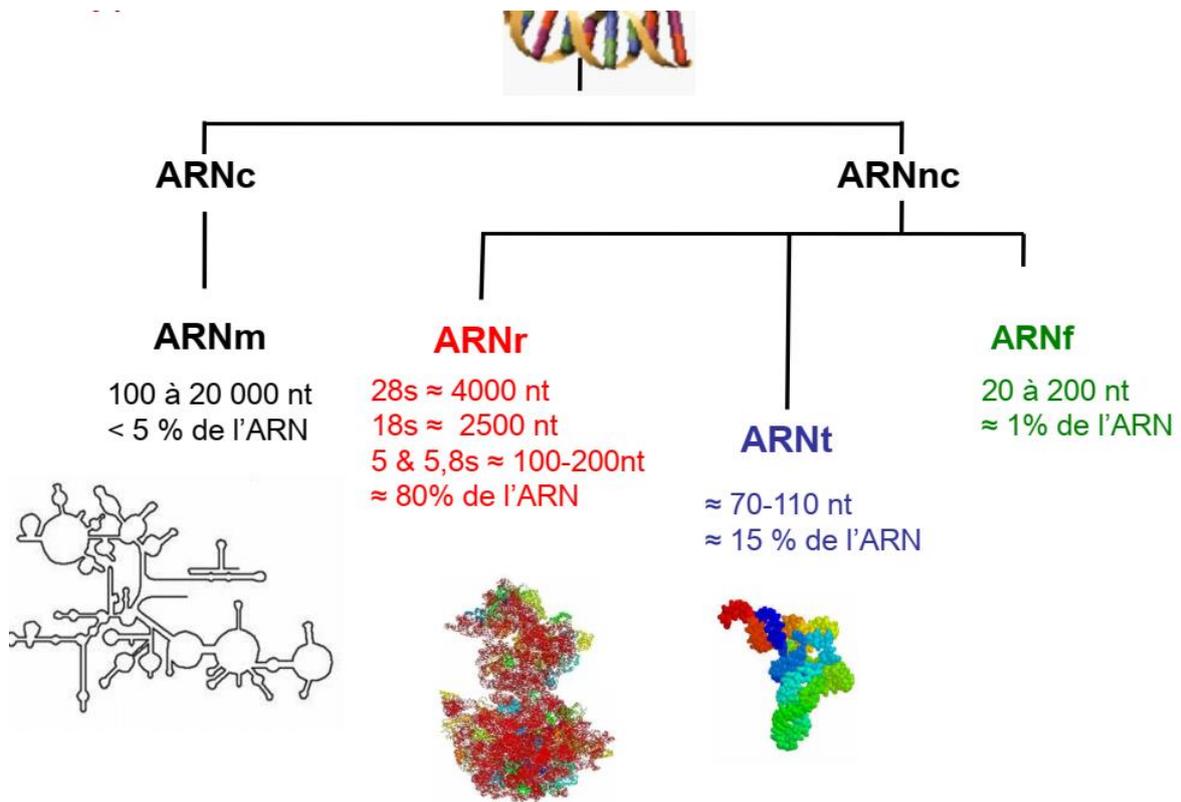
Les ARNt sont synthétisés, à partir de l'ADN, dans le noyau des cellules Eucaryotes. Ils passent ensuite dans le cytoplasme, où ils jouent un rôle fondamental dans la traduction. En effet, ils apportent les acides aminés aux ribosomes pour construire les protéines. Ils sont qualifiés **d'adaptateurs**.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

4- 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.

On peut aussi classifier les ARNs selon le caractère codant ou non, ainsi on distingue des ARN codant et des ARN non codant



ARN codant: ARN messenger (ARNm)

ARN non codant:

- **ARN ribosomique (ARNr)**

-> Chez les procaryotes on trouve les 16S – 5S – 23

-> Chez les eucaryotes on trouve les 18S – 5,8S – 28S – 5S

- **ARN de transfert (ARNt)**

- **Small ARN**

-> Small nuclear ARN

-> Micro ARN

- **Propriétés de l'ARN**

Malgré une structure analogue à celle de l'ADN, les propriétés de l'ARN dans la cellule sont très différentes. Ceci est lié d'une part à des différences intrinsèques dans la structure et la réactivité chimique de ces deux molécules et d'autre part à des différences dans la manière dont l'ARN et l'ADN sont produits et utilisés. Alors que l'ADN est toujours sous forme de duplex, l'ARN existe le plus souvent sous forme de simple-brin, ce qui a un impact important sur sa structure. L'absence de brin complémentaire pour l'ARN va permettre à ce dernier d'adopter des repliements complexes bien plus diversifiés que la double hélice de l'ADN. Ces repliements sont à la base de capacités fonctionnelles variées : régulations, interactions, propriétés catalytiques. La plupart des ARN, y compris les ARN messagers, vont ainsi se replier suivant une ou plusieurs conformations.

en plus :

* 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** contrairement à l'ADN

- Hybrides ADN/ARN
- Présence de bases modifiées : dihydrouracile, pseudouridine
- Sensibilité aux nucléases : Rnase A, H
- Durée de vie variable des ARNm

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, 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 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.

ARN codant: ARN messenger (ARNm)

ARN non codant:

- **ARN ribosomique (ARNr)**

-> Chez les procaryotes on trouve les 16S – 5S – 23

-> Chez les eucaryotes on trouve les 18S – 5,8S – 28S – 5S

- **ARN de transfert (ARNt)**

- **Small ARN**

-> Small nuclear ARN

-> Micro ARN