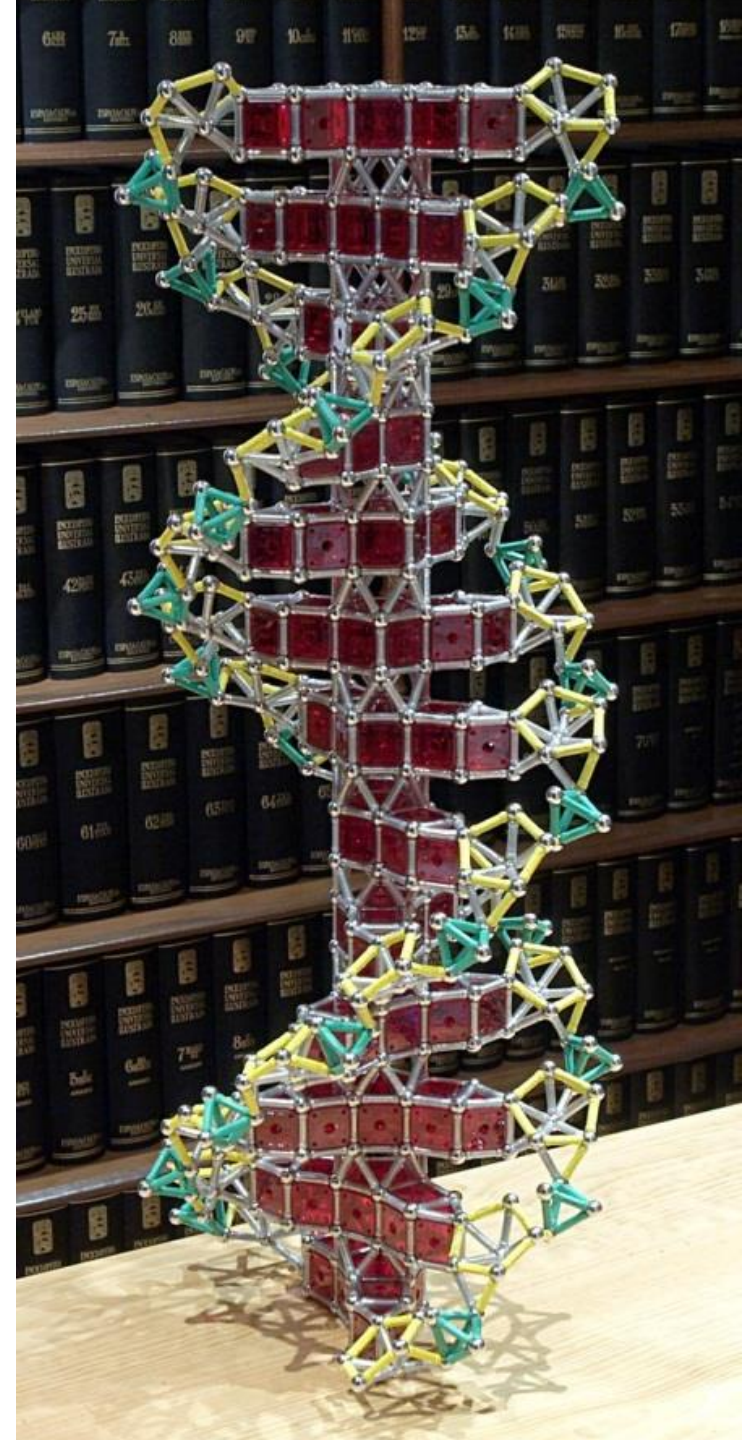


# Structure des acides nucléiques Réplication de l'ADN



# Plan du cours

- Importance des acides nucléiques
- Structure des acides nucléiques
  - Bases azotées, nucléosides, nucléotides
  - Hybridation des bases azotées
  - Structure, stabilisation et propriétés des acides nucléiques
  - Dénaturation et action des nucléases sur l'ADN
- Signification de la séquence de nucléotides, structure des gènes
- Réplication de l'ADN
  - Propriétés générales
  - Mécanisme général et particularités sur chacun des brins matrice.

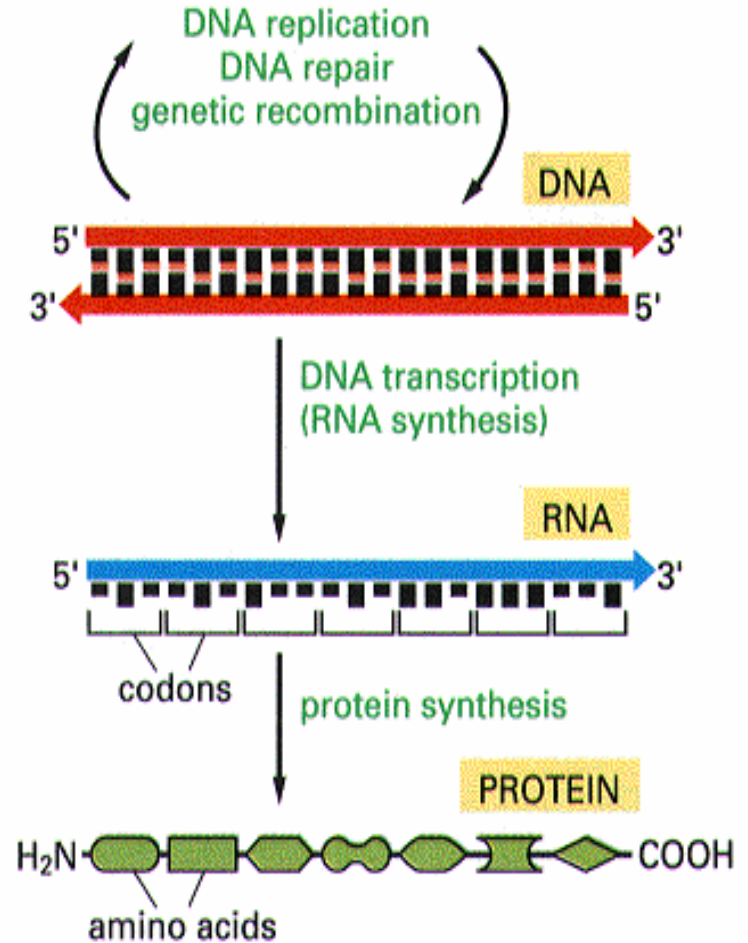
# Flux de l'information génétique

**Réplication:** ADN → ADN  
(avant la division cellulaire)

**Transcription:** ADN → ARN  
(synthèse des ARN cellulaires)

**Traduction:** ARNm → protéines  
(synthèse des protéines)

**Reverse transcription:**  
ARN → ADN (rétrovirus).

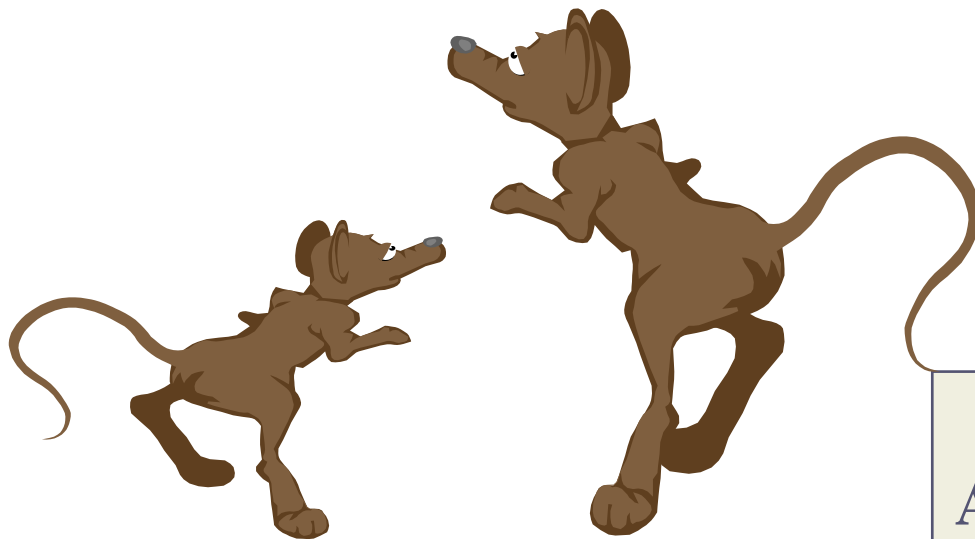
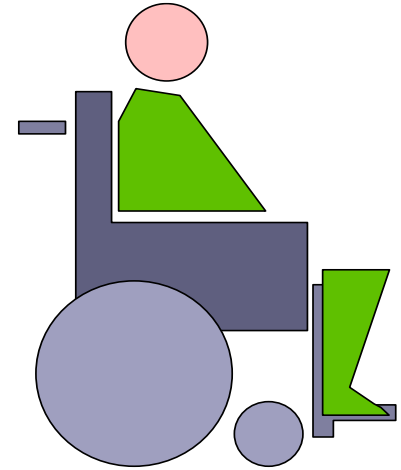


# Importance de l'ADN



← Variations  
phénotypiques  
individuelles

Maladies  
génétiques →



Edition des gènes  
Animaux transgéniques, OGM...

# Importance de l'ADN

- Rôle des acides nucléiques dans le stockage de l'information génétique:
  - **Transformation génétique des bactéries**: acquisition de la virulence bactérienne par transfert d'un fragment d'ADN
  - **Création des animaux transgéniques**: ingénierie génétique (édition/surexpression/inactivation des gènes) → modification des organismes
- Importance de l'ADN chez l'homme
  - **Maladies génétiques**: mutations de l'ADN (variations structurelles rares) ± facteurs épigénétiques, environnementaux → variabilité clinique
  - **Variabilité phénotypique dans la population générale**: polymorphismes (variations fréquentes → 0,1% du génome humain).

# Séquençage de l'ADN

- **Séquençage du génome humain**: décryptage de la séquence de tous les nucléotides de l'ADN
- **Séquençage de l'exome**: lecture de la séquence des gènes.

## Chronologie

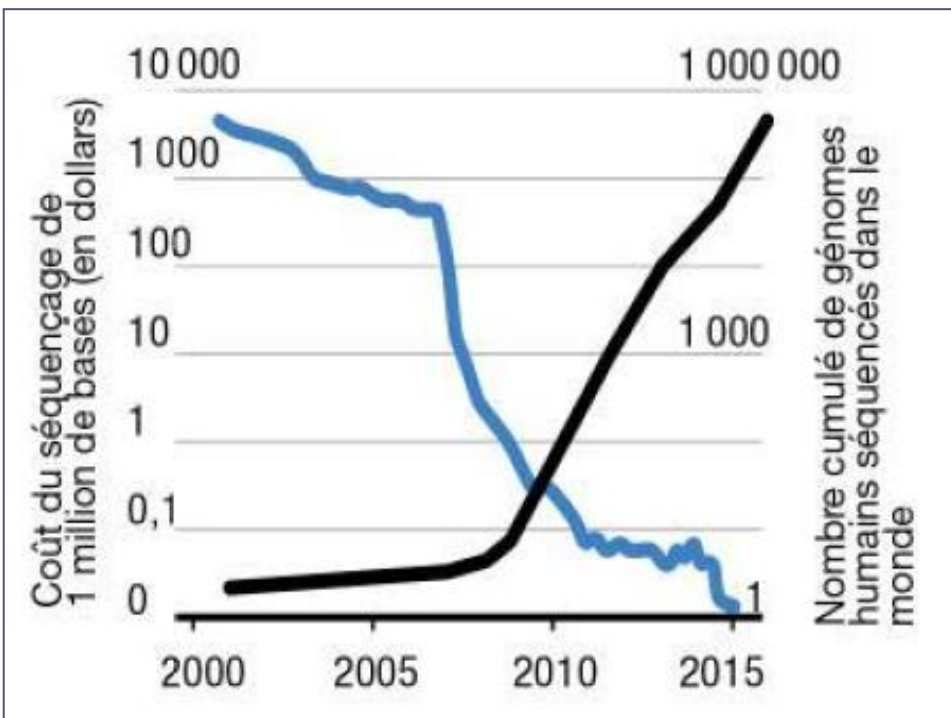
**2003** : le génome humain est pour la première fois intégralement séquencé, après une décennie de travail et pour un coût de 2,7 milliards de dollars.

**2012** : le séquençage d'un génome humain complet ne coûte plus que 1 0 00 euros.

**2015** : l'ADN de près d'un demi-million de Français est séquencé sur prescription (dans le cas de maladies rares, de cancers... ).

**2016** : le gouvernement français annonce l'investissement de 670 millions d'euros dans la médecine génomique sur 5 ans.

# Evolution du séquençage de l'ADN humain



**Séquencer coûte de moins en moins cher**



# Applications: cancers



- Prescription des traitements ciblés
- Evaluation du pronostic
- Suivi de l'évolution de la maladie.

## CANCERS OPTIMISER LES TRAITEMENTS

Connaître l'ADN de la tumeur permet de prescrire le traitement le plus adapté au patient

✓ Au moins 7 cancers différents sont concernés par ces thérapies "ciblées"

✓ Au moins 22 médicaments dépendent de l'ADN du patient

# 27%

Le nombre de malades séquencés est passé de 55 000 en 2011 à 70 000 en 2014



# Applications: maladies génétiques



## MALADIES RARES

### MIEUX LES DIAGNOSTIQUER

Séquencer les gènes facilite la recherche de la mutation responsable des symptômes et l'établissement d'un diagnostic

✓ Au moins 1 518 maladies sont concernées

✓ 286 538 examens ont été réalisés en 2015

# 20-25%

Le nombre de personnes séquencées aurait augmenté d'environ 20 à 25 % depuis 2011, pour atteindre près de 270 000 personnes en 2015

- Faible prévalence individuelle, globalement > 3 millions de Français affectés
- Identification / confirmation du diagnostic
- Prescription du traitement adéquat
- Evaluation du risque de récurrence dans la même famille.

# Applications: pharmacogénétique

## MALADIES NON GÉNÉTIQUES

### ÉVITER LES EFFETS SECONDAIRES DES MÉDICAMENTS

En étudiant l'ADN du patient, on peut prédire comment il réagira à un médicament

✓ Plusieurs dizaines de maladies sont concernées

✓ Une trentaine de traitements peuvent dépendre de ces tests

+ **27%**

Le nombre d'examens de pharmacogénétique est passé de 15737 en 2011 à 19909 en 2015

- Gènes qui contrôlent le métabolisme, le transport des médicaments
- Prédiction de l'efficacité, du risque d'effets secondaires et du dosage optimal
- Maladies: SIDA, hépatite C, maladies cardiovasculaires, maladies inflammatoires intestinales, transplantations d'organes...

