

# LES ACIDES NUCLÉIQUES

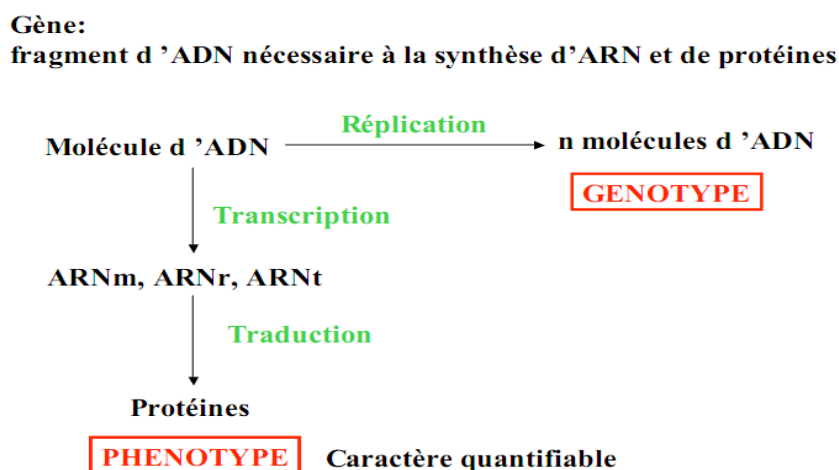
## INTRODUCTION

Les acides nucléiques sont des acteurs majeurs de différents processus cellulaires et principalement de la transmission et du décodage de l'information génétique. Au delà des mécanismes centraux et universels que sont la réplication de l'ADN, la transcription de l'ARN et la traduction du message génétique en protéine, les acides nucléiques sont impliqués dans des mécanismes complexes et extrêmement divers, en particulier au niveau des régulations cellulaires, dont certains n'ont été découverts que relativement récemment.

Comme dans la plupart des processus biologiques, la fonction est souvent dictée par la structure des macromolécules impliquées, c'est pourquoi, chaque fois que c'est possible, l'étude des relations entre la structure et la fonction des molécules sera abordée, ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués.

Ici, on essaiera de détailler et de mettre l'accent sur la composition et structure de la double hélice de l'ADN

**Comment le matériel génétique se transmet de façon exacte d'une génération à une autre ?**



## Historique

Au XXe siècle, suite à l'élaboration des lois de la génétique, de la découverte des chromosomes et de l'identification de l'ADN comme support de l'information génétique, est apparue la biologie moléculaire.

La biologie moléculaire est une discipline Scientifique dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire.

**Biologie Moléculaire ?**

Etude des gènes portant l'information génétique, leurs transformations et leurs fonctions.

Le terme « biologie moléculaire » désigne également par extension l'ensemble des techniques de Manipulations d'acides nucléiques (ADN, ARN), appelées aussi techniques de génie génétique.

**Que faut-il étudier ?**

Les complexes macromoléculaires de l'ADN, de l'ARN et des protéines.

Transfert de l'information : Réplication, transcription et traduction

**Quelles sont les conséquences du développement de la biologie moléculaire ?**

Des connaissances dans le domaine fondamental

**Des applications pratiques :**

Production de protéines d'intérêt médical

Vaccins

Diagnostic en médecine

Plantes et animaux transgéniques.....

- En réalité, 50% du poids sec de la plupart des cellules est constitué de protéines, qui sont des polymères (chaînes) d'acides aminés.

Chaque protéine est caractérisée par sa séquence d'acides aminés.

Chaque cellule fabrique les protéines dont elle a besoin, et pour fabriquer une protéine, il faut deux choses :

- Des acides aminés.
- La « recette » : quels acides aminés faut ils assembler et dans quel ordre ?

**L'ADN, matériel génétique (Protéine de l'information génétique)**

Le travail de Griffith 1928 sur le transfert de la virulence de la bactérie pathogène *Streptococcus pneumoniae*, contribuera à démontrer que l'ADN était bien le matériel génétique. Griffith découvrit que s'il injecte des bactéries virulentes préalablement tuées par la chaleur à des souris, celles-ci n'étaient pas infectées et les animaux ne contenaient aucun pneumocoque. Par contre, s'il injectait un mélange de bactéries virulentes tuées par la chaleur et de bactéries vivantes appartenant à une souche non virulente, les souris mouraient. De plus des bactéries virulentes pouvaient être isolées de ces souris mortes. Griffith a conclu les bactéries de type S tuées par la chaleur étaient capable de convertir les bactéries vivantes non virulentes de type R en bactéries virulents de types S et il a donné le nom de **transformation** à ce changement de bactéries non virulente en bactéries virulentes pathogène.

Il suggérera que le **principe transformant** devait être une partie de la capsule ou une composée nécessaire à sa synthèse.

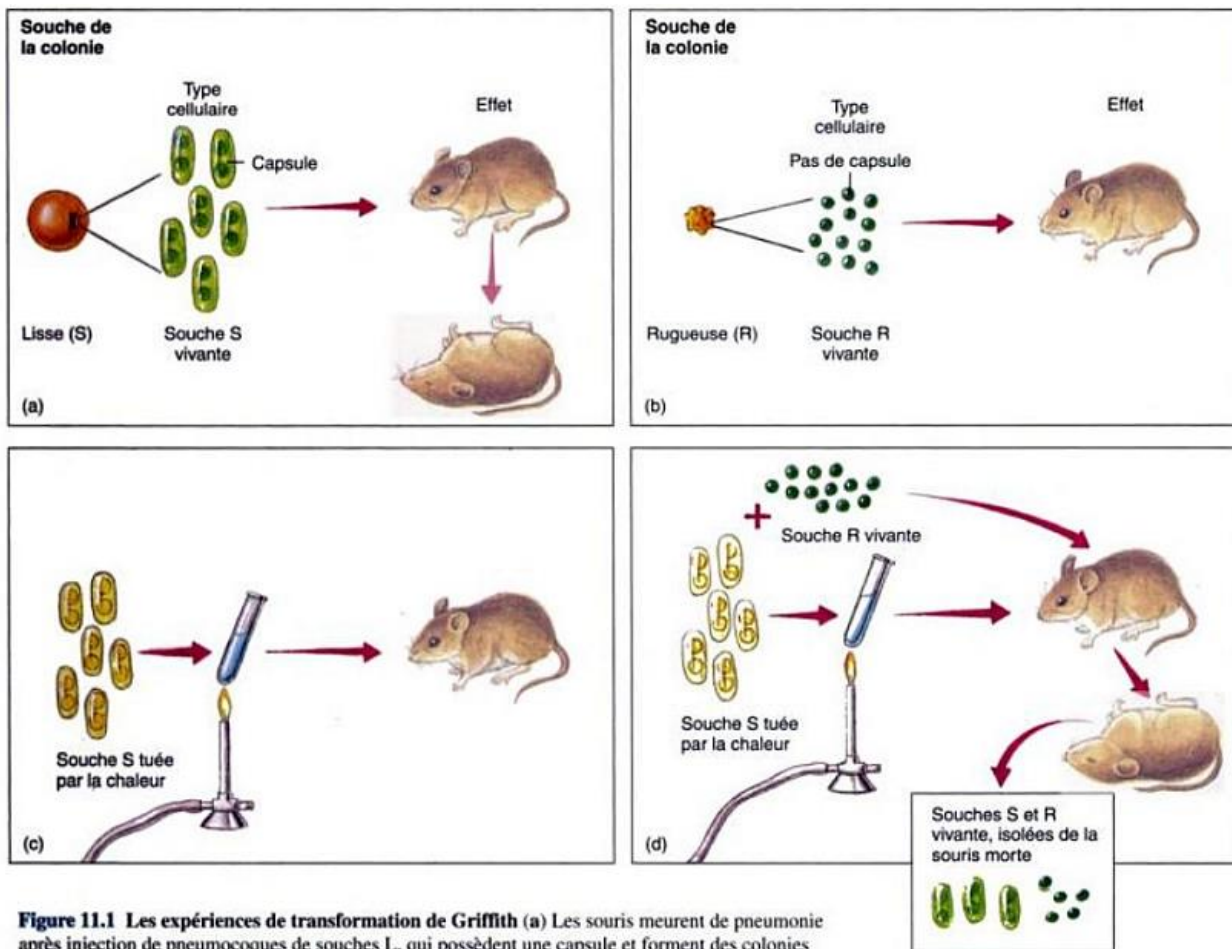


Figure 11.1 Les expériences de transformation de Griffith (a) Les souris meurent de pneumonie après injection de pneumocoques de souches L, qui possèdent une capsule et forment des colonies

### La transformation; les expériences d' Avery, Macleod et McCarty

La question importante, est bien sur, était de savoir quelle molécule constituait le principe transformant. En 1944, après 10 ans de recherche, Avery et ces collègues ont publié leurs résultats qui sont maintenant considérés comme un grand classique de la génétique moléculaire. Ils ont réussi à purifier le principe transformant et ils ont montré, sans le moindre doute que la molécule responsable de transformation était l'ADN.

Dans un premier temps, Avery et ces collègues préparèrent des extraits de pneumocoques virulents et détruisirent sélectivement l'ADN, l'ARN ou les protéines de l'extrait à l'aide d'enzymes appropriées. Ils exposèrent ensuite des pneumocoques non virulents aux extrait traités.

La transformation des bactéries non virulentes n'avait plus lieu lorsque l'ADN avait été hydrolysé, ce qui suggérait que l'ADN portait l'information requise pour la transformation.

La publication des travaux d Avery en 1944, apporta pour la première fois la preuve que le principe transformant découvert par Griffith était bien l'ADN et que c'était cette molécule qui portait l'information génétique.

Quelques années plus tard d'autres travaux ont confirmé que l'ADN est forcément la molécule porteuse de l'information génétique.

Cellules R + polysaccharides purifiés de cellules L	→	Colonies R
Cellules R + protéines de cellules L	→	Colonies R
Cellules R + ARN purifié de cellules L	→	Colonies R
Cellules R + ADN purifié de cellules L	→	Colonies L
Extrait de cellules L + protéase + cellules R	→	Colonies L
Extrait de cellules L + RNase + cellules R	→	Colonies L
Extrait de cellules L + DNase + cellules R	→	Colonies R

**Figure 11.2** Expériences sur le principe transformant. Résumé des expériences de Avery, MacLeod et McCarty sur le principe transformant. Seul l'ADN est capable de changer les cellules R en cellules L et cet effet est perdu lorsque l'extrait est préalablement traité à la déoxyribonucléase. L'ADN est donc porteur de l'information génétique requise pour la transformation ou conversion du caractère R en L.