# Définitions

- **Hérédité**: transmission de l'information génétique → descendants
- **Information génétique**: information → synthèse biomolécules (protéines, acides nucléiques)
- **Acides nucléiques**: stockage de l'information génétique
  - ADN: génome de la plupart des organismes
  - ARN: génome des rétrovirus
- **Gènes**: fragments d'acides nucléiques → synthèse de protéines, ARN ( $\approx 21500$  et  $\approx 4500$  chez l'homme)
- **Génotype**: information génétique d'un organisme
- **Phénotype**: somme des caractères observables/mesurables (déterminé par le génotype, l'environnement, les facteurs épigénétiques...)

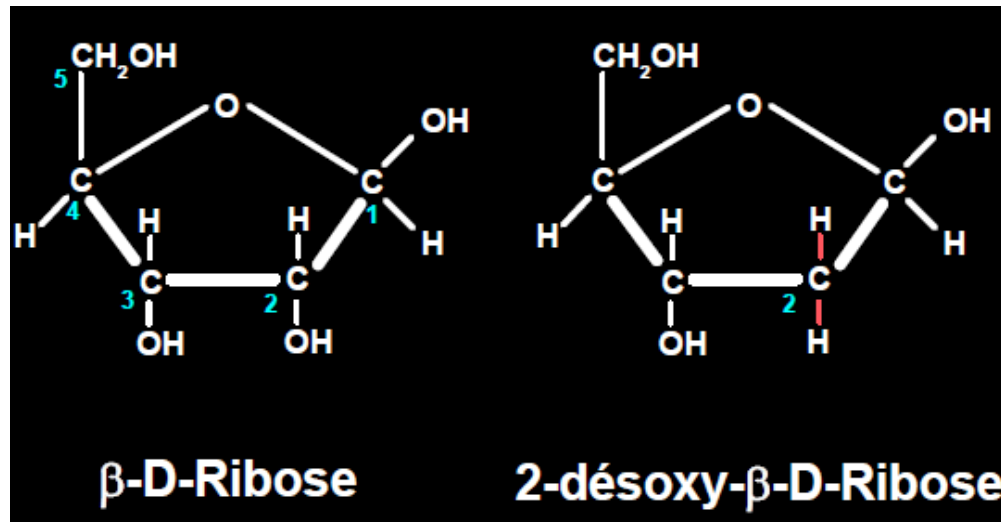
# Structure des acides nucléiques

- Composition

- Bases azotées
- $H_3PO_4$
- Pentose: ribose (ARN) / 2-désoxyribose (ADN)

- $\beta$ -*D*-ribose: pentose de la série *D*, cyclisé en ribofuranose

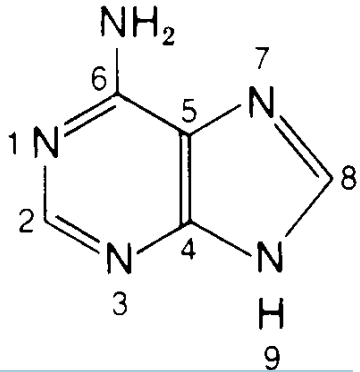
- 2-désoxy- $\beta$ -*D*-ribose: réduction du ribose (OH- $C_2$ )  $\rightarrow$  stabilité  $\uparrow$   $\rightarrow$  présence dans l'ADN (stockage de l'information génétique).



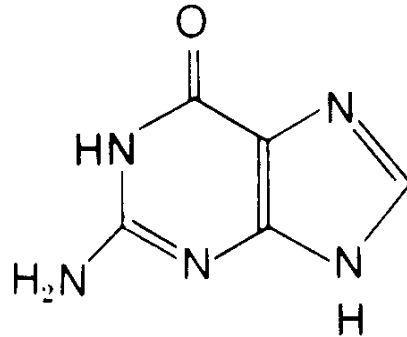
# Bases azotées, nucléosides et nucléotides

- **Bases azotées**: composés aromatiques (hydrophobes)
- **Bases puriques**: adénine (A), guanine (G)
  - Double noyau aromatique: cycle hexagonal (4C, 2N) + cycle pentagonal (3C, 2N)
- **Bases pyrimidiques**: uracile (U), cytosine (C), thymine (T)
  - Cycle hexagonal unique (4C, 2N)
  - 5-CH<sub>3</sub>-cytosine → thymine (désamination oxydative)
- **Nucléoside**: pentose (ribose/2-désoxyribose) + base azotée (liaison *N*-osidique)
- **Nucléotides**: esters phosphoriques des nucléosides (1-3 résidus PO<sub>4</sub>)
- **Acides nucléiques**: polymères → polycondensation des nucléotides, unis par des liaisons phosphodiester.

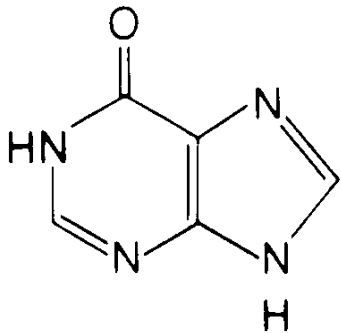
# Structure des bases azotées



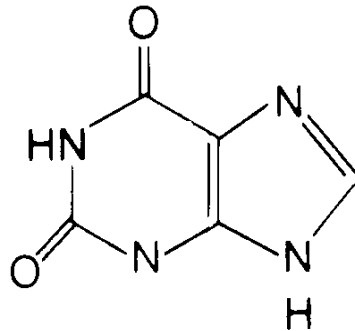
**Adénine**



**Guanine**

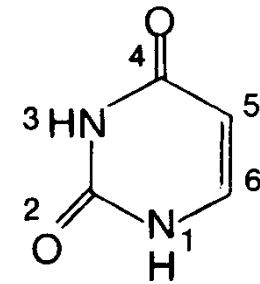


**Hypo-xanthine**

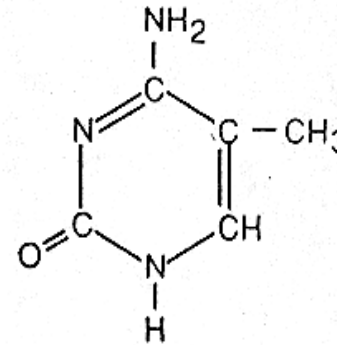


**Xanthine**

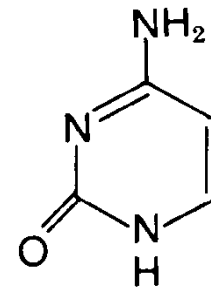
**Bases puriques**



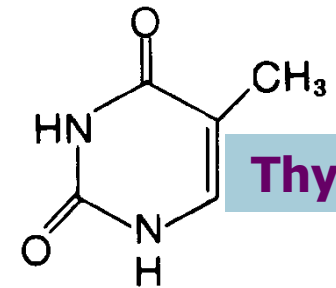
**Uracile**



**5-méthyl-cytosine**



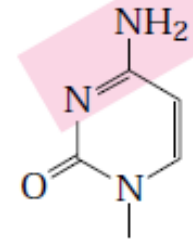
**Cytosine**



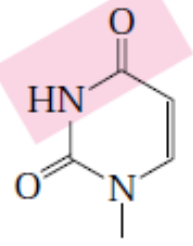
**Thymine**

**Bases pyrimidiques**

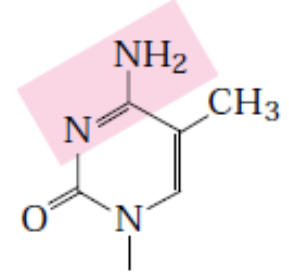
# Désamination spontanée des bases azotées



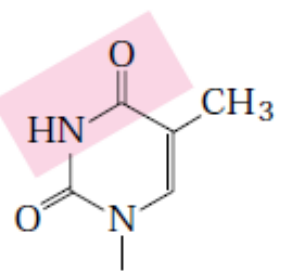
Cytosine



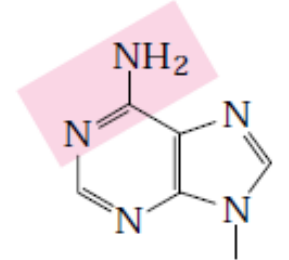
Uracil



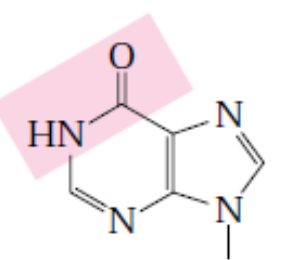
5-Methylcytosine



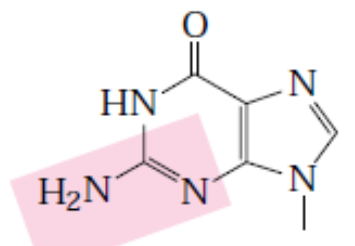
Thymine



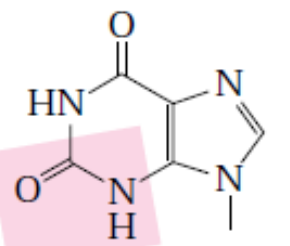
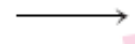
Adenine



Hypoxanthine

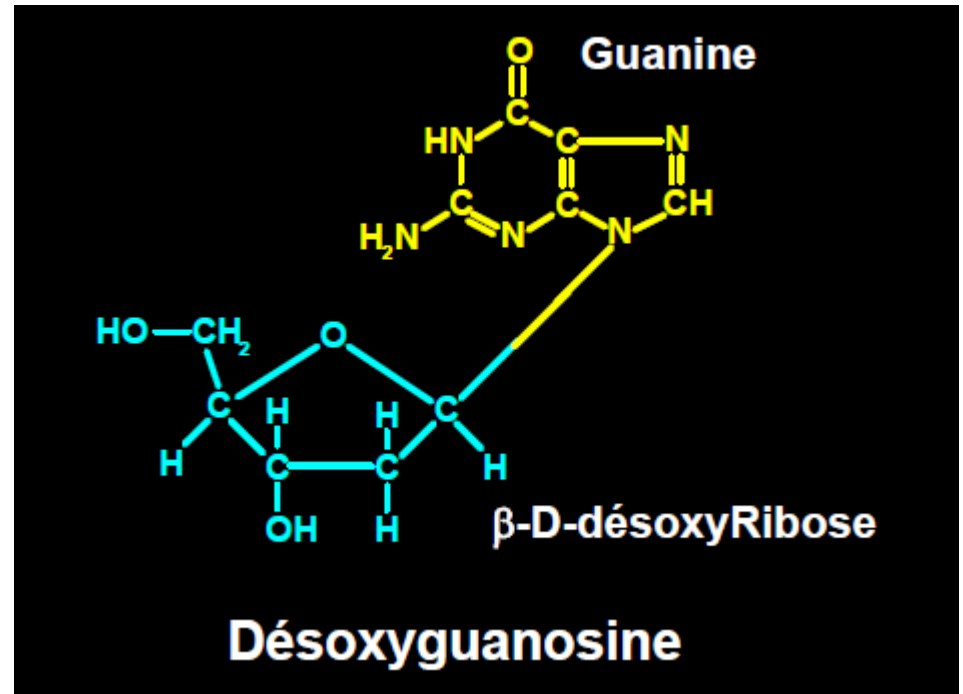
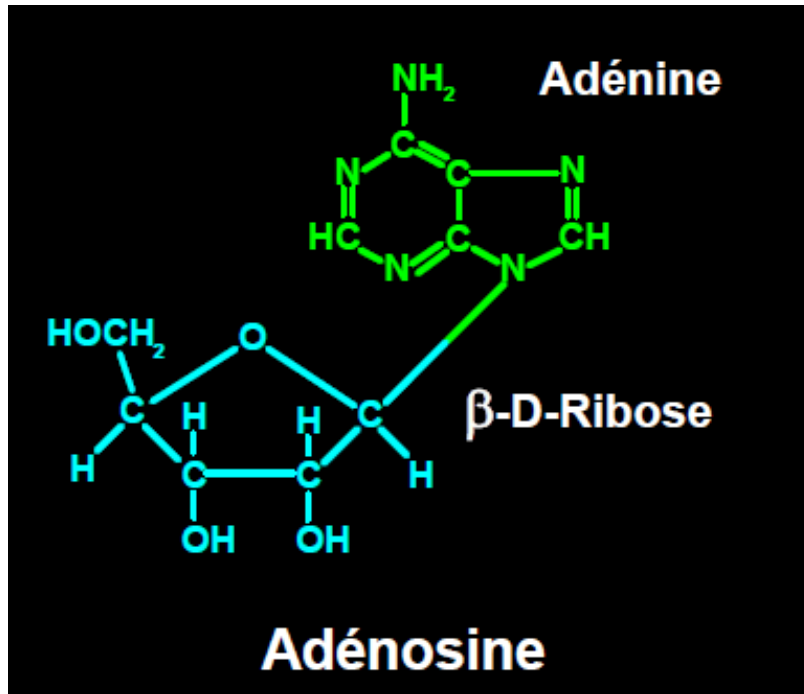
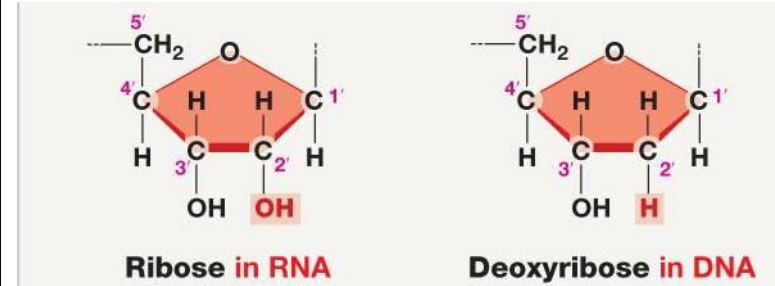
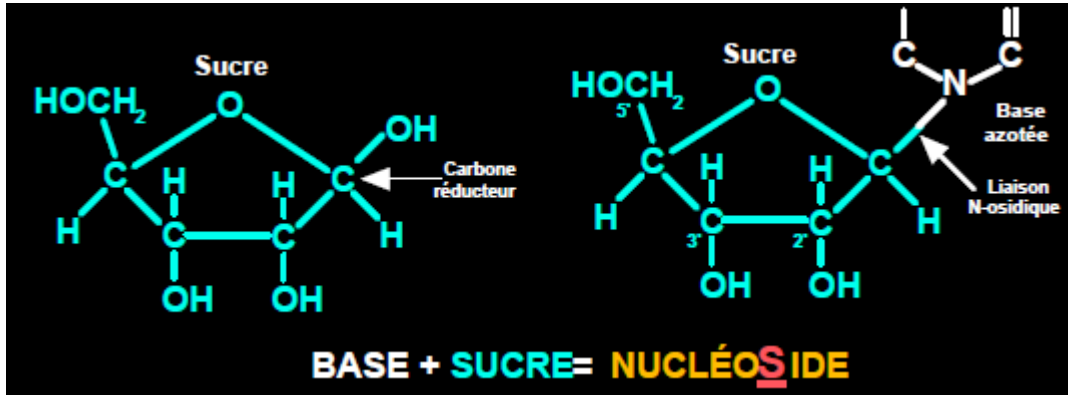


Guanine



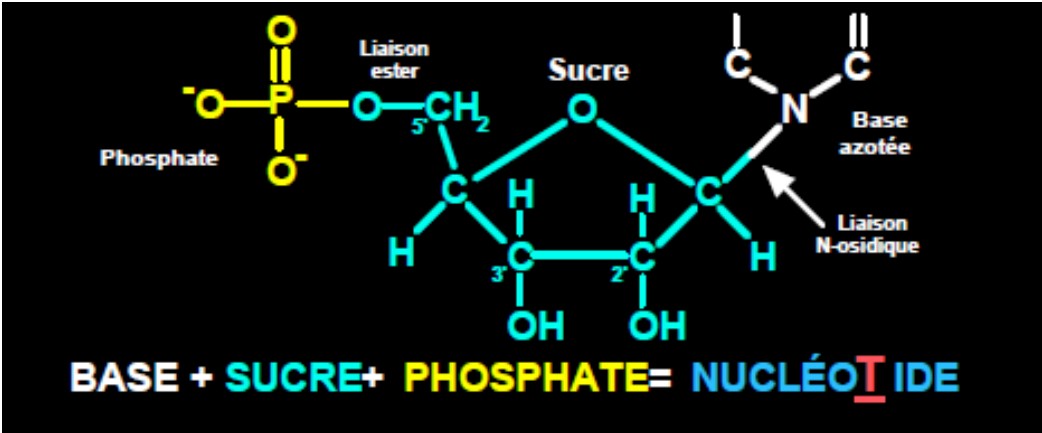
Xanthine

# Structure des nucléosides



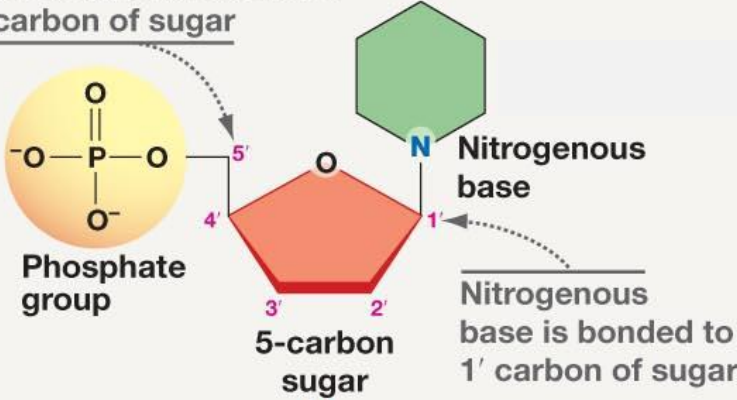


# Structure des nucléotides

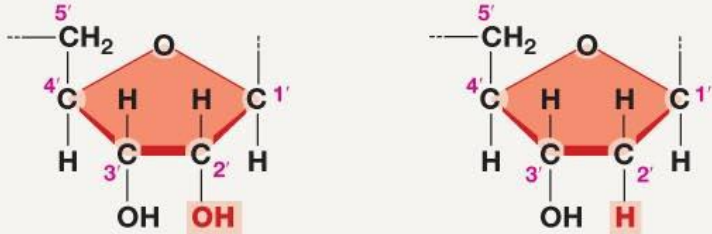


## (a) Nucleotide

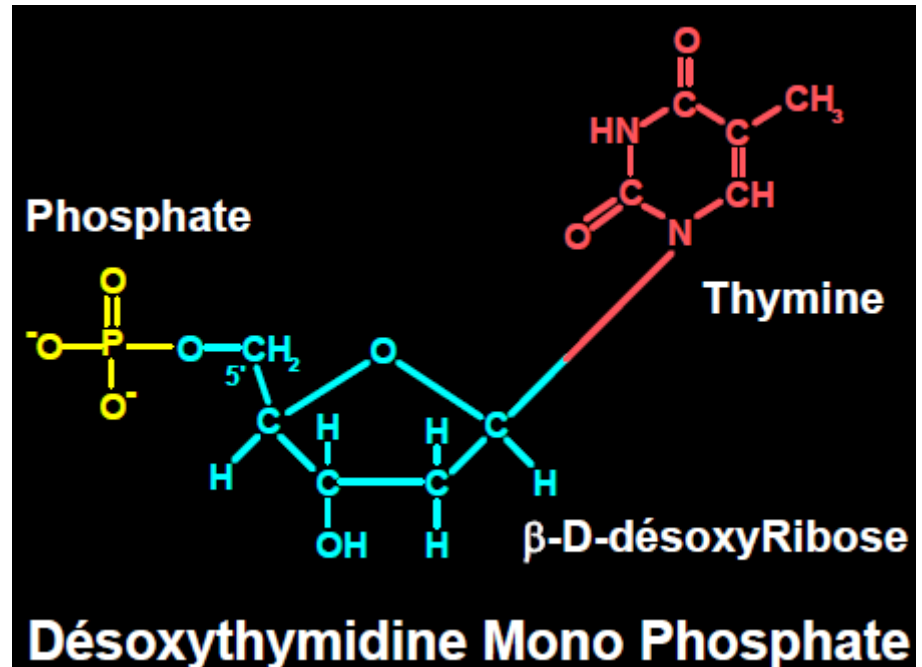
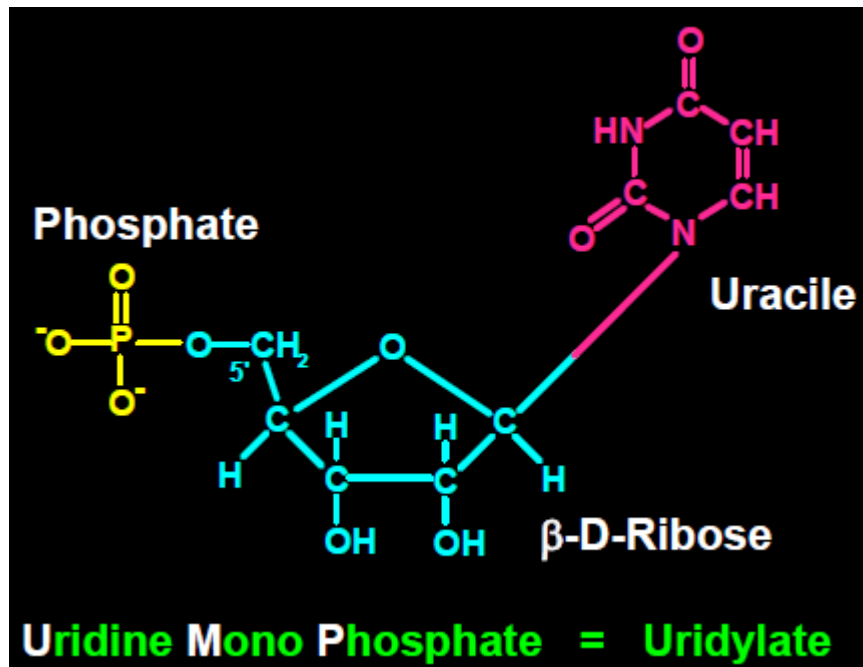
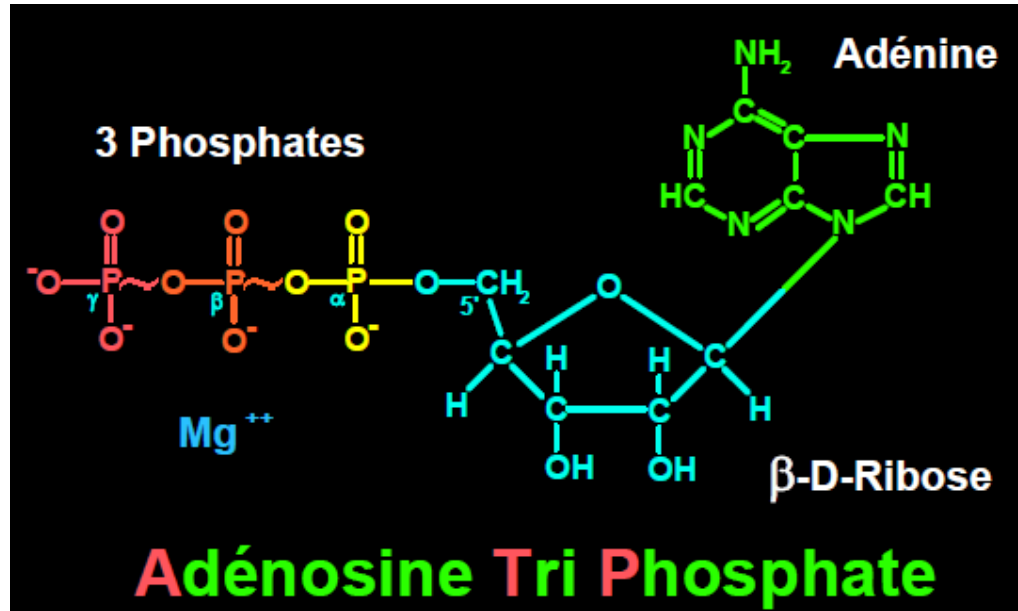
Phosphate group is bonded to 5' carbon of sugar



## (b) Sugars



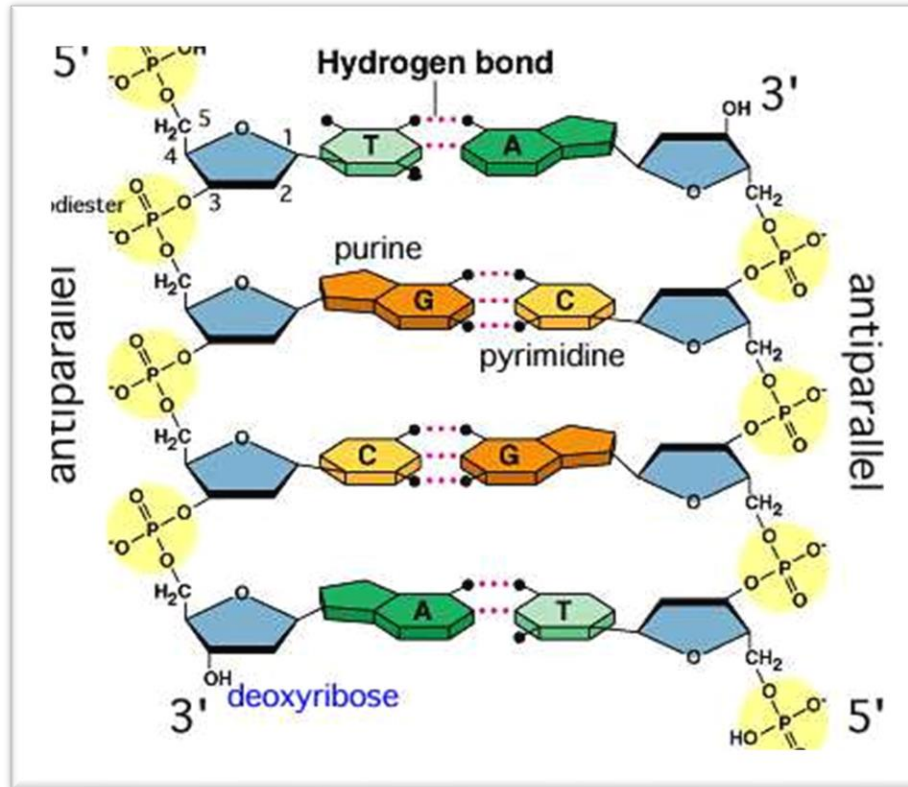
# Exemples de nucléotides



# Classification et nomenclature

<b>Bases azotées</b>	<b>Nucléosides</b>	<b>Nucléotides</b>
<b>Adénine</b>	Adénosine Désoxy-adénosine	AMP, ADP, ATP dAMP, dADP, dATP
<b>Guanine</b>	Guanosine Désoxy-guanosine	GMP, GDP, GTP dGMP, dGDP, dGTP
<b>Cytosine</b>	Cytidine Désoxy-cytidine	CMP, CDP, CTP dCMP, dCDP, dCTP
<b>Thymine</b>	Thymidine Désoxy-thymidine	TMP, TDP, TTP dTMP, dTDP, dTTP
<b>Uracile</b>	Uridine Désoxy-uridine	UMP, UDP, UTP dUMP, dUDP, dUTP