## ADN des différents êtres vivants

Dans tous les organismes :

- Support de l'information génétique (sauf certains virus où le support c'est l'ARN)
- Structure en double hélice (sauf certains virus)

**Différences :**

- **Nombre de molécules d'ADN** : 1 pour *E. Coli* et 46 pour l'Homme
- **Longueur** : quelques milliers de nucléotides à plusieurs millions
- **Forme** : linéaire ou circulaire
- **Localisation dans la cellule** : séparé ou non du cytoplasme par une membrane
- **Séquence en bases**

**Virus** : génomes les plus petits (quelques milliers de nucléotides) à ADN ou à ARN

**Procaryotes:**

ADN dans le cytoplasme

Un seul chromosome circulaire (plusieurs millions de nucléotides)

Présence de plasmides petits morceaux d'ADN circulaires, indépendants de l'ADN principal

**Eucaryotes**

ADN dans le noyau

Plusieurs chromosomes avec ADN fortement compacté et linéaire

Plusieurs milliards de nucléotides

ADN associé à des protéines

I. **STRUCTURE E ET PROPRIÉTÉS DE L'ADN**

1. **Structure élémentaire**

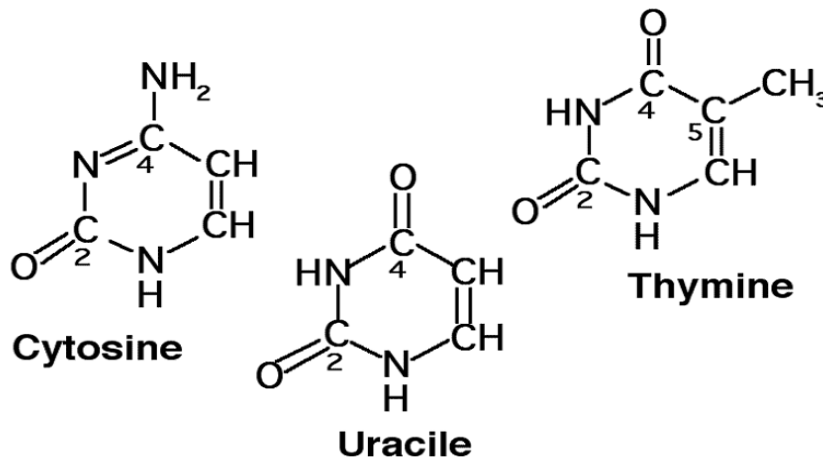
Polymère linéaire de **désoxyribonucléotides** reliés par des liaisons **phosphodiesters**.

**Nucléotide** = base + pentose + groupe phosphate

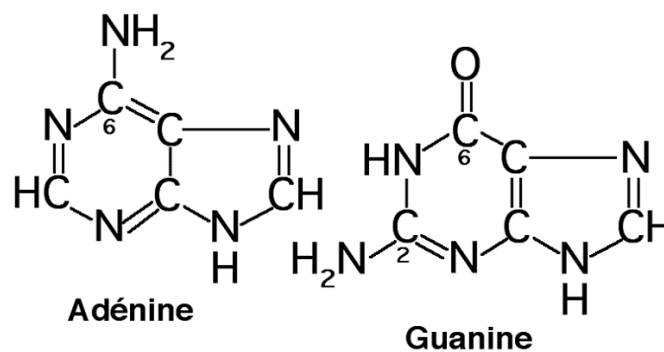
1.1. **Bases**

Les bases azotées des acides nucléiques appartiennent à deux classes de molécules selon le noyau aromatique qui en constitue le squelette:

1.1.1. **Le noyau pyrimidine** est le plus simple : c'est un noyau aromatique à six atomes, 4 carbones et deux azotes, ils sont au nombre de 3 : **la cytosine, l'uracile et la thymine**.



1.1.2. **Le noyau purine** est constitué de **deux noyaux** accolés, un de 6 atomes et l'autre de 5 atomes ayant deux carbones en commun au milieu. Ils sont au nombre de 2 : **l'adénine et la guanine**.



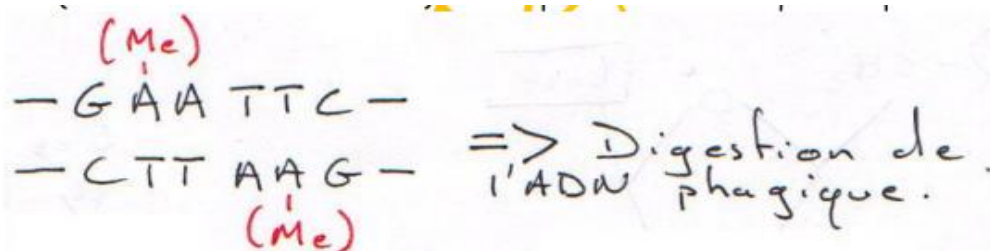
1.1. 3. **Les modifications des bases.**

Sur l'ADN et sur l'ARN, on trouve des bases modifiées après la synthèse ou après la réplication.

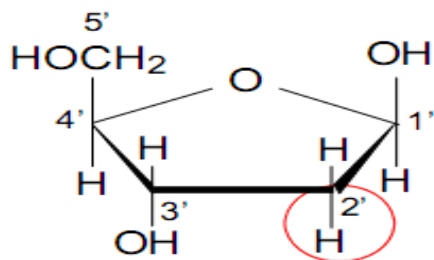
**Exemple de modifications par méthylation**

On trouve beaucoup de cytosine modifiée (méthylée) chez les eucaryotes. Ces modifications n'affectent pourtant pas leur appariement.

Les bactéries ont un moyen de se protéger des virus : elles synthétisent des enzymes qui digèrent l'ADN (DNases de restriction) en coupant sur une séquence particulière.

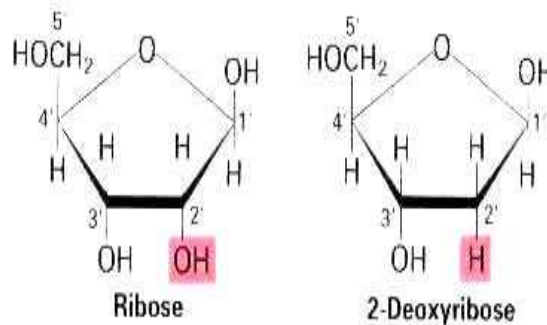


1.2. Glucide



pentose : désoxyribose

Le **désoxyribose**, composant des acides désoxyribonucléiques (DNA) est dérivé du ribose par une réduction de la fonction alcool secondaire du carbone n°2.



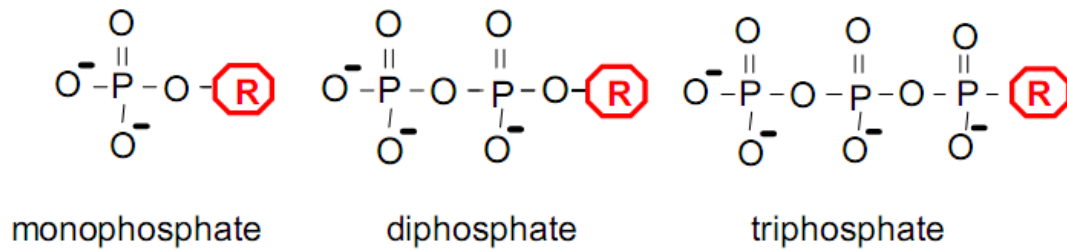
1.3. Groupe phosphate

Le phosphate inorganique est un ion stable formé à partir de l'acide phosphorique PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub>. On l'écrit souvent Pi.

Des esters de phosphate peuvent se former entre un phosphate et un groupement hydroxyle Libre.

Les phosphates permettent la solubilisation de l'ADN dans l'eau grâce à leurs charges négatives.

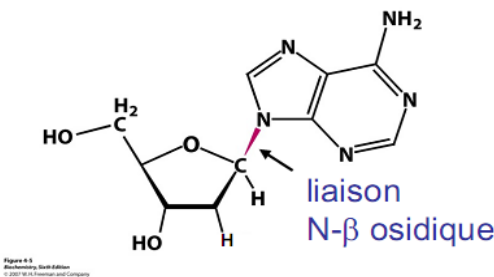
Les phosphates permettent la polymérisation des acides nucléiques (des nucléotides).



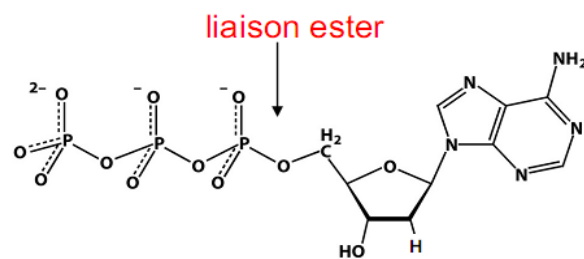
**1.4. Nucléosides, nucléotides, désoynucléotides**

**Nucléosides= base +sucre**

Les sucres se lient aux bases azotées par des liaisons impliquant un des azotes de la base (azote **n°1** des pyrimidines ou azote **n°9** des purines) et le **carbone n°1** de l'ose. Ce sont des liaisons **N-osidiques**. la liaison d'une base azotée avec un des sucres donne un nucléoside.