# Hybridation des bases azotées



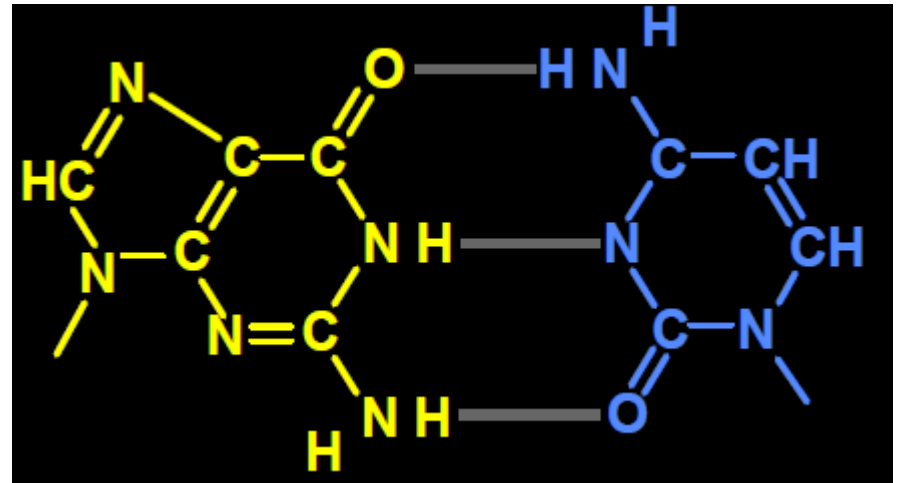
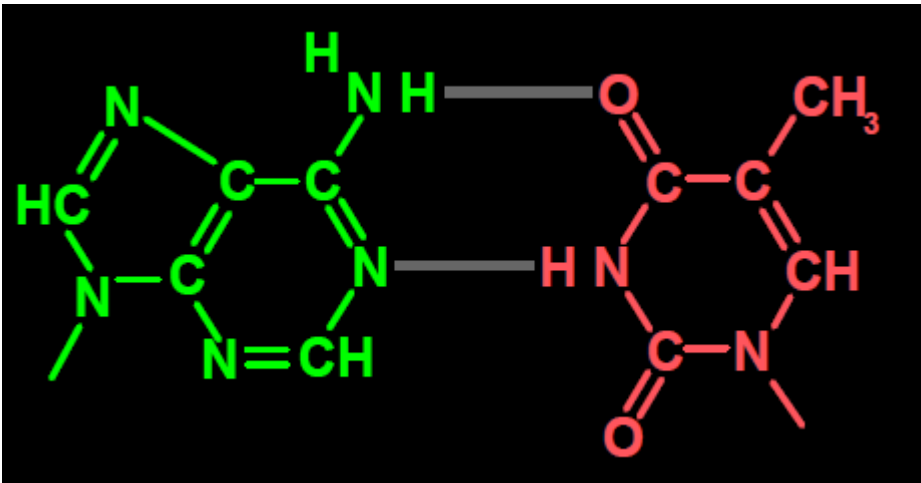
**Loi de Chargaff: toute molécule d'ADN**

**$A = T$  (%) et  $G = C$  (%)**

**Rapport purines : pyrimidines = 1 : 1**

# Hybridation des bases azotées

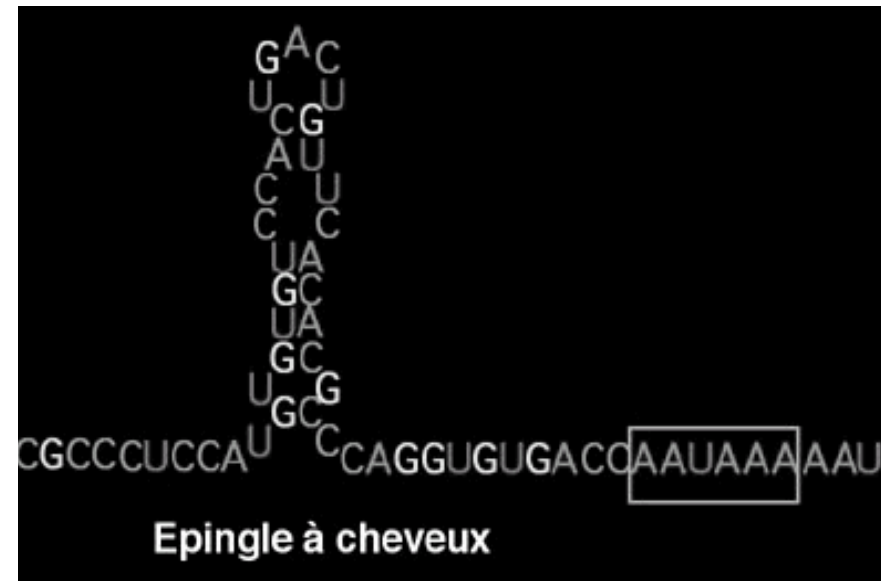
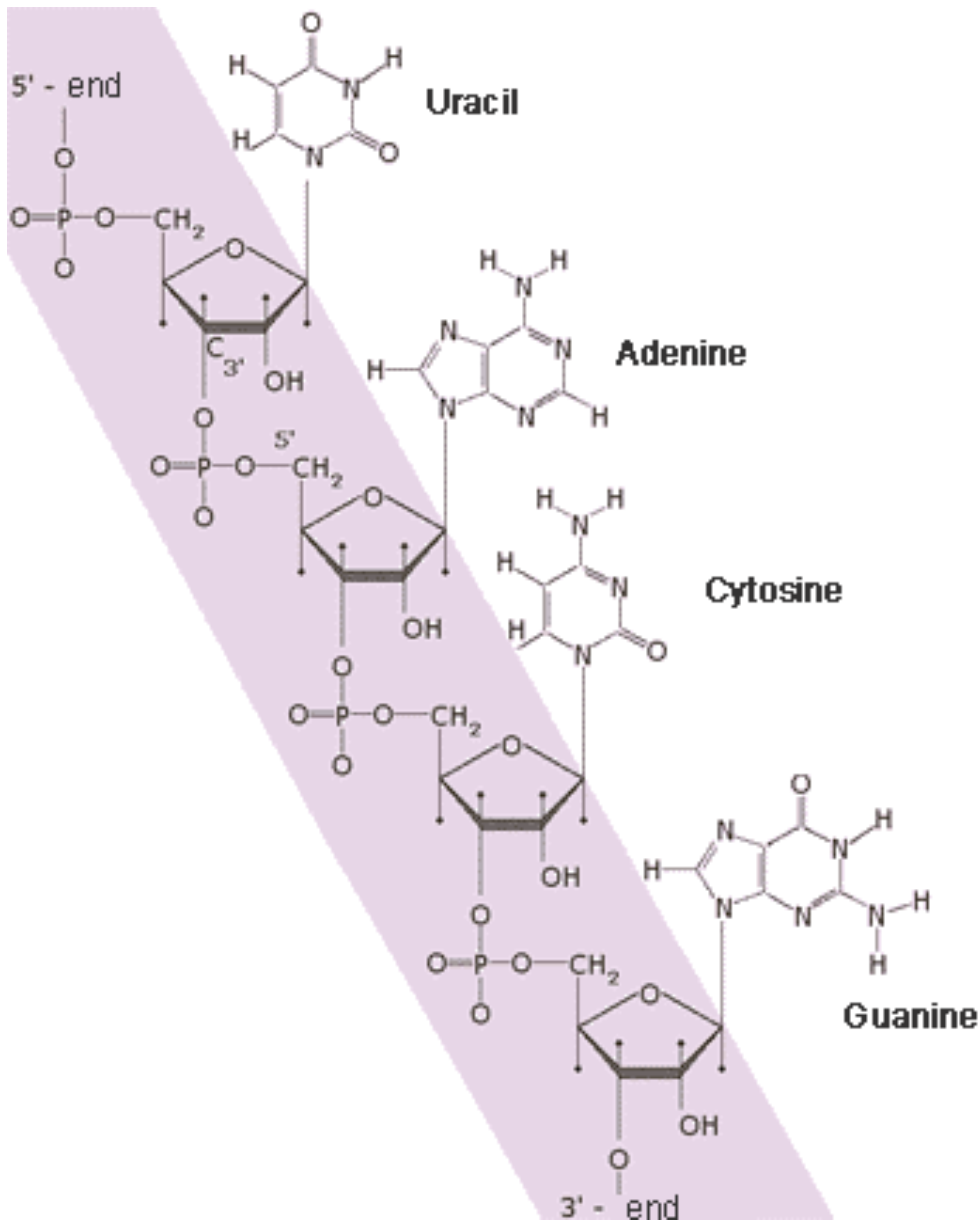
- **Hybridation des bases azotées**: liaisons hydrogènes qui associent les bases (base purique ↔ base pyrimidique)
  - A=T ou A=U
  - G≡C
  - Hybridations A=T, A=U moins stables que G≡C
- **Séquences complémentaires**: fragments d'acides nucléiques qui s'apparient entre eux → appariements intra/intermoléculaires.



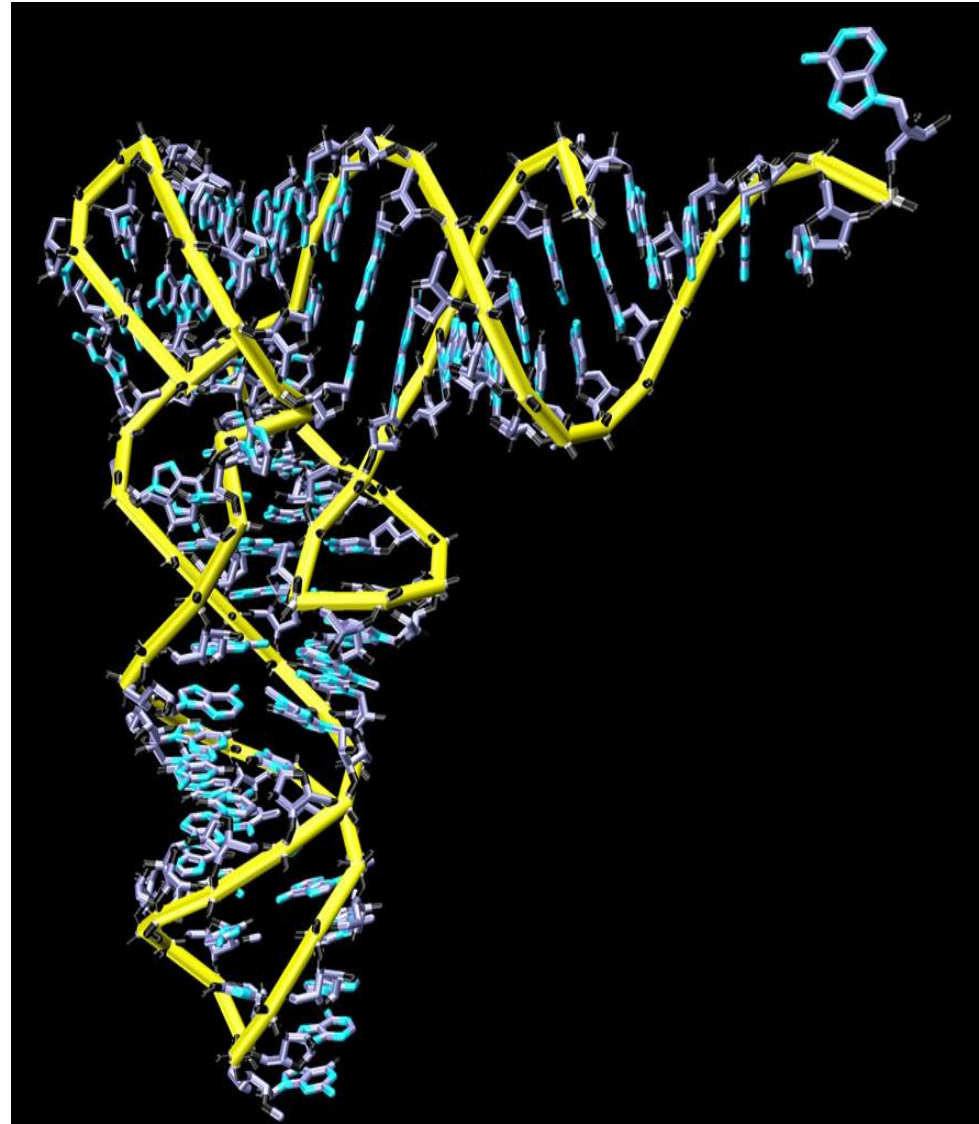
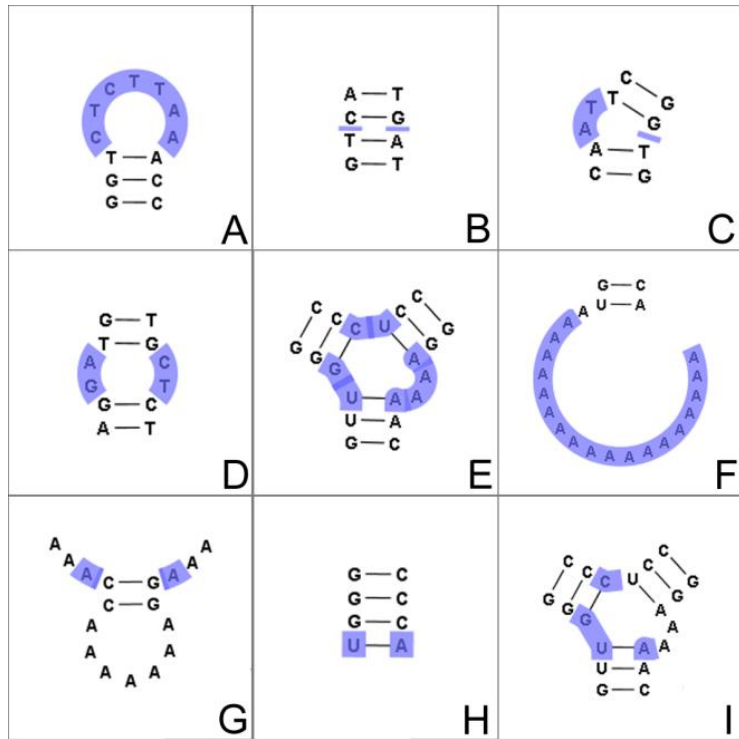
# Structure de l'ARN

- **Polymère de NMP**: A, G, C, U constitués avec ribose
- **Liaisons phosphodiester**: C<sub>3'</sub> un nucléotide ↔ C<sub>5'</sub> du nucléotide suivant → macromolécule (1 brin de nucléotides)
  - Eucaryotes: ARN double brin → régulation de l'expression des gènes
- **Orientation des liaisons phosphodiester**: début → P<sub>i</sub>-C<sub>5'</sub> libre, fin → OH-C<sub>3'</sub> libre
- **Structures secondaires** (auto-hybridation des bases): signaux (plis, boucles, épingles à cheveux)
- **Séquences caractéristiques**: signaux (5'-AAUAAA-3' → fin de la transcription des gènes).

# Structure de l'ARN

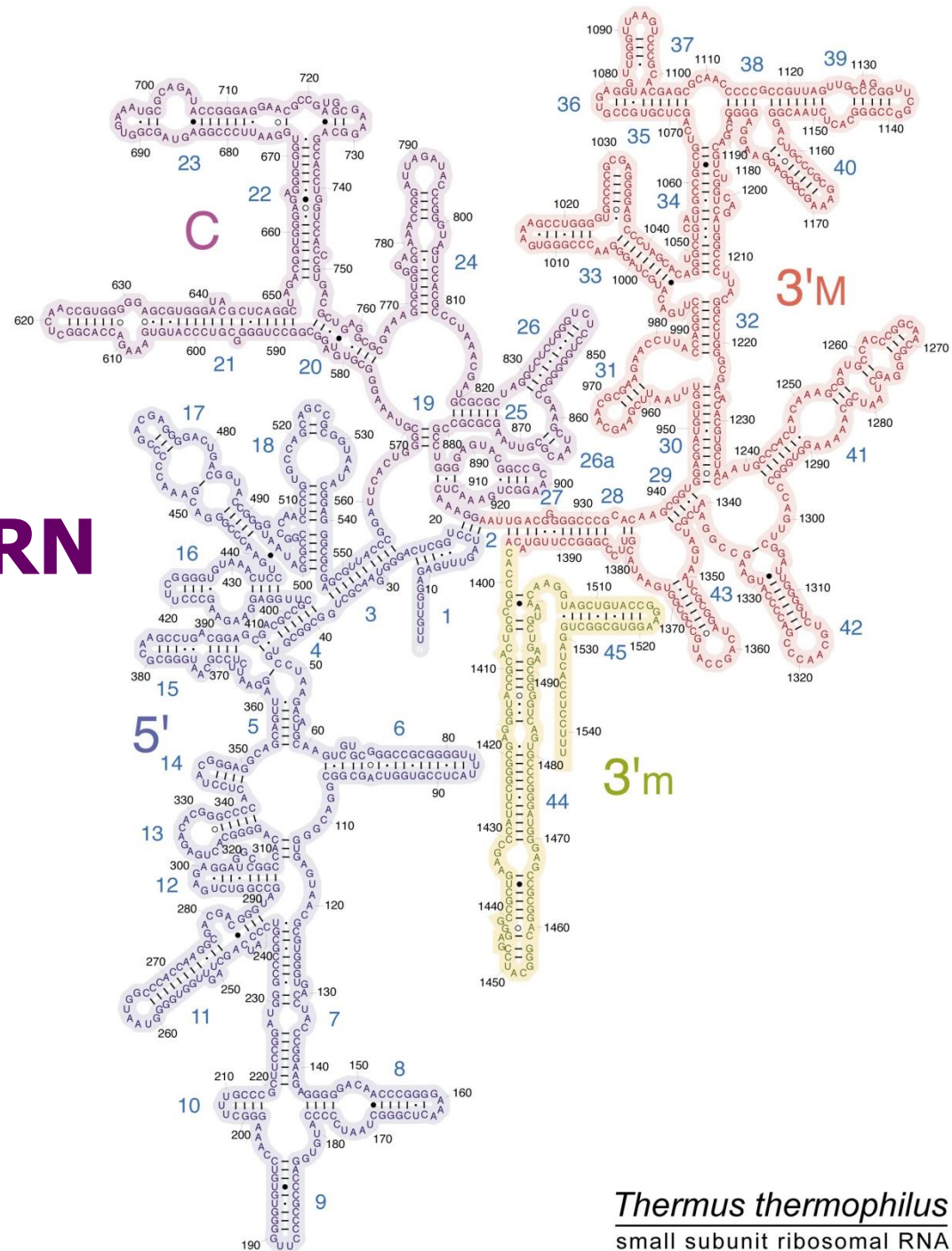


# Structures secondaires de l'ARN





# Structures secondaires de l'ARN

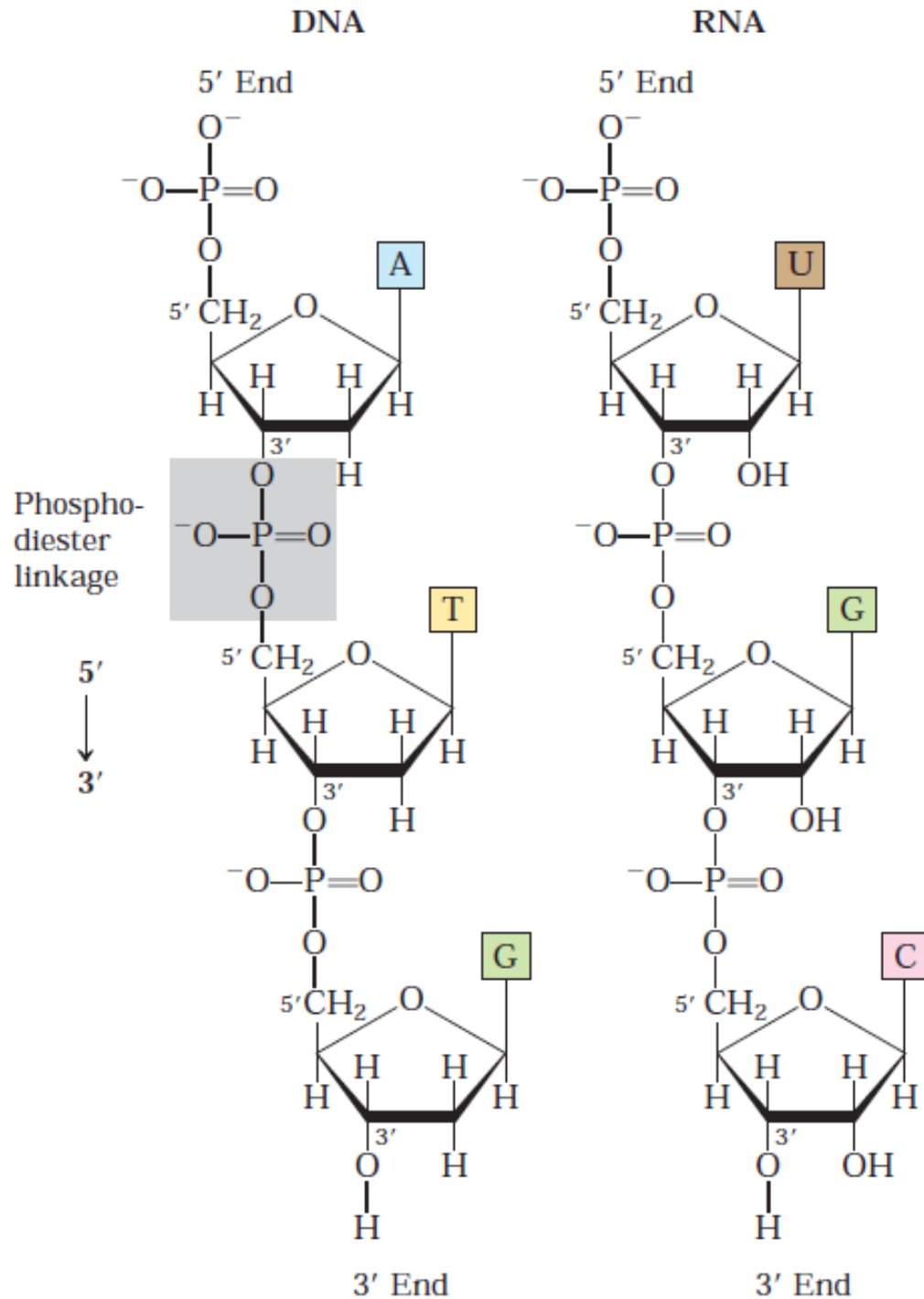


*Thermus thermophilus*  
small subunit ribosomal RNA

# Structure de l'ADN

- **Polymère de dNMP**: A, G, C, T constitués avec 2-désoxyribose
- **Liaisons phosphodiester**:  $C_{3'} \leftrightarrow C_{5'}$  nucléotides adjacents
- **Orientation des liaisons phosphodiester**: début  $\rightarrow P_i-C_{5'}$  libre, fin  $\rightarrow OH-C_{3'}$  libre
- **2 brins de nucléotides**: hybridation des bases 2 à 2 sur toute la longueur  $\rightarrow$  paires A=T, G=C (paires Watson-Crick)
- **Double hélice**: conformation hélicoïdale de chaque brin  $\rightarrow$  double hélice (James Watson et Francis Crick, 1953).

# Structure des brins de nucléotides

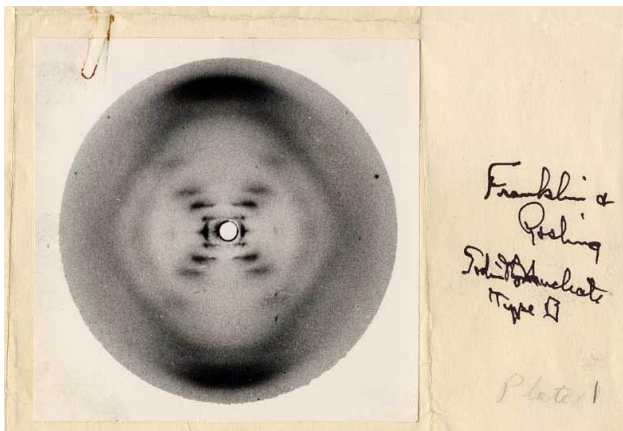


# La double hélice

- Particularités

- Brins antiparallèles: extrémité 5' d'un brin ↔ extrémité 3' du brin complémentaire
- Brins complémentaires: hybridation des bases (toute la longueur)
- Bases azotées (hydrophobes) → intérieur, perpendiculaires à l'axe de la double hélice
- Désoxyriboses + P<sub>i</sub> (hydrophiles) → extérieur

- Conséquences: réplication de l'ADN, expression des gènes...