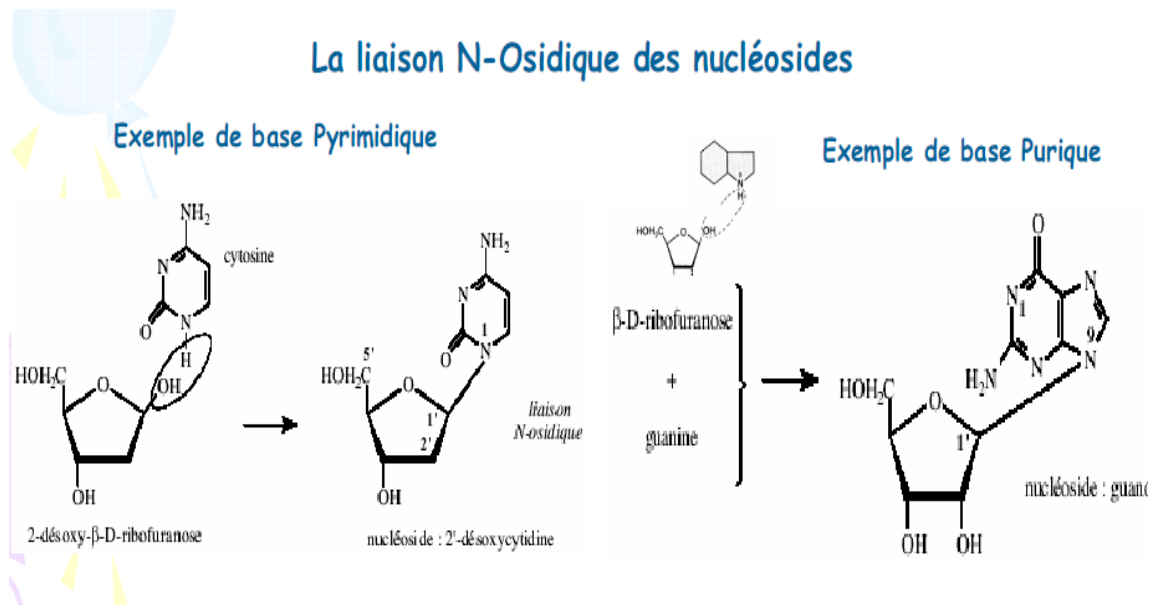


d-nucléoside = base + pentose  
= d-adénosine



d-nucléotide = base + pentose + groupe Pi  
= d-adénosine triphosphate

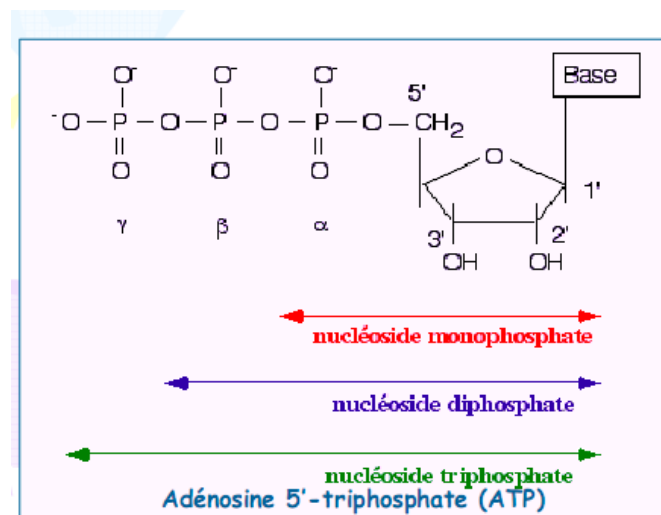
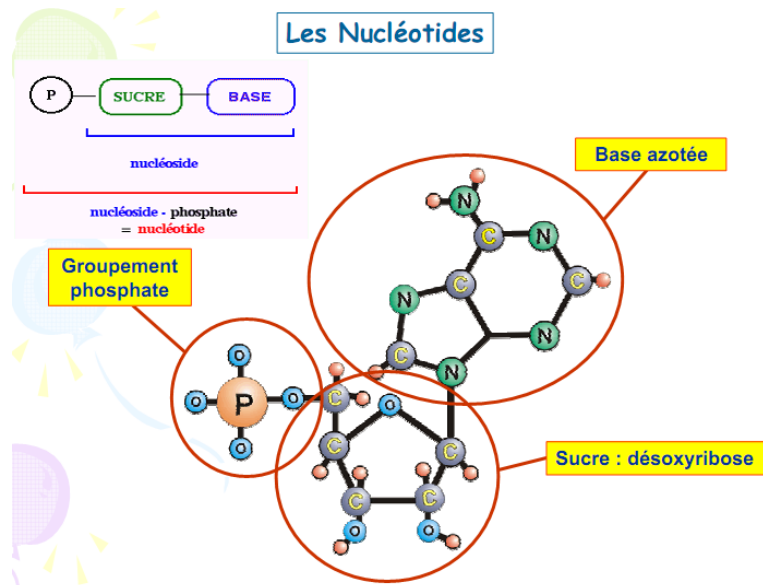
**La liaison N-Osidique des nucléosides**



La liaison d'un **nucléoside avec un phosphate** se fait par une **estérification** de la fonction alcool primaire (**carbone n°5'**) du sucre et **une des trois fonctions acides** du phosphate.

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

Chaque nucléoside peut être lié à un, deux ou trois phosphates. On les désigne par des sigles conventionnels : GMP pour guanosine monophosphate, CDP pour cytidine diphosphate, ATP pour adénosine triphosphat.



Base	nucléoside	nucléotide (mono, di ou tri phosphate)	
adénine	d-adénosine	d-AMP / ADP / ATP	(A)
guanine	d-guanosine	d-GMP / GDP / GTP	(G)
thymine	d-thymidine	d-TMP / TDP / TTP	(T)
cytosine	d-cytidine	d-CMP / CDP / CTP	(C)



**Nomenclature**

**1er cas : nucléotides à base pyrimidique**

Nucléoside : radical + "idine"

Nucléotide : radical + "idylique"

**Cytosine(C):**

**Nucléoside:** cytidine/Désoxycytidine

**Nucléotide:** acide cytidylique/ Acide désoxycytidylique

**2ème cas : nucléotides à base purique**

Nucléoside : radical + « osine"

Nucléotide : radical + " ylique"

**Adénine(A):**

**Nucléoside:** adénosine/Désoxyadénosine

**Nucléotide:** acide adénylique/ Acide désoxyadénylique

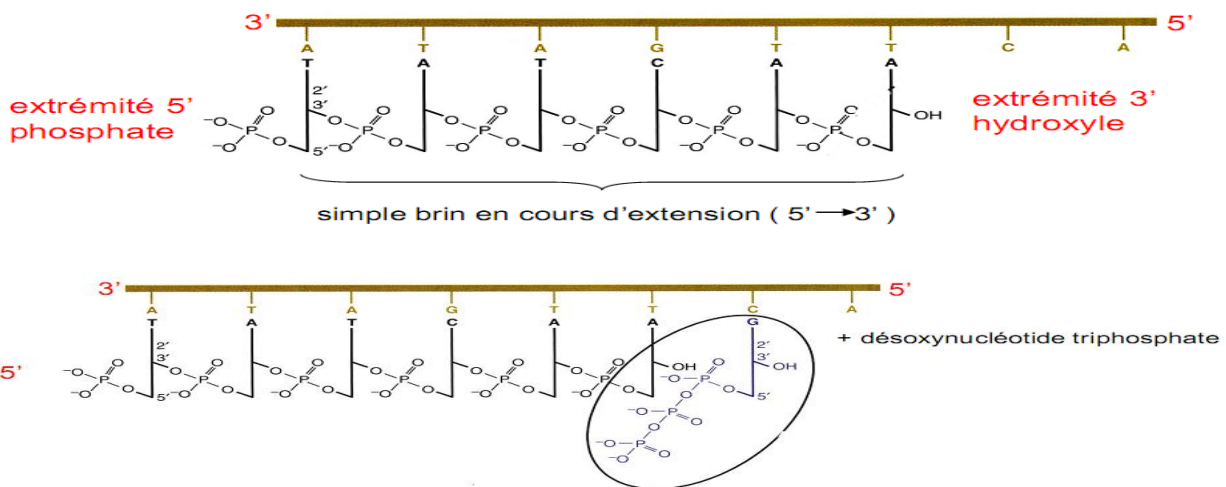
**Les noms des nucléosides ont comme suffixe :**

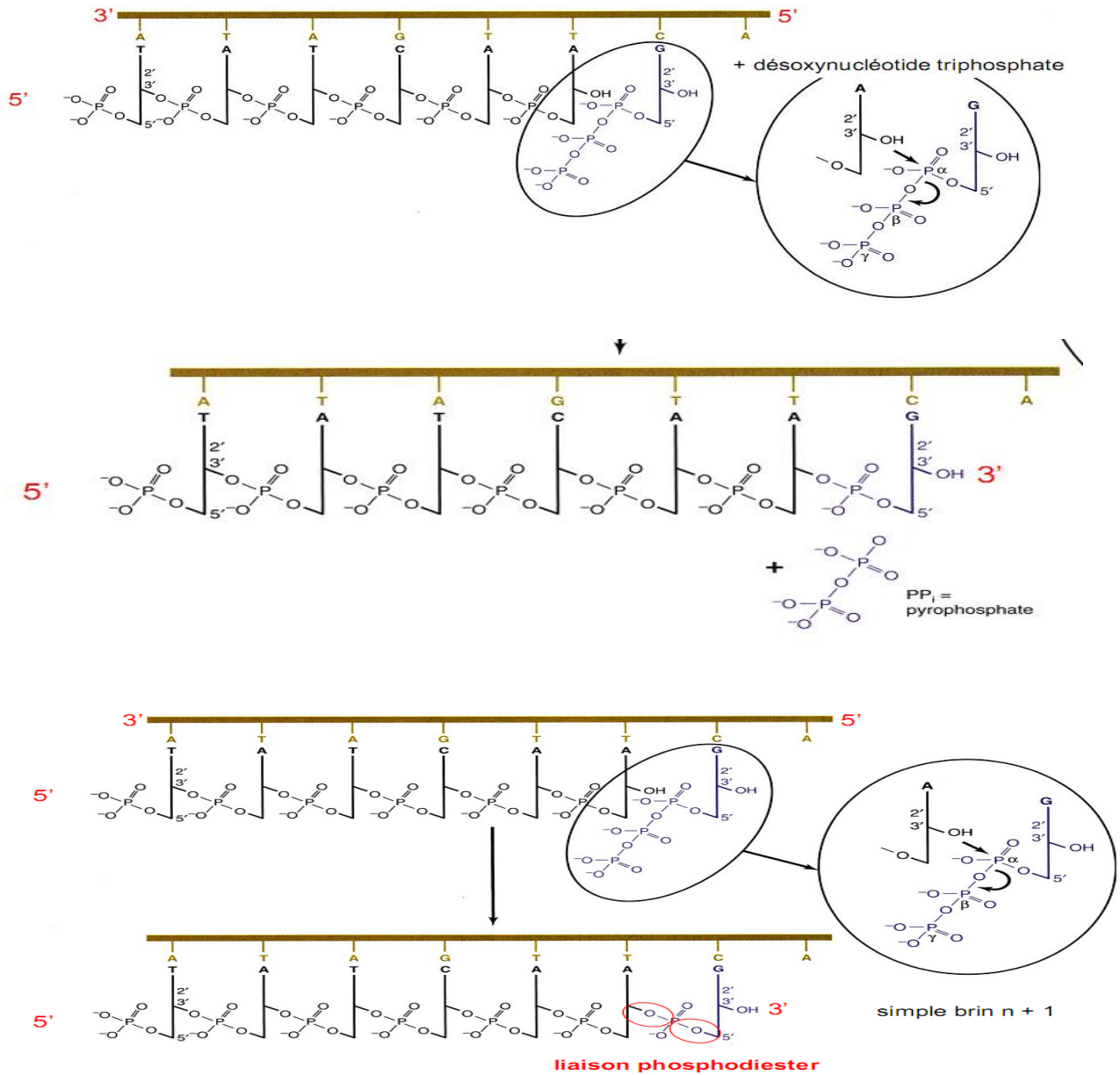
- "osine" pour les nucléosides puriques
- "idine" pour les nucléosides pyrimidiques

**1. 5. Chaîne polynucléotidique et liaison phosphodiester**

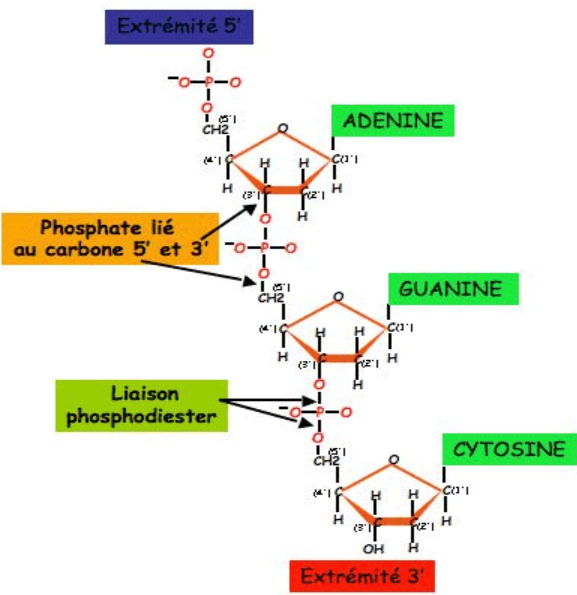
Pour former un acide nucléique, les nucléotides, sont condensés les uns sur les autres avec des **liaisons phosphodiester** entre le **carbone 3'** d'un premier nucléotide et le **carbone 5'** du nucléotide suivant. De sorte que ces liaisons définissent un sens à la molécule :

le début étant le nucléotide dont le phosphate en 5' ne serait lié à aucun autre nucléotide et la fin correspond au nucléotide dont la fonction alcool en 3' n'est pas estérifiée.





**LIAISONS ENTRE NUCLÉOTIDES**



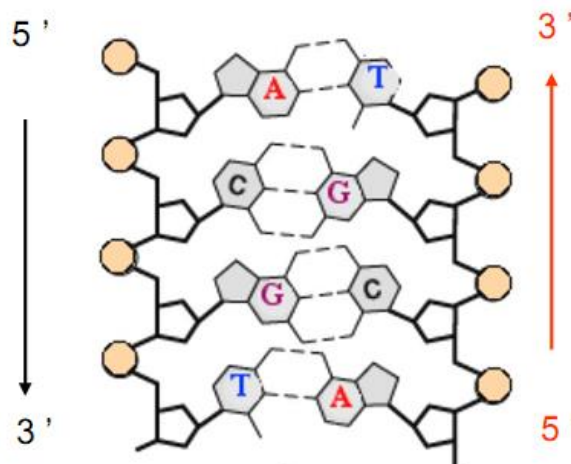
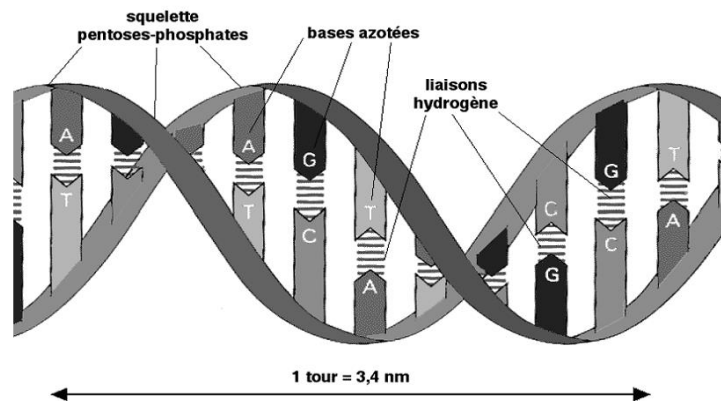
**2. L'ADN est une double hélice formée de 2 brins**

Les acides désoxyribonucléiques sont de très grandes molécules généralement composées de deux chaîne polynucléotidiques enroulées l'une autour de l'autre pour former une double hélice d'un diamètre de 2 nm.

Chaque chaîne est constituée de désoxyribonucléosides puriques et pyrimidiques reliés par des liaisons phosphodiesters, cela signifie que deux désoxyriboses adjacents sont connectés par une molécule de l'acide phosphorique estérifiée entre le groupe hydroxyle 3' d'un sucre et le groupe hydroxyle 5' de l'autre.

Les bases puriques et pyrimidiques sont attachées au carbone en position 1' des désoxyriboses. Elles s'étendent vers l'intérieur du cylindre formé par les deux chaînes et sont empilées au centre les unes au-dessus des autres. Une paire de bases tous les 0,34 nm.

La double hélice a un « pas » de 3,4 nm c'est à dire qu'il y a environ 10 paires de nucléotides pour chaque tour d'hélice



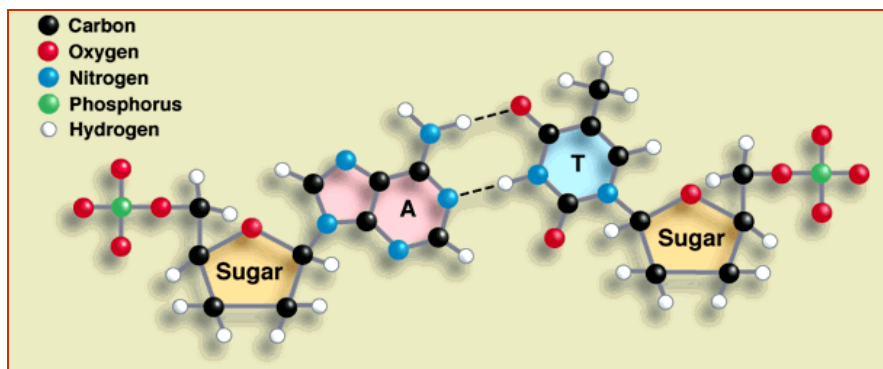
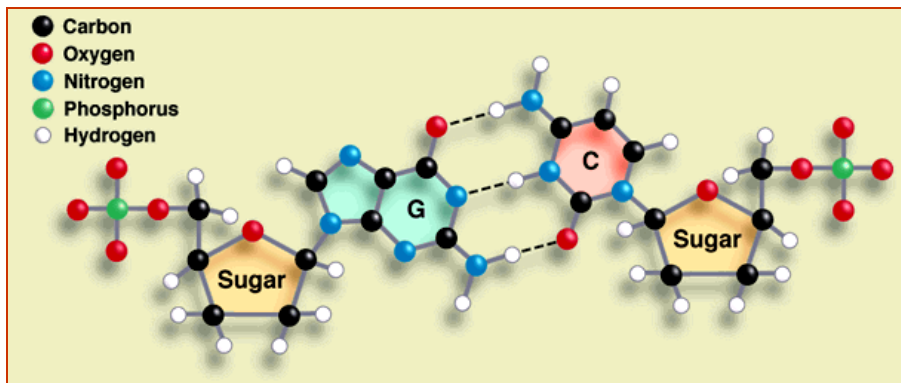
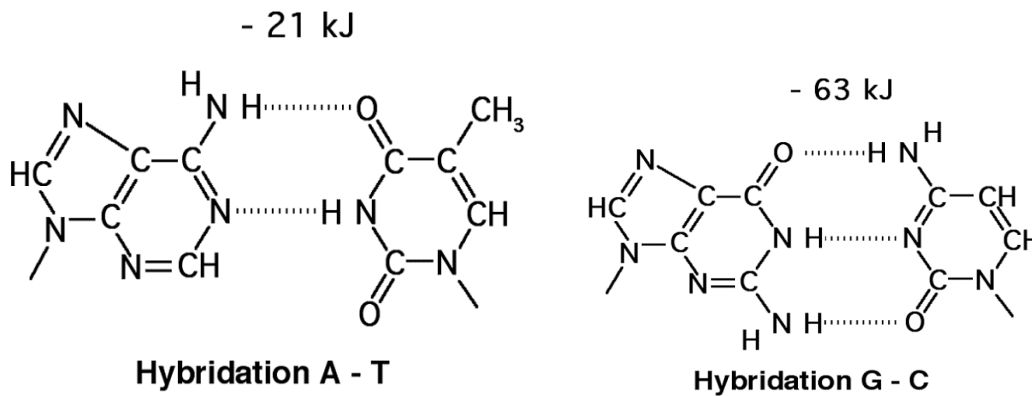
Selon la figure ci-dessus, on constate que;

□ **Polarité 5' -3'** : séquence = 5'ACGT3'

- **2 brins antiparallèles** : (l'un est constitué d'un enchaînement commençant à gauche et se poursuivant vers la droite, l'autre commençant à droite et se poursuivant vers la gauche.
- Les bases sont complémentaires et forment des paires (pb) : A / T et G / C.
- Les bases sont associées par des liaisons hydrogènes.
- L'hélice est stabilisée liaisons hydrophobes, Van der Waals, cations...
- $A+T / G+C =$  constante d'espèce.

**2.1. Liaisons hydrogènes**

Lorsqu'un acide nucléique est en solution, les molécules forment des liaisons hydrogènes associant les nucléotides deux par deux, de sorte qu'un nucléotide à adénine se lie avec un nucléotide à thymine et un nucléotide à guanine avec un nucléotide à cytosine.



Les bases azotées liées par les liaisons hydrogènes sont tournées vers l'intérieur, tandis que les riboses et les acides phosphoriques, hydrophiles sont tournés vers l'extérieur.

La stabilité de la structure en double hélice de l'ADN est maintenue :

- par des liaisons hydrogènes (2 liaisons entre l'adénine et la thymine ; 3 liaisons entre la cytosine et la guanosine)
- par les interactions (hydrophobes) entre les bases puriques et pyrimidiques,
- par les forces de Van der Waals et par certains cations (Ca<sup>2+</sup>...).

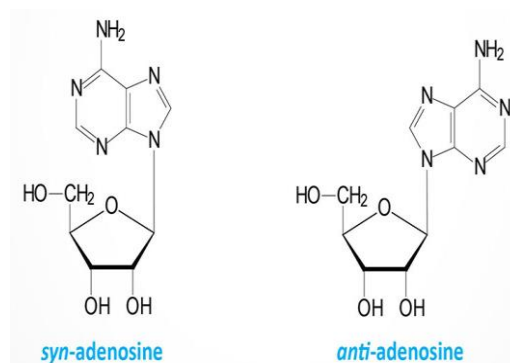
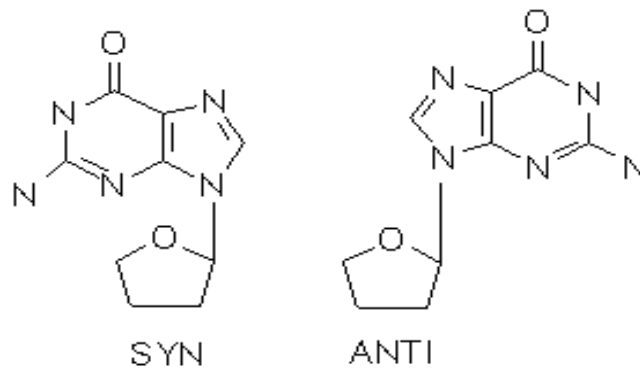
### 3. Conformation de l'ADN

**3.1.** Les constituants de la molécule d'ADN possèdent une structure spatiale.

Il existe deux conformations (Syn et Anti) pour la liaison C-N reliant la base au désoxyribose :

La position des bases par rapport au désoxyribose peut être soit du même côté de la molécule (**position "SYN"**), soit éloignée (**position "ANTI"**). Ces variations spatiales peuvent générer différentes conformations de l'ADN : le B-ADN, plus exceptionnellement le Z-ADN...

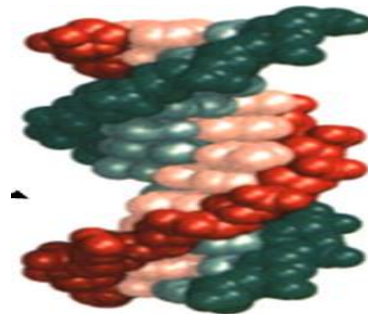
la conformation "**ANTI**" garantissant un encombrement stérique moindre, retrouvée dans l'ADN B, qui est la forme de l'ADN la plus courante.