James Watson

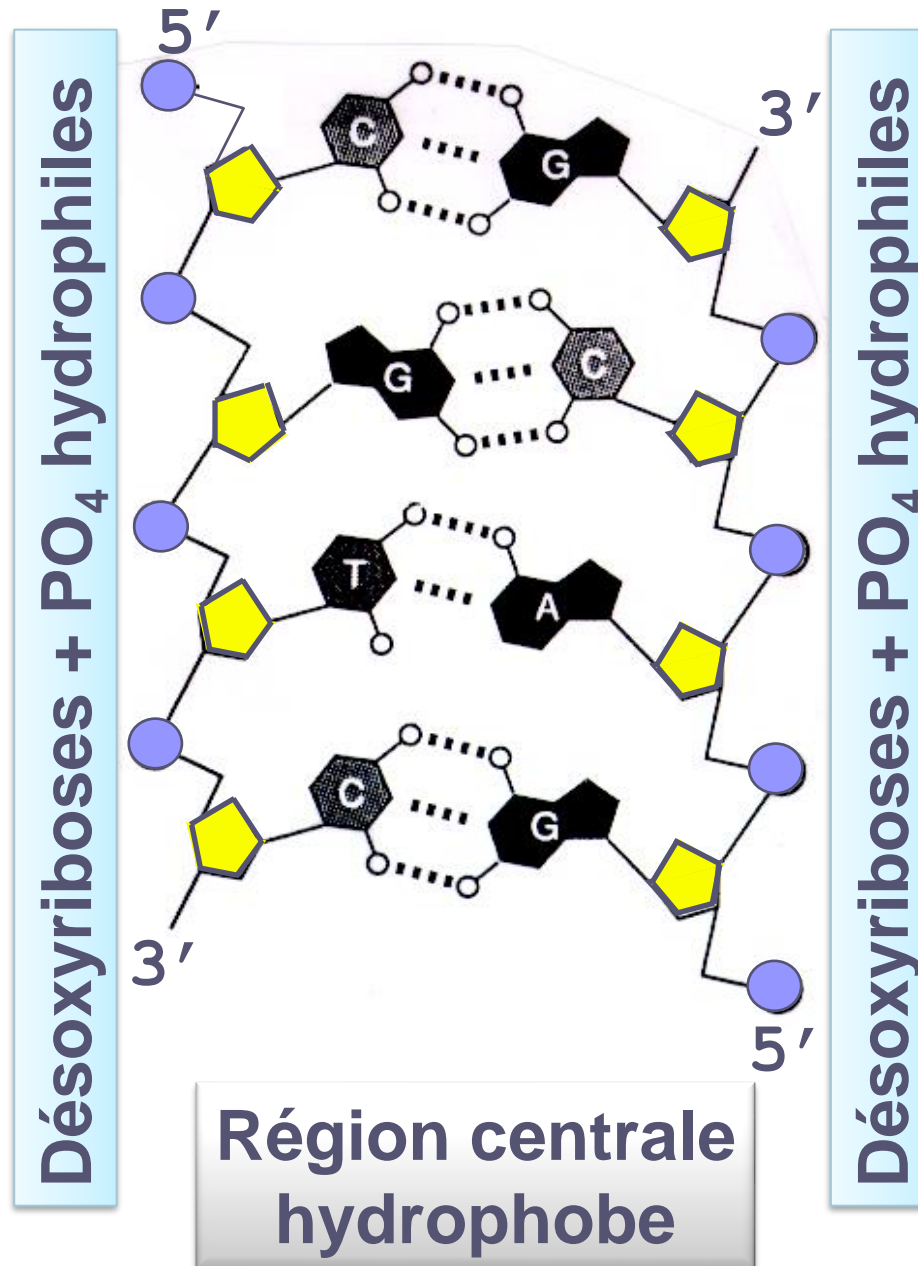


Francis Crick

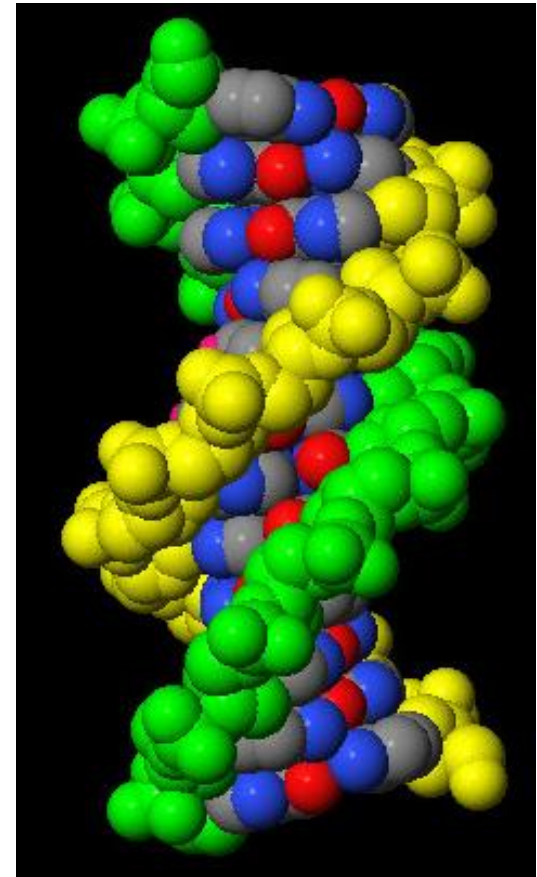
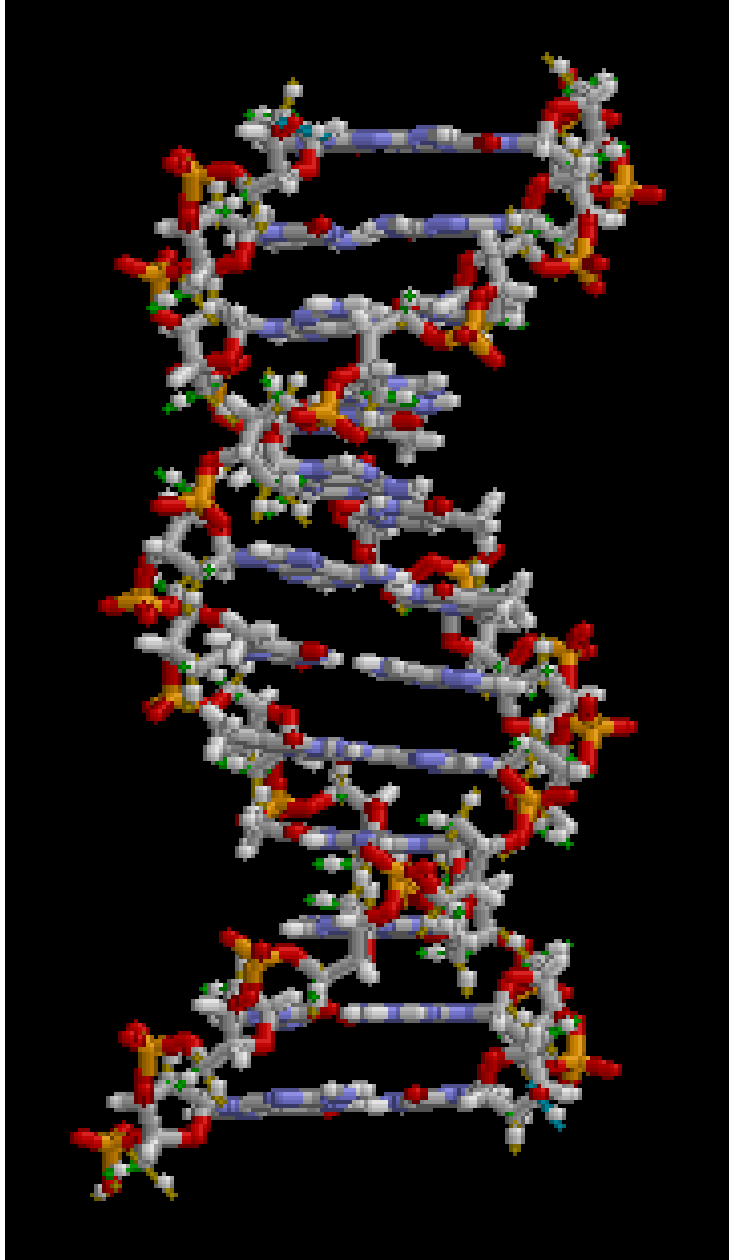


Rosalind Elsie Franklin  
1920-1958

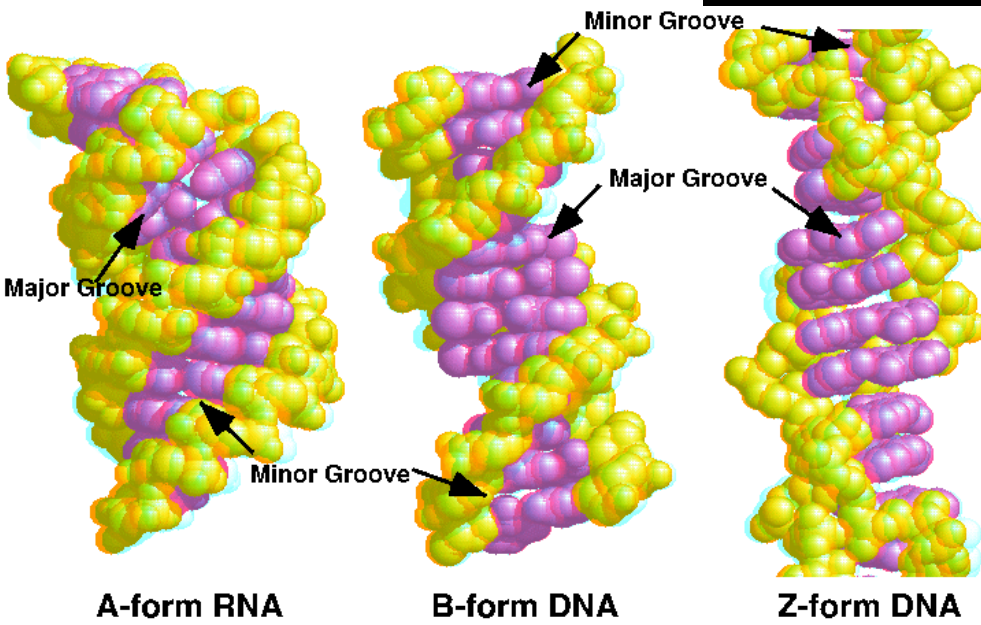
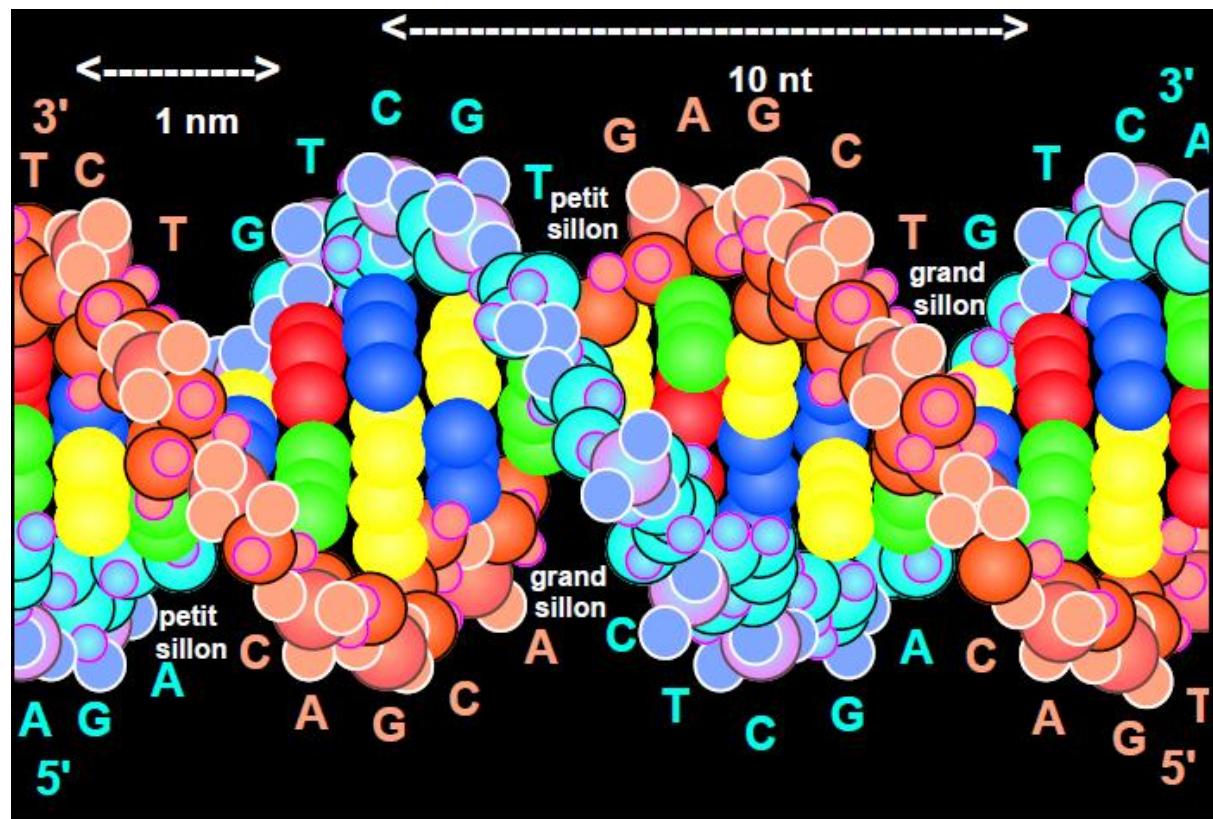
# Orientation antiparallèle des brins



# La double hélice



# La double hélice



# Stabilisation de la double hélice

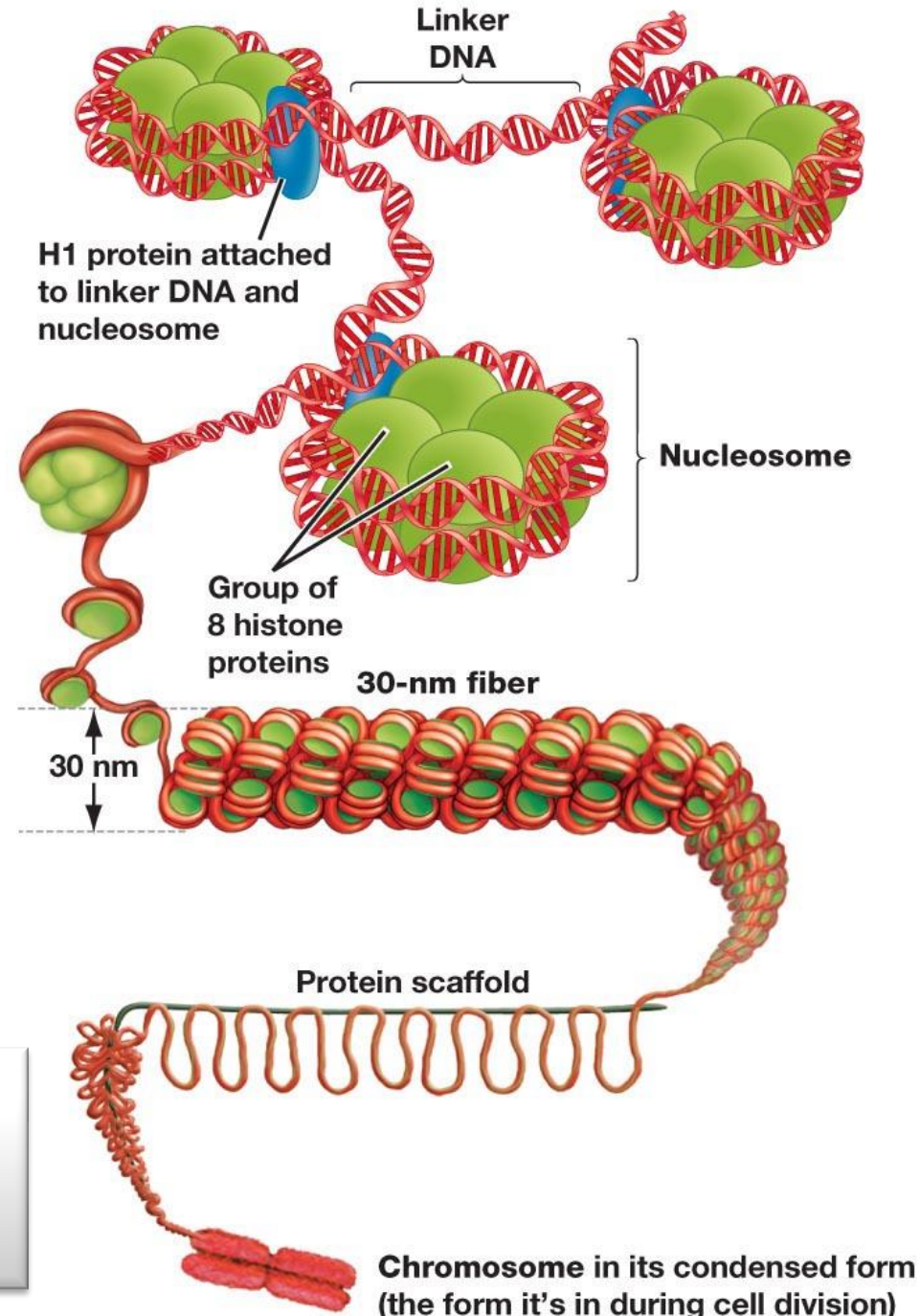
- Interactions entre les deux brins
  - Stabilisation (effet aditif sur toute la longueur)
    - Liaisons hydrogènes (A=T, G≡C)
    - Attractions hydrophobes (bases azotées)
    - Attractions Van der Waals (atomes situés à proximité)
  - Déstabilisation
    - Répulsion électrostatique des anions  $P_i$  → atténuation en présence des charges (+): cations, protéines.