### 3.2. ADN B, ADN A et ADN Z

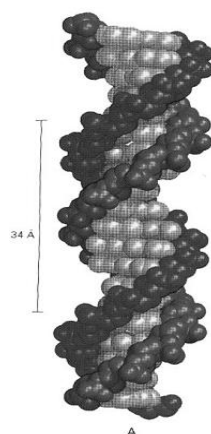
**ADN B** : possède les caractéristiques suivantes :

- Double hélice à pas droit
- Bases à l'intérieur
- bases puriques et pyrimidiques : conformation "ANTI", les bases sont éloignées des désoxyriboses
- Petit et grand sillon
- $\approx 10$  bases / tour d'hélice
- Pas de l'hélice = 3,4 nm
- Diamètre de l'hélice  $\approx 2$  nm

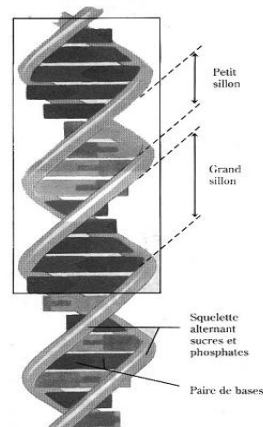


➤ **B**

*Petit sillon - Grand sillon*



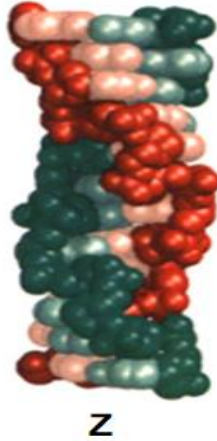
➤ **A**



**ADN Z** : possède les caractéristiques suivantes:

- ✓ Hélice à pas gauche,
- ✓ Pas de sillons,
- ✓  $\approx 12$  bases/ tour
- ✓ Diamètre  $\approx 1,8$  nm
- ✓ moins torsadé que le B-ADN
- ✓ pas de l'hélice supérieur = 4,6 nm

- ✓ présent dans les zones d'ADN où il existe une alternance de CGCG dans lesquelles G est en position "SYN" et C est en position "ANTI" et méthylé
- ✓ L'ADN a un aspect de zigzag.
- ✓



**ADN A** : possède les caractéristiques suivantes:

Lorsque la teneur en eau d'une solution contenant une molécule d'ADN est diminuée, par exemple lors de la cristallisation, la molécule change de conformation et adopte une conformation notée A. Ce changement est réversible.

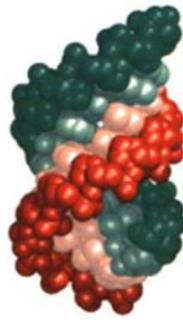
Apparaît si hygrométrie < 75%

La conformation A a les spécificités suivantes :

- hélice droite (idem conformation B)
- hélice plus compacte
- pas de 2,8 nm
- (11 pb par tour)
- distance entre les plans de bases successives de 0,26 nm

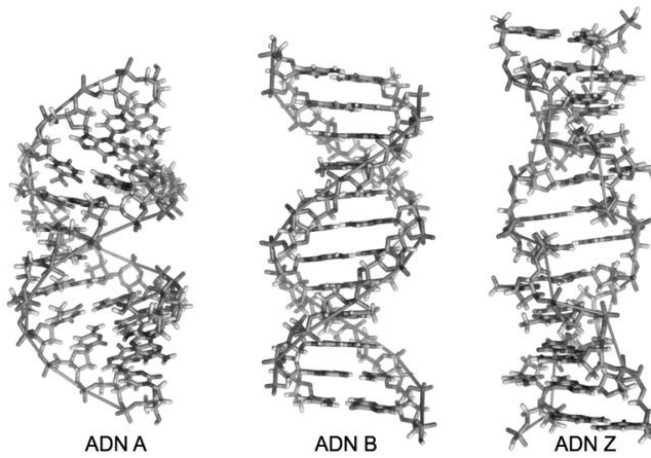
Cette conformation est trouvée in vivo dans :

- l'ADN de certaines spores bactériennes, formées en réponse à la dessiccation du milieu
- les hybrides ADN-ARN qui se forment transitoirement à l'amorce de la réplication, et pendant la transcription



A

**ADN A & Z : autres formes de l'ADN**

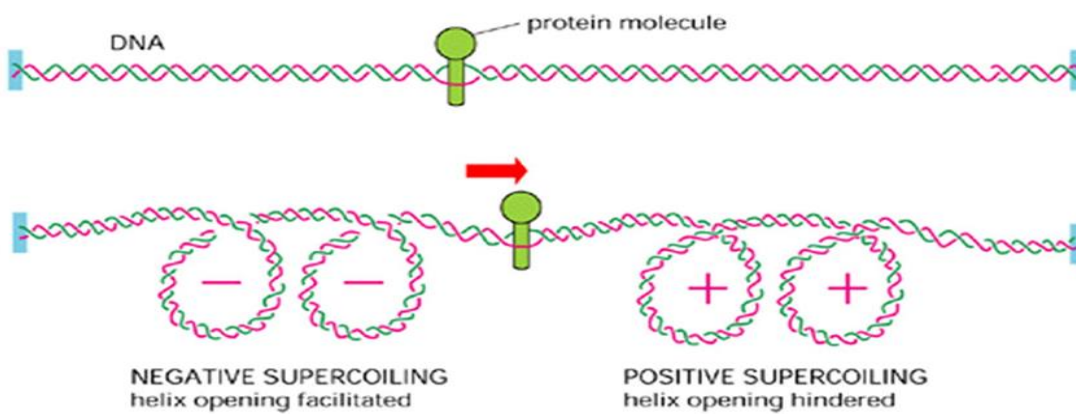
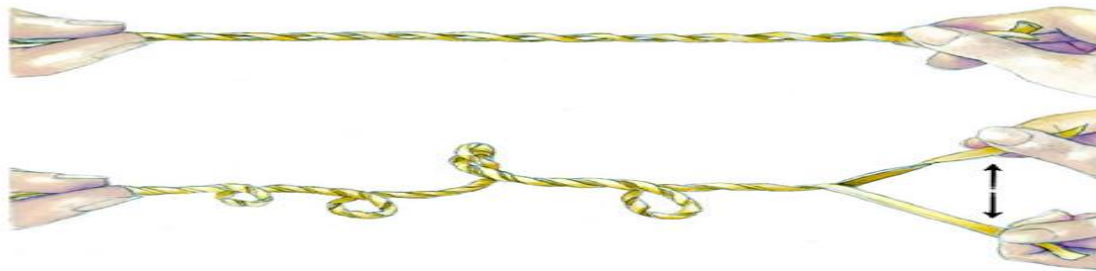


Il existe 3 formes de la double hélice

Forme A	Forme B	Forme Z
Pas droit 11 pb/tour Hétéroduplex ARN/ADN	Pas droit 10,4 pb/tour	Pas gauche 12 pb/tour
	Formes physiologiques	

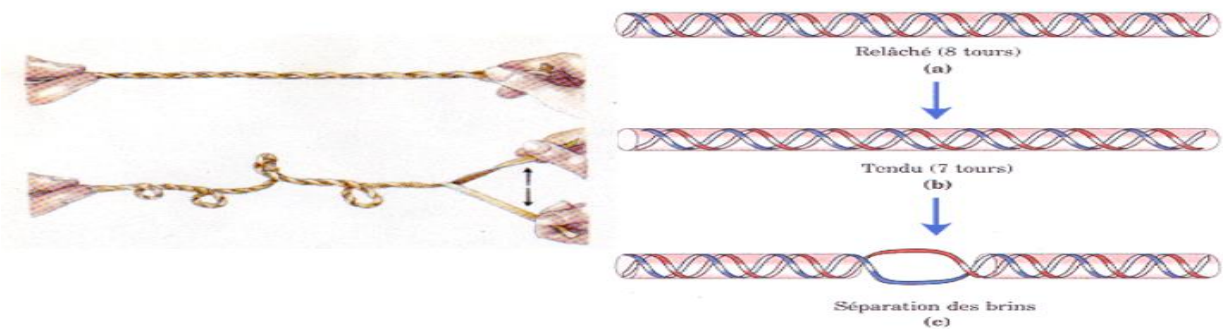


**3.3. ADN linéaire et ADN circulaire**



**Exemple :** l'avancement de la fourche de réplication génère devant-elle des supers tours positifs qui bloquent ensuite l'ouverture de l'hélice.

**L'ADN doit être déroulé pour permettre la séparation des brins et initier la réplication et la transcription.**



### 3.4. topoisomères et topoisomérases

#### 1. Topoisomères

Des **topoisomères** ou **isomères topologiques** sont des formes distinctes de molécules de structures chimiques identiques mais qui diffèrent par leur forme topologique. Ce terme est principalement utilisé dans le cas de l'ADN.

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.

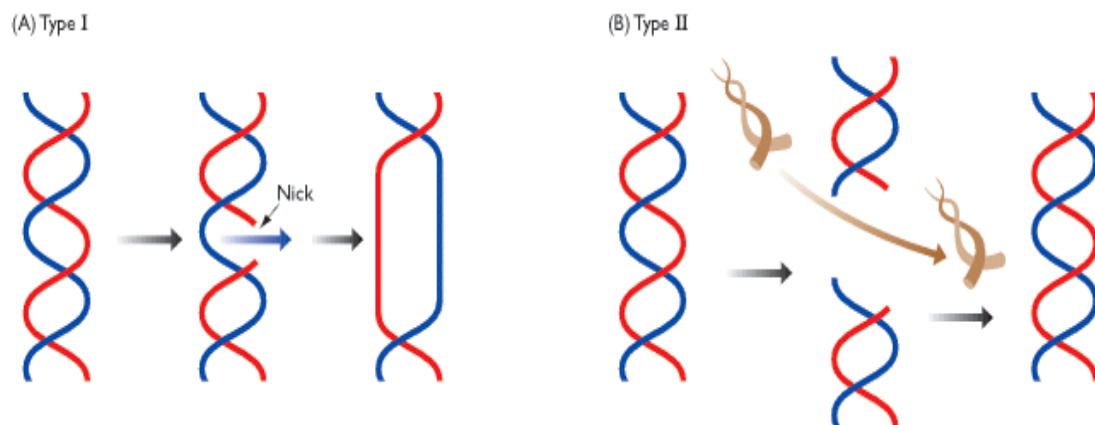
#### Les différentes topoisomérases

Pour manipuler la topologie de l'ADN, toutes les cellules vivantes disposent d'enzymes appelées les topoisomérases. Ces enzymes servent à « défaire les nœuds » et à relâcher les contraintes dans l'ADN.

Il en existe deux classes d'enzymes distinctes effectuent chacune une tâche.

**Les topoisomérases I** : relâchent la torsion de l'ADN. Elles coupent pour cela un seul des deux brins du duplexe et permettent sa rotation autour de l'autre brin, avant de suturer à nouveau le brin coupé pour restaurer l'ADN intact.

**Les topoisomérases II** : permettent le décroisement de duplexes. Elles coupent pour cela les deux brins du premier duplexe pour permettre le passage de l'autre à travers la coupure



Les topo-isomérases sont des cibles pour molécules thérapeutiques à propriétés anti-tumorales (étoposide) ou antibiotiques (acide nalidixique, ciproflaxine)

## II. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ADN

### 1. Taille et masse :

❖ ADN

ADN d'une cellule

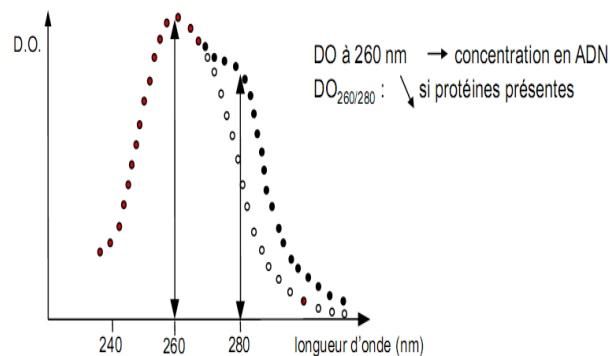
	taille	masse	longueur
adénovirus	≈ 35 10 <sup>3</sup> pb	≈ 10 <sup>7</sup> Da	≈ 1,1 10 <sup>-6</sup> m
E. coli	≈ 3,5 10 <sup>6</sup> pb	≈ 10 <sup>9</sup> Da	≈ 1,3 10 <sup>-3</sup> m
homme	≈ 2 x 3 10 <sup>9</sup> pb	≈ 10 <sup>12</sup> Da	≈ 2 m

1 kpb = 1000 pb, 1 Mpb = 1 000 000 pb...

**2. Charge électrique :** l'ADN et l'ARN sont chargés négativement en raison des groupes phosphates. Placés dans un champ électrique (électrophorèse), ces molécules migreront vers le pôle + (anode).

**3. Absorption :** les bases A, T, G, C, U ont une absorption maximale à ≈ 260 nm

Tous les nucléotides ont leur λ max autour de 260 nm, valeur qui n'est pas affectée par le composant glucidique et le phosphate



**4. Dénaturation -renaturation**

**4.1. Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN)**

Lorsque l'ADN double brin est **chauffé** à une **température** dite de **fusion** ou **Tm** (melting temperature), les deux brins se **séparent** suite à la **rupture** des liaisons hydrogènes qui les maintiennent appariés. La double hélice se défait, il y a perte de la structure secondaire.

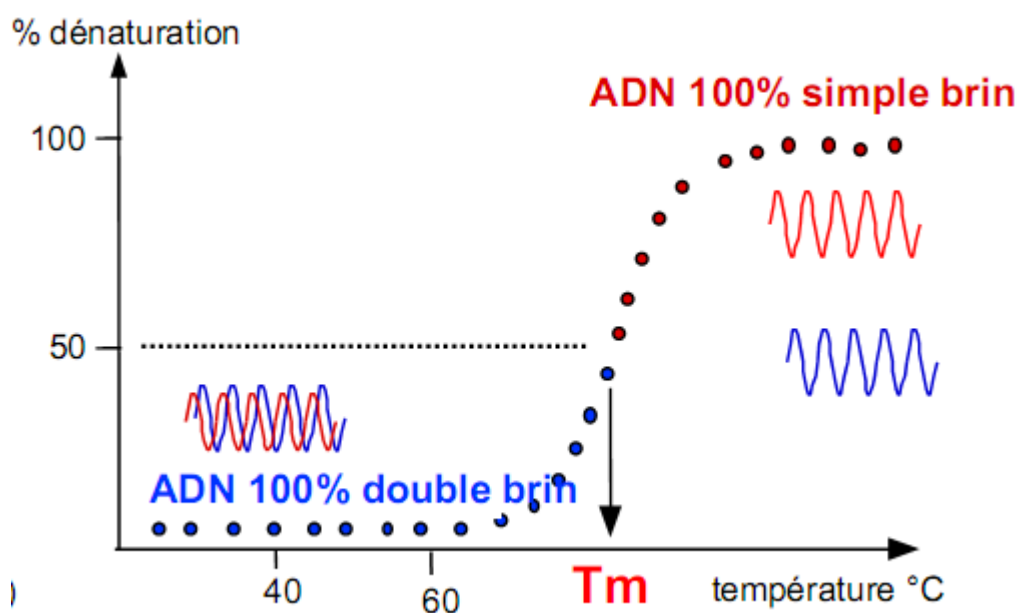
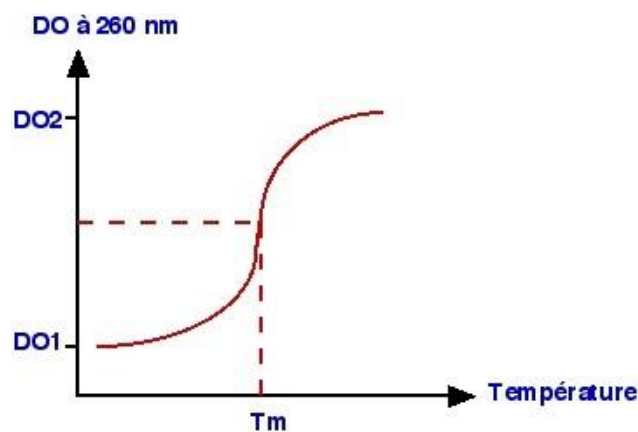
La **Tm** ou la température de demi dénaturation est la température à laquelle **50% de l'ADN** est **dénaturée** ou déroulée.

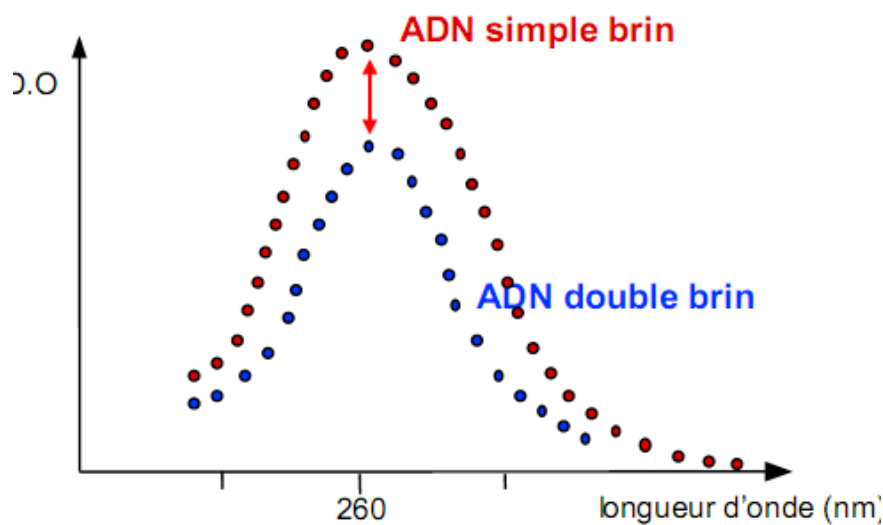
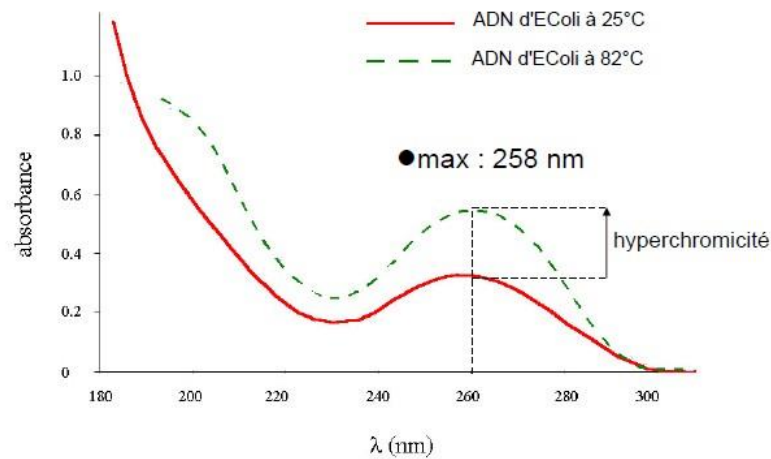
Il est possible de mesurer directement la température de fusion d'un ADN double brin en mesurant l'augmentation de l'absorbance de la solution à **260 nm** en fonction de la température (Le passage de la forme bicaténaire à la forme monocaténaire s'objective très facilement par simple mesure de la variation de densité optique à 260 nm, le coefficient d'extinction

de l'ADN monocaténaire étant sensiblement plus élevé que celui de l'ADN bicaténaire (**effet hyperchrome**).

(La séparation des brins augmente fortement leur capacité à absorber les UV autour de 260 nm, **les simples brins absorbent beaucoup plus les UV que les doubles brins**, ce phénomène résulte du fait que dans le DNA bicaténaire les bases sont parfaitement ordonnées dans des plans parallèles, par conséquent les bases se chevauchent partiellement, ce masquage induit le phénomène du **quenching**, à l'inverse, le DNA simple brin n'a pas de structure ordonnée, les bases se masquent moins, le **quenching** est **minimal**, donc l'**absorbance** est **maximal**). Le **point d'inflexion** correspond à ce qu'on appelle la température de fusion ( $T_m$ ).

**Remarque** ; On peut rompre les liaisons hydrogènes entre bases appariées d'une molécule d'ADN bicaténaire en chauffant la molécule (**Dénaturation thermique**) ou en manipulant les conditions de milieu : solutions **alcalines à pH 12,5** avec NaOH, solutions concentrées d'**urée** ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ) ou de **formamide** ( $\text{HCONH}_2$ ) (**Dénaturation chimique**).





**Facteurs influençant la température de fusion**

**1) Nombre de liaisons hydrogènes (H) :** Le nombre de liaisons H lui-même dépend de :

**A) La longueur du fragment :** Tm est d'autant plus grande que l'ADN est plus long

**B) La composition en bases :** l'augmentation de la proportion en GC augmente la Tm

**C) la présence de mésappariements :** Les mésappariements abaissent la Tm

**2) La composition du milieu**

**A) La force ionique :** Le NaCl masque les charges négatives des phosphates et ainsi diminue les forces de répulsion électrostatique entre les deux brins. Ainsi **moins il y a de sel**, plus les forces de répulsion sont importantes, **plus la Tm est bas**. (Quand la concentration en NaCl est **faible**, l'ADN est **moins** stable, il faudra **moins** chauffer pour provoquer la dissociation des deux brins).

**B) Le pH est aussi important :** **La Tm diminue quand le pH augmente**. A pH alcalin tous les groupements phosphates exposent une charge négative, les forces électrostatiques de répulsion augmentent, la structure bicaténaire est moins stable, les deux brins se séparent facilement à température ambiante, on utilise souvent le NaOH pour dénaturer l'ADN.