# Condensation de l'ADN

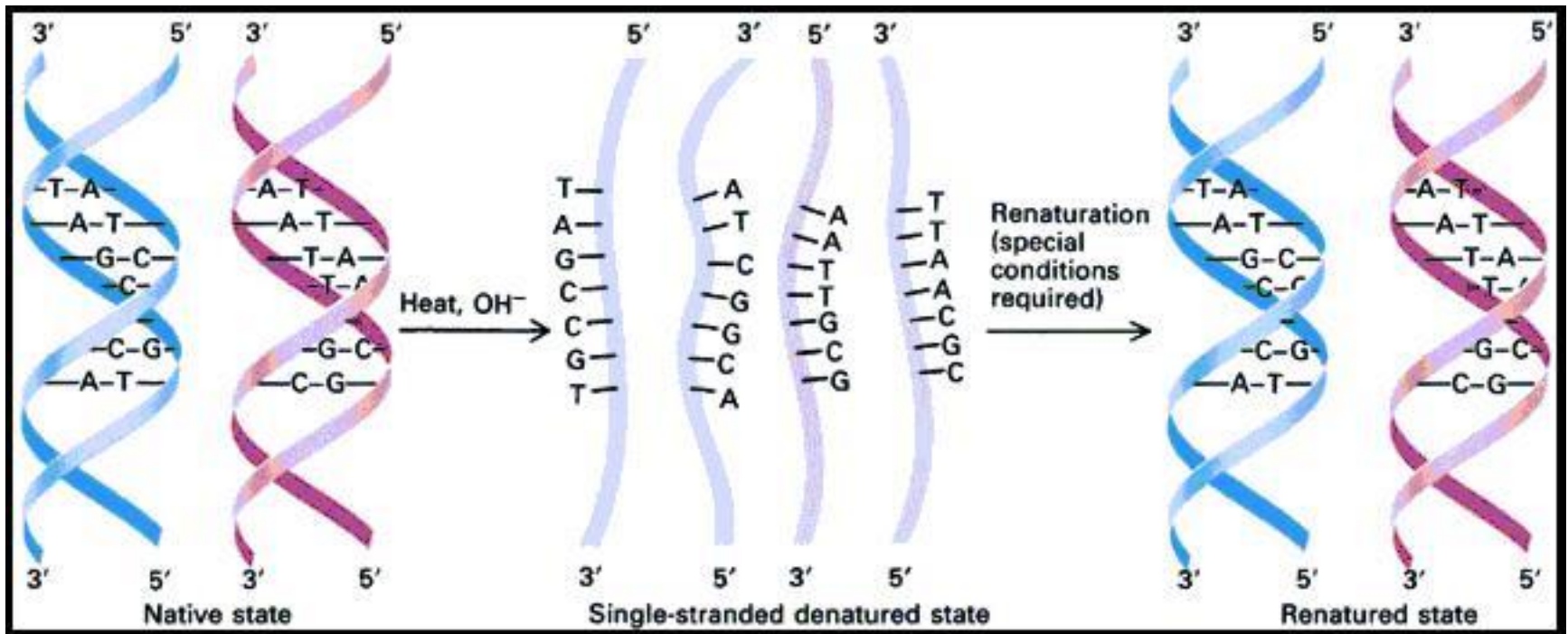
Chaque chromosome nucléaire:  
une molécule d'ADN linéaire  
double brin + protéines

(b) Nucleosome structure



# Dénaturation et renaturation de l'ADN

- **Dénaturation (fusion)**: température  $\uparrow$ , pH alcalin  $\rightarrow$  séparation des 2 brins
- **Renaturation**: température ambiante, pH neutre  $\rightarrow$  hybridation des brins complémentaires.



**Dénaturation:** dissociation des liaisons hydrogènes  
**Renaturation:** réassociation des bases azotées

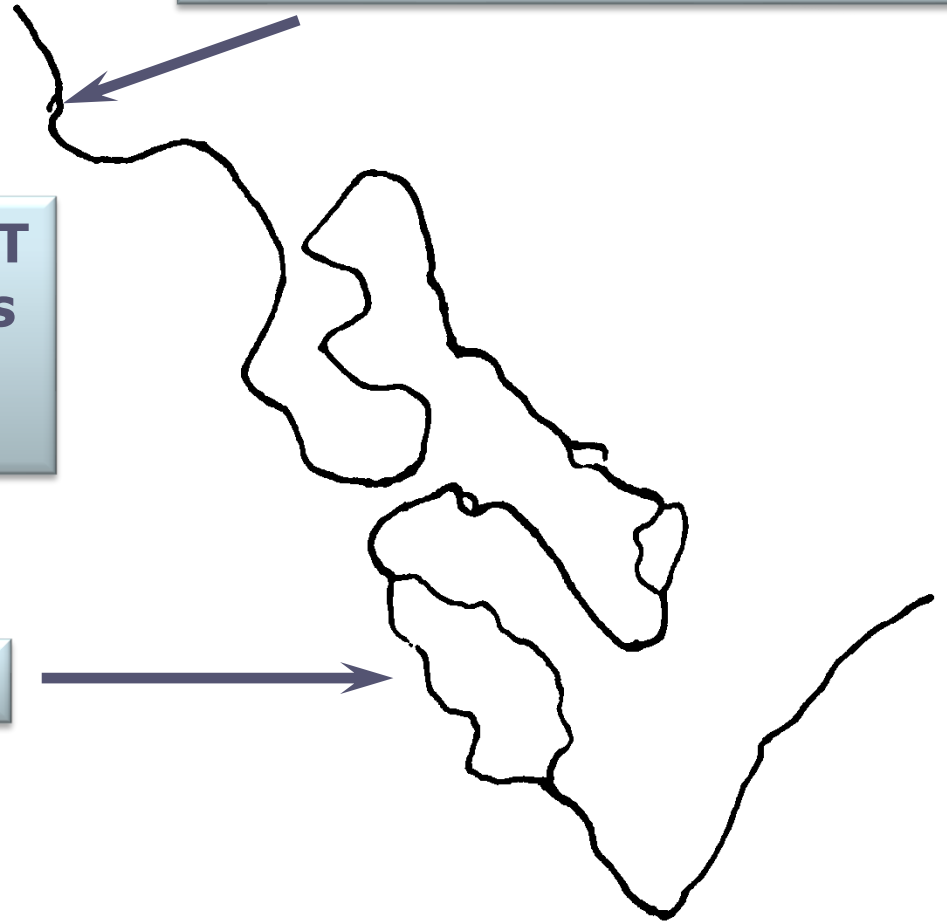
# Dénaturation de l'ADN

Séquence riche en paires G≡C

Séquences riches en paires A=T  
dénaturées en premier, suivies  
par les séquences riches en  
paires G≡C

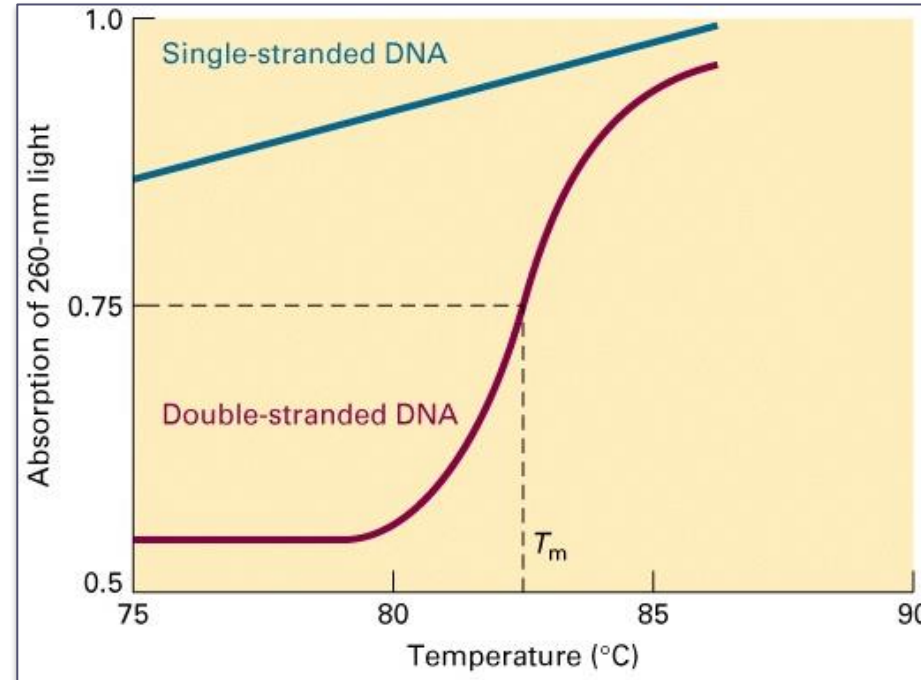
Séquence riche en paires A=T

ADN en cours de dénaturation (microscopie électronique)



# Courbe de fusion de l'ADN

- **Courbe de fusion:** variation de la  $DO_{260\text{ nm}}$  selon la température  $\rightarrow$  état de l'ADN
- **Hyperchromicité:**  $\uparrow DO_{260\text{ nm}}$   $\rightarrow$  dénaturation de l'ADN (ADN duplex  $\rightarrow$  monobrin)
- **Température de fusion ( $T_m$ ):** 50% de l'ADN est dénaturé.

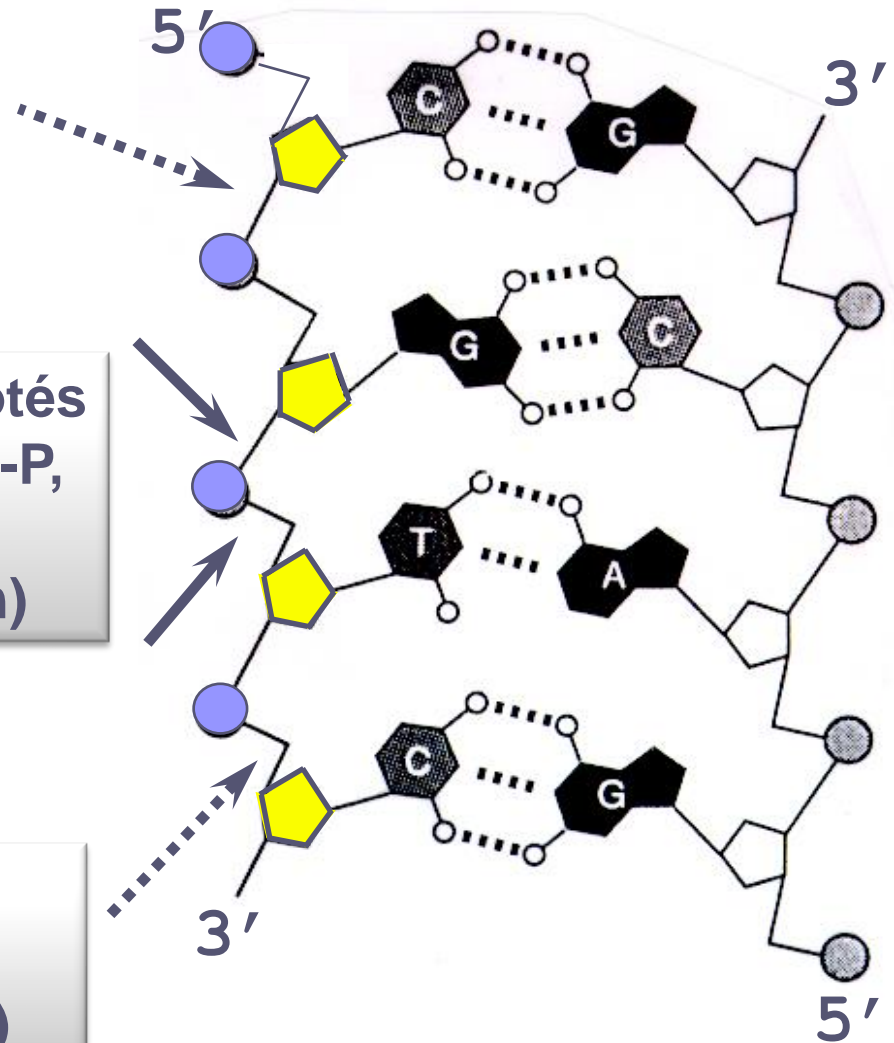


# Action des nucléases

**Nucléases:** enzymes → hydrolyse des liaisons phosphodiester

**Endonucléases:** action des 2 cotés du groupe  $\text{PO}_4$  → extrémités 5'-P, 3'-OH / 5'-OH, 3'-P (endonucléases de restriction)

**Exonucléases:** excision du dernier nucléotide (exonucléases de vérification)

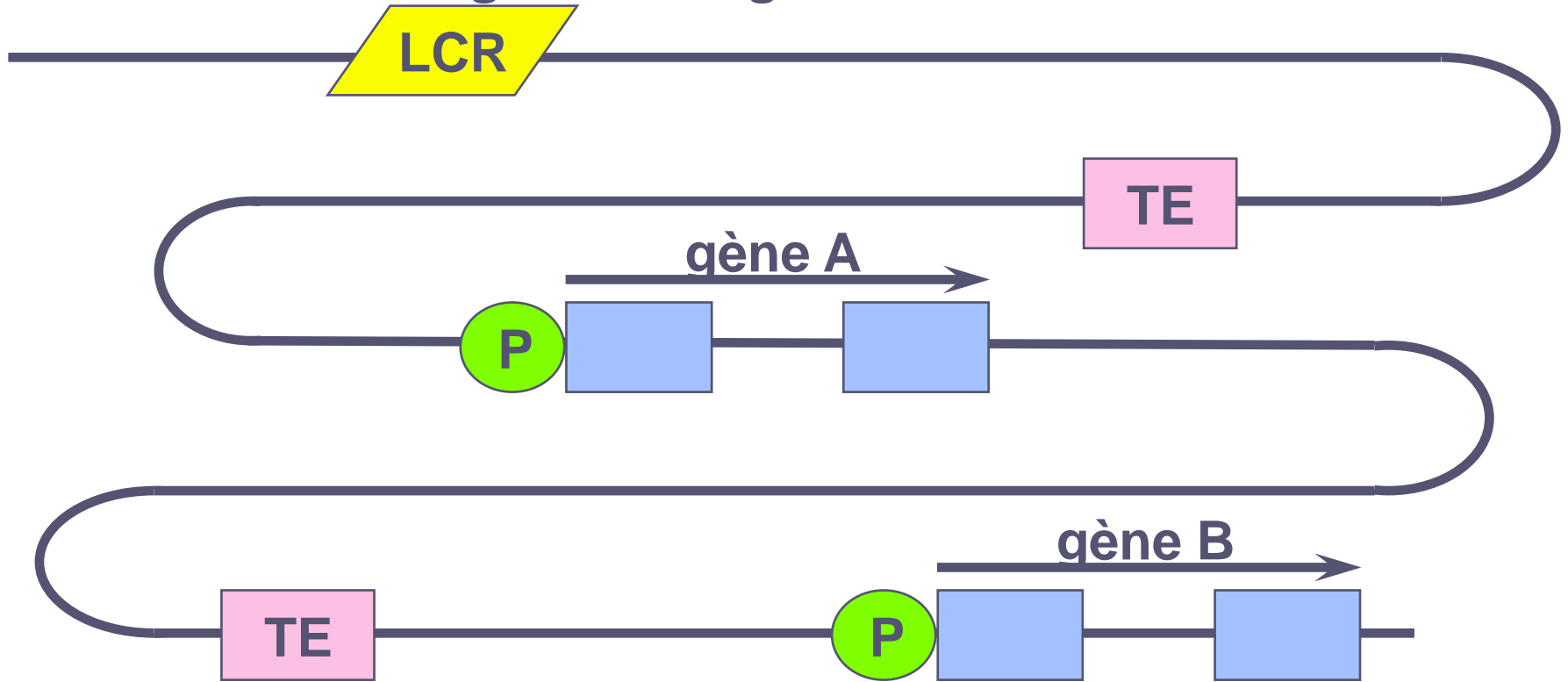


# Séquence de nucléotides

- **Information génétique**: séquence de nucléotides
- **Gènes**: segments d'ADN reconnus spécifiquement par les protéines du noyau (entrecoupés de segments inter-géniques)
- **Expression des gènes**: information génétique → protéines, ARN
- **Structure des gènes chez les eucaryotes**
  - Séquences régulatrices (amont): contrôle de l'expression du gène
  - Promoteur: séquence d'initiation de la transcription
  - Exons (séquences traduites) et introns (séquences non-traduites)
  - Signal de polyadénylation: fin de la transcription.