**4. 2. La renaturation ou l'hybridation**

La dénaturation thermique de l'ADN **peut être renversée** par le refroidissement de la solution, dans ce cas la **vitesse du refroidissement** influe sur le **résultat**. Ainsi, si la séparation des brins de l'ADN est suivie d'un refroidissement **progressif et lent**, il y aura **réassociation progressive** des deux brins complémentaires de l'ADN (Il s'agit de la propriété que présente une molécule d'ADN monobrin de s'associer spontanément et de façon spécifique et réversible à une autre molécule d'ADN monobrin si celle-ci lui est complémentaire) : c'est le phénomène de **l'hybridation**. Cette réassociation peut s'effectuer entre des séquences d'ADN et d'ARN ce qui permet d'obtenir des **hybrides ADN/ARN**.

Si par contre le refroidissement est **brutal et rapide** (en trempant dans de l'eau glacée p. ex.) les **simples brins se replieront sur eux-mêmes**, engendrant des structures stables partiellement bicaténares.

### Les facteurs affectant l'hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire dépend d'un grand nombre de facteurs :

#### 1) concentration du DNA et le temps, notion de Cot et de Rot

**Tout d'abord le temps** : Plus le temps de réaction **est long**, plus la **probabilité** d'appariements pour des séquences complémentaires **augmente**.

Secondairement, la **concentration** en acides nucléiques. Plus la concentration en acides nucléiques est **élevée**, plus la **probabilité** de rencontres entre des séquences complémentaires est **élevée**.

En d'autres termes, **plus la concentration de l'ADN dans la solution est élevée et plus le temps de réaction est long, plus la probabilité que les séquences complémentaires s'hybrident**.

En pratique on introduit le produit **temps x concentration** en acides nucléiques. Ce paramètre est appelé **Cot** pour les hybridations entre fragments **d'ADN** et **Rot** pour les hybridations **d'ARN et d'ADN**. On utilise souvent les valeurs de **Cot 1/2** et de **Rot 1/2** qui correspondent respectivement à 50% d'hybridation dans le cas d'hybridation moléculaire d'ADN ou d'ADN-ARN.

### 5. Dégradation de l'ADN (l'hydrolyse des acides nucléiques)

La dégradation d'un polynucléotide peut être chimique ou enzymatique

#### **L'hydrolyse chimique**

**Le traitement acide** affecte de la même façon les ADN et les ARN : la dégradation du squelette phosphodiester est obtenue dans des conditions drastiques (acide concentré et chauffage) auxquelles ne résistent pas les autres liaisons, cette dégradation conduit à la libération d'un mélange de phosphates, oses et bases.

#### **Les ARN et les ADN réagissent différemment à l'hydrolyse alcaline**

- les **ADN résistent aux pH basiques** : par exemple, à pH 13 et à 37°C on a une dizaine de coupures de ponts phosphodiester par million de ponts.

Les ARN sont totalement hydrolysés en leurs ribonucléotides en quelques minutes à 37°C et à pH 11.

**L'hydrolyse enzymatique** [Voir cour les enzymes utilisées en biologie moléculaire]

Les enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison phosphodiester des acides nucléiques, présents dans la plupart de toutes les cellules, sont des phosphodiesterases spécifiques appelées nucléases. Des endonucléases de très haute spécificité sont présentes dans les bactéries, ce sont des désoxyribonucléases désignées sous le nom d'enzyme de restriction.

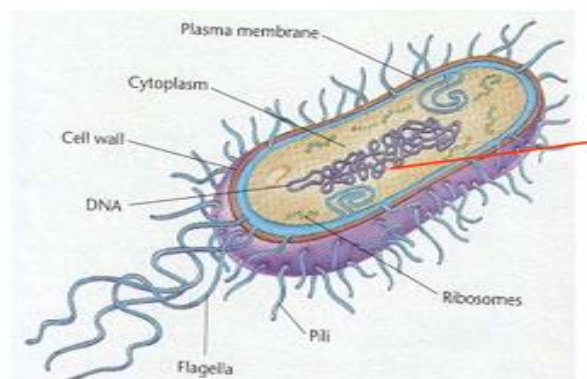
**III. CONDITIONNEMENT CELLULAIRE D'ACIDES NUCLÉIQUES****1. Organisation du matériel génétique des virus**

La molécule d'ADN ou d'ARN constituant le matériel génétique des virus peut être double ou simple brin, elle est généralement de petite taille. Ce matériel génétique est souvent associé à des protéines qui forment une capsidie par exemple.

**2. Organisation de l'ADN des bactéries**

- Le plus souvent 1 chromosome formé par une molécule d'ADN double brin généralement circulaire organisé en super hélices et associé à des protéines pour former le nucléoïde.

Éventuellement présence additionnelle de plasmides (ADN double brin circulaire de petite taille et présent en un nombre variable de copies).



**3. Organisation de l'ADN nucléaire des eucaryotes**

**3.1. Nucléosome**

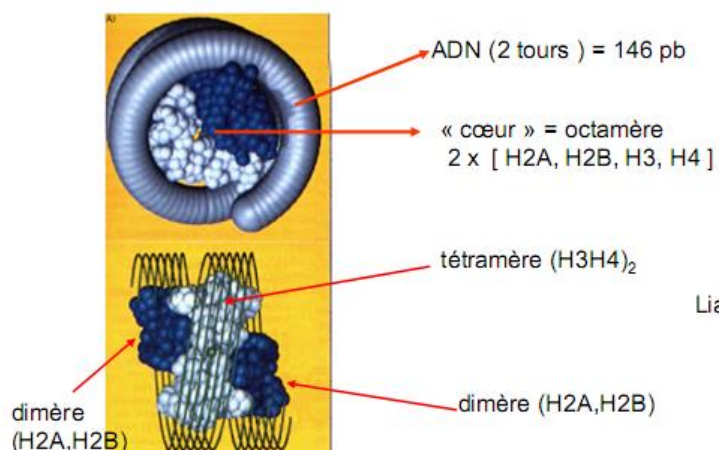
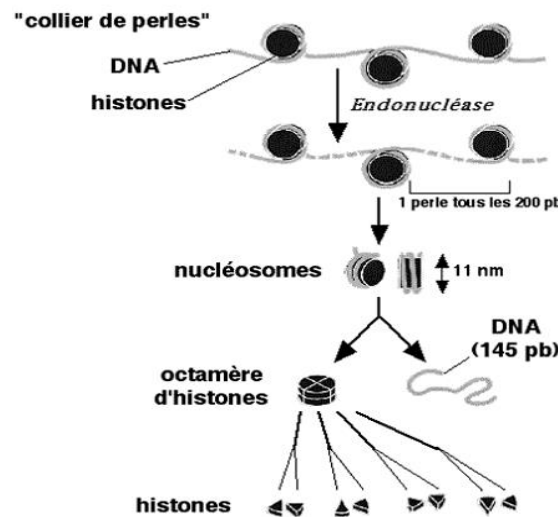
Le DNA a besoin d'être protégé par des protéines lorsqu'il n'est pas utilisé comme modèle pour l'expression des gènes ou la réplication. Cette protection se fait par enroulement autour de protéines basiques (**cationiques**) capables de se lier avec le DNA qui est un **poly-anion**.

Des **octamères d'histones** sont au centre de particules qu'on trouve tous les 200 nucléotides et autour desquels le DNA s'enroule. La structure évoque un « **collier de perles** ».

Le DNA ainsi lié aux histones est protégé contre l'action des enzymes.

Une endonucléase peut digérer le DNA entre les « perles » et détacher des particules de **11 nm de diamètre** appelées **nucléosomes**.

Chaque nucléosome est constitué d'un fragment de DNA de 145 paires de nucléotides et de huit molécules d'histones



**Histones** : protéines de petite taille (MM 11 à 22 kDa, 100 à 200 aa)

Protéines riches en **acides aminés basiques** (charge +): arginine, lysine, histidine.



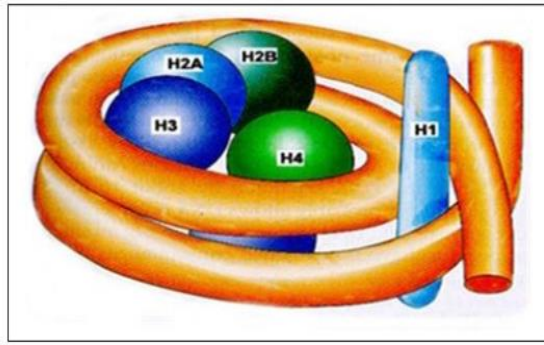


Figure. Structure du nucléosome

### 3.2. Fibre de chromatine

Le DNA qui entoure chaque nucléosome et le relie en « collier de perles » aux nucléosomes suivants, forme la trame d'une structure hélicoïdale qui enroule les colliers de perles sur eux-mêmes. On décrit aussi cette structure comme un **solénoïde**.

Le diamètre de cette hélice est de **30 nm** et forme une grande partie de la chromatine dite « Compactée » où le DNA n'est pas accessible.

**Chromatine** = 1/3 ADN + 2/3 protéines (histones 50%, autres 50%)

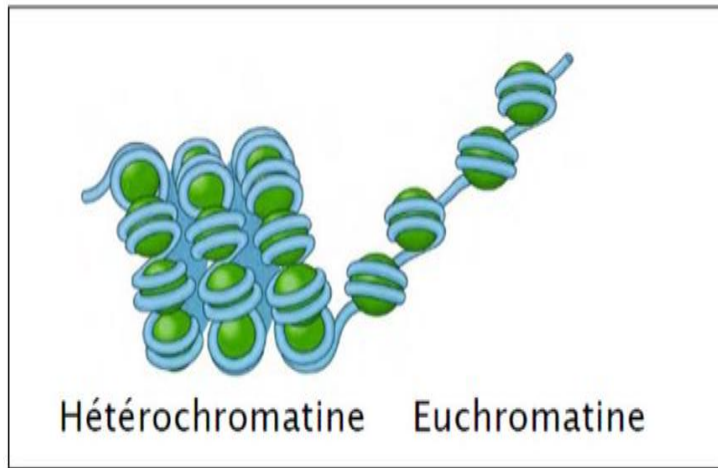
L'étude de la compaction du génome, par l'utilisation de colorants spécifiques, a permis de différencier 2 types de chromatine; **hétérochromatine** et **euchromatine**

A - **L'euchromatine** ou « chromatine vraie », qui apparaît modérément colorée en interphase au cours de laquelle elle se décondense ; L'euchromatine correspond aux régions chromosomiques chimiquement modifiées et associées à des protéines favorisant une structure décompactée, accessible à divers facteurs de régulation, notamment transcriptionnels donc accessible à la transcription. (Ce sont des gènes actifs).

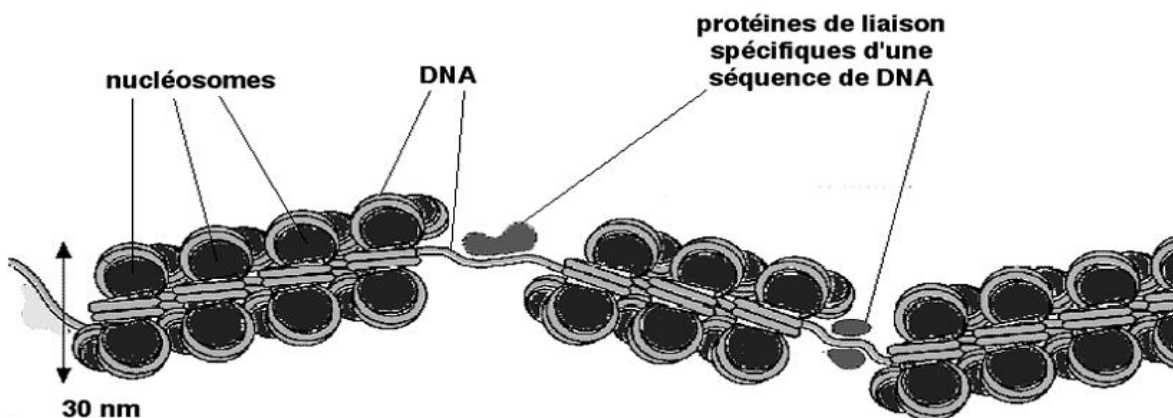
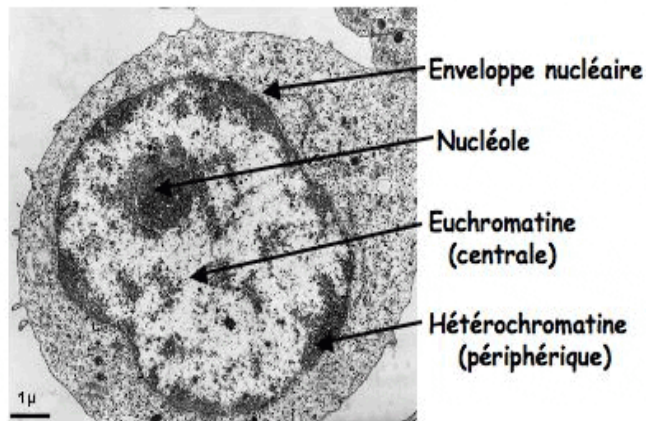
B - **L'hétérochromatine** ou « autre chromatine », qui correspond aux régions chromosomiques restant condensées, et qui sont donc colorées en interphase.

L'hétérochromatine est caractérisée par une composition en séquences génomiques et en protéines induisant une structure fortement compactée de la chromatine, globalement non permissive à la transcription, car elle est peu accessible aux facteurs régulateurs.

Elle se trouve au niveau des télomères et du centromère. Elle contient peu de gènes et est riche en ADN satellite. L'ADN satellite est constitué de petites séquences d'ADN répétées un certain nombre de fois.



**LOCALISATION DE LA CHROMATINE**



**Fibre de chromatine**

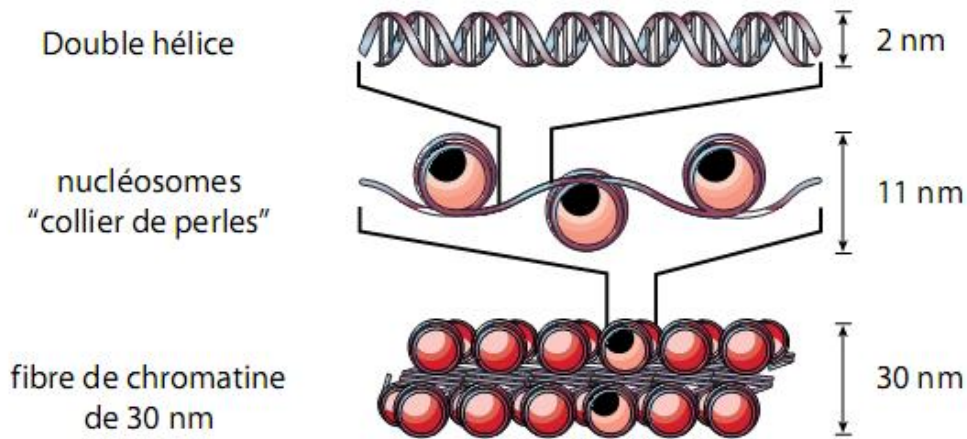
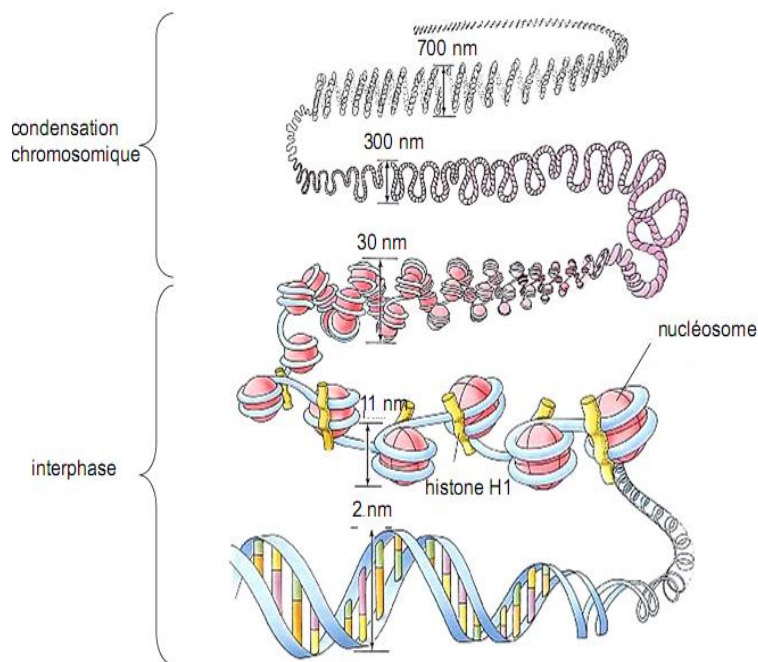
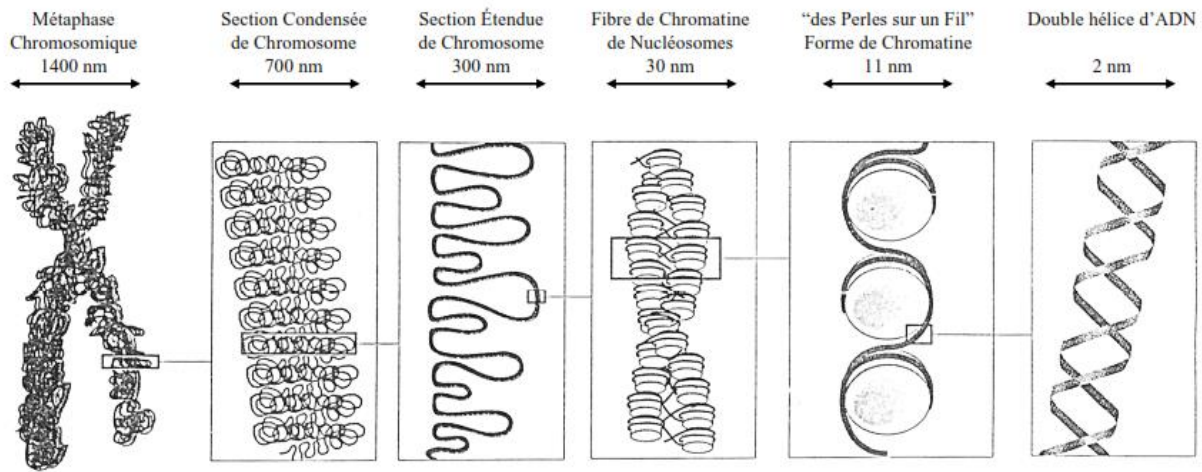


Figure 1.17 : Organisation de la chromatine chez les eucaryotes.

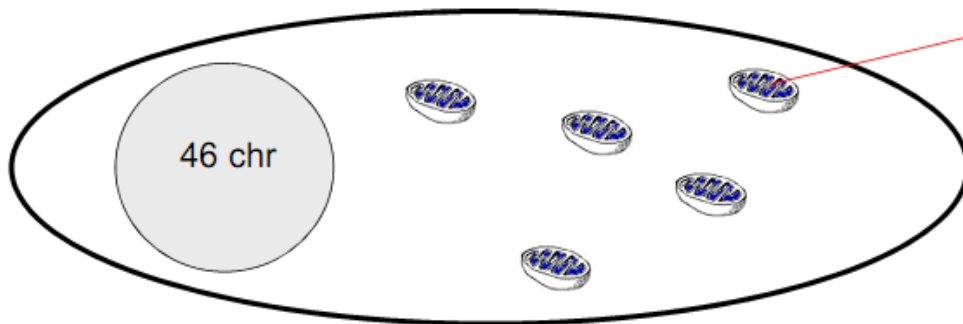
Le fibre de 30nm de diametre forme une serie de domaines en boucle qui condense encore plus la fibre de chromatine pour atteindre un diametre de 300 nm. Les fibres sont alors enroulées a l'interieur des bras du chromosomes et forme une chromatides, qui est un constituant du chromosome metaphasique. La valeur de 700 nm indiquée sur la figure peut varier selon l'organisme considerée. Pour une valeur de 700 nm, une paire de chromatides soeurs constituera un chromosome d'environ 1400 nm de diametre.



## Nucléosome, fibre de chromatine, et chromosome



### 4. Organisation de l'ADN des mitochondries



1. Chaque mitochondrie contient plusieurs **ADNmt circulaires** qui sont Composés de 2 brins, un brin lourd (H) et un brin léger (L). Chez l'homme il a une longueur de 16569 paires de bases.
2. La majorité de l'ADNmt est codant. Il code pour : 13 unités polypeptidiques qui composent les 5 complexes de la chaîne respiratoire, 2 ARNr et 22 ARNt. Les ARNr et ARNt codés par l'ADNmt sont impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales.
3. Les gènes mitochondriaux ne possèdent ni d'intron, ni de séquence promotrice. Les séquences non traduites des messagers sont inexistantes.
- 4 - organisé en nucléoïde et non associé à des histones
- 5- 1 à 2% de la masse totale d'ADN de la cellule
6. Le code génétique de l'ADNmt est différent de celui de l'ADN nucléaire et de celui des procaryotes.

TGA code pour la tryptophane (au lieu d'un codon stop)

ATA code pour la méthionine (au lieu de l'isoleucine)

AGA et AGG codent pour terminaison de chaîne (au lieu de l'arginine)

#### IV. Méthodes d'études des acides nucléiques

##### Extraction de l'ADN génomique

Différents protocoles pour extraire l'ADN avec même schéma de principe :

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN...)
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

##### Séparation des acides nucléiques

##### Principe général:

Dans un milieu donné, la séparation des particules se fait en fonction de leur **charge électrique** et pour des charges identiques, en fonction de leur **taille**.

##### Principe:

basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement à pH 7~8, vers l'anode (+) sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel en fonction de la taille des molécules.

Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur.

Deux principaux polymères sont utilisés : l'agarose et le polyacrylamide.