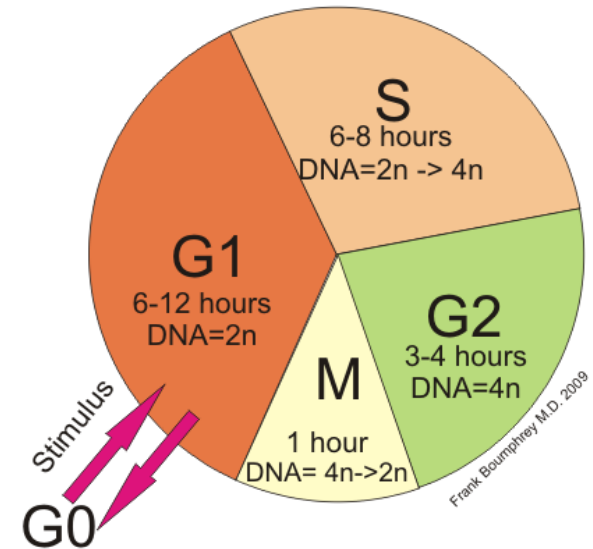
# Structure des gènes chez les eucaryotes

élément régulateur régional



# Réplication de l'ADN

- **Génome humain nucléaire**: 23 paires de chromosomes;  
1 macromolécule d'ADN / chromosome
- **Réplication**: duplication de chaque molécule d'ADN → 2 nouvelles molécules (identiques entre elles et à la molécule initiale)
  - Objectif: duplication du matériel génétique, avant la division cellulaire → génome complet des cellules filles
- **Cycle cellulaire**:  $\Delta t$  entre les divisions mitotiques
  - Réplication de l'ADN: phase S
  - ADN-polymérase: duplication du génome diploïde + réparation de l'ADN.

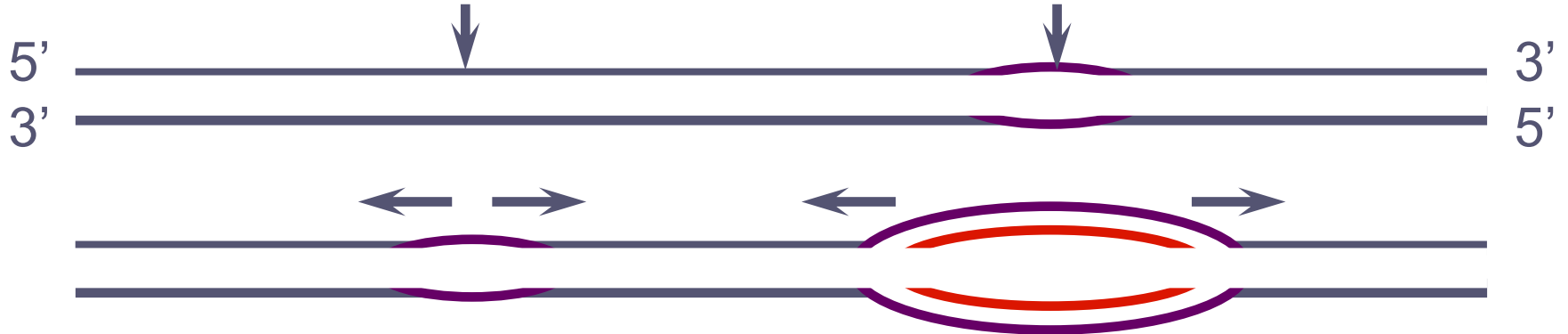


G0: Resting Phase  
G1: Growth & Metabolism  
S: DNA Replication  
G2: Growth of Structural Elements  
M: Mitosis

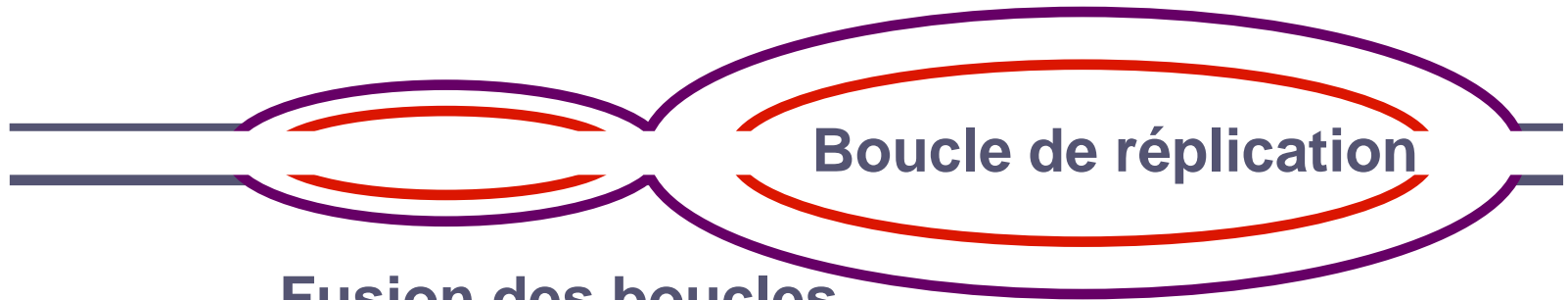


# Origine de la réplication

Points d'initiation de la réplication (toutes les  $\approx 150$  kb)



Réplication bidirectionnelle

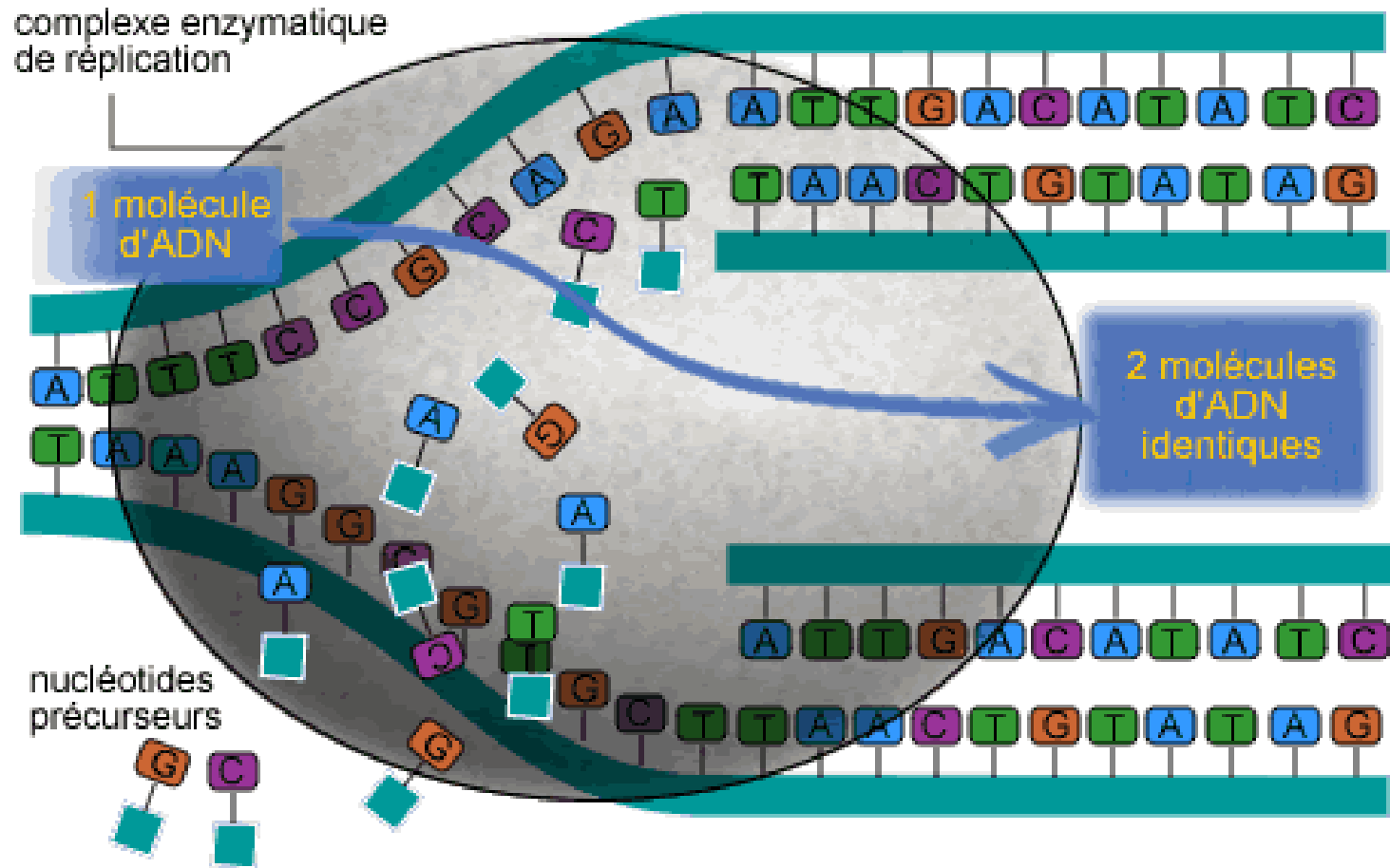


Fusion des boucles



Chromosomes fils

# Mécanisme de la réplication



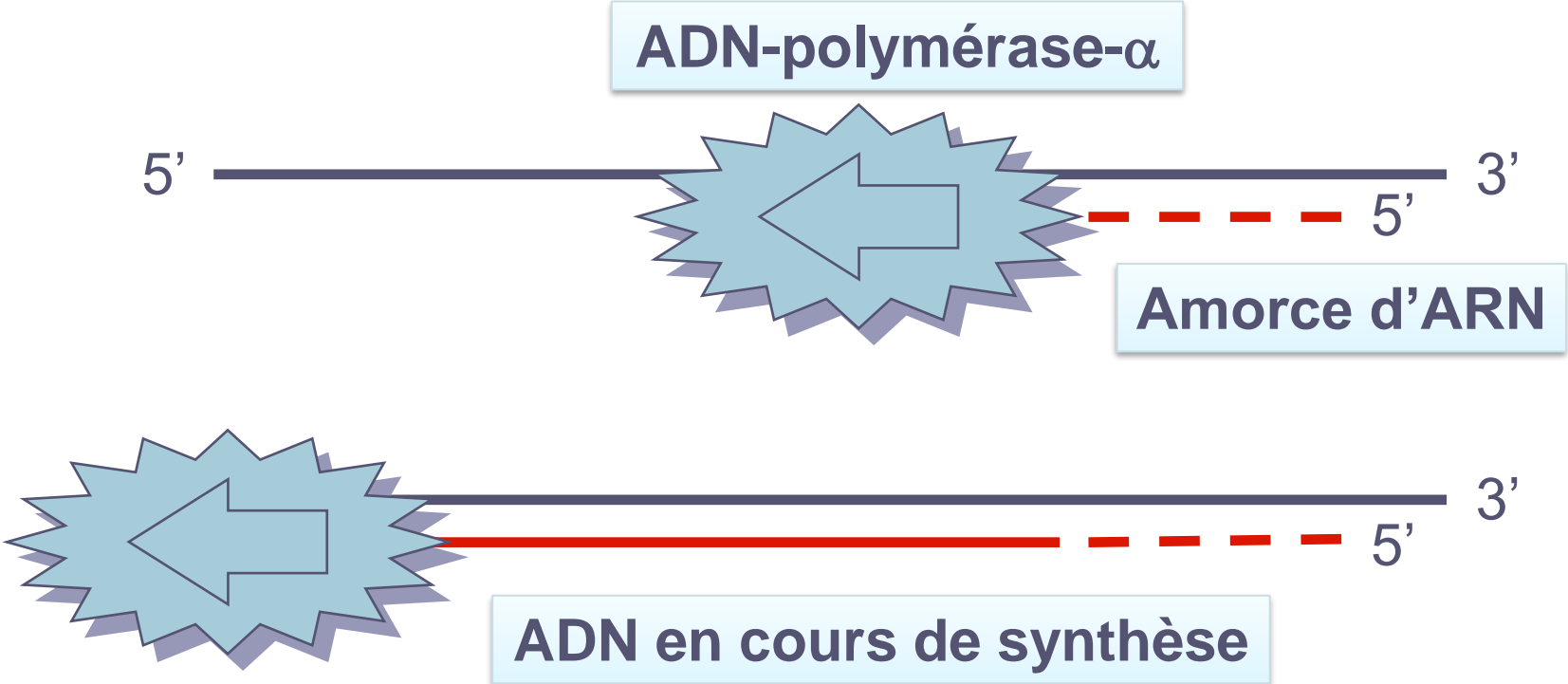
# ADN-polymérase chez les eucaryotes

- **ADN-polymérase- $\alpha$**  (noyau): initiation de la réplication; polymérase ( $5' \rightarrow 3'$ )
- **ADN-polymérase- $\beta$**  (noyau): réparation des mutations; polymérase ( $5' \rightarrow 3'$ )
- **ADN-polymérase- $\gamma$**  (mitochondries): réplication, vérification, réparation de l'ADN; polymérase ( $5' \rightarrow 3'$ ), exonucléase ( $3' \rightarrow 5'$ )
- **ADN-polymérase- $\delta$**  (noyau): élongation de l'ADN, vérification des appariements  $\pm$  excision du dernier nucléotide; polymérase ( $5' \rightarrow 3'$ ), exonucléase ( $3' \rightarrow 5'$ )
- **ADN-polymérase- $\epsilon$**  (noyau): élongation de l'ADN, vérification  $\pm$  excision du dernier nucléotide; polymérase ( $5' \rightarrow 3'$ ), exonucléase ( $3' \rightarrow 5'$ ).

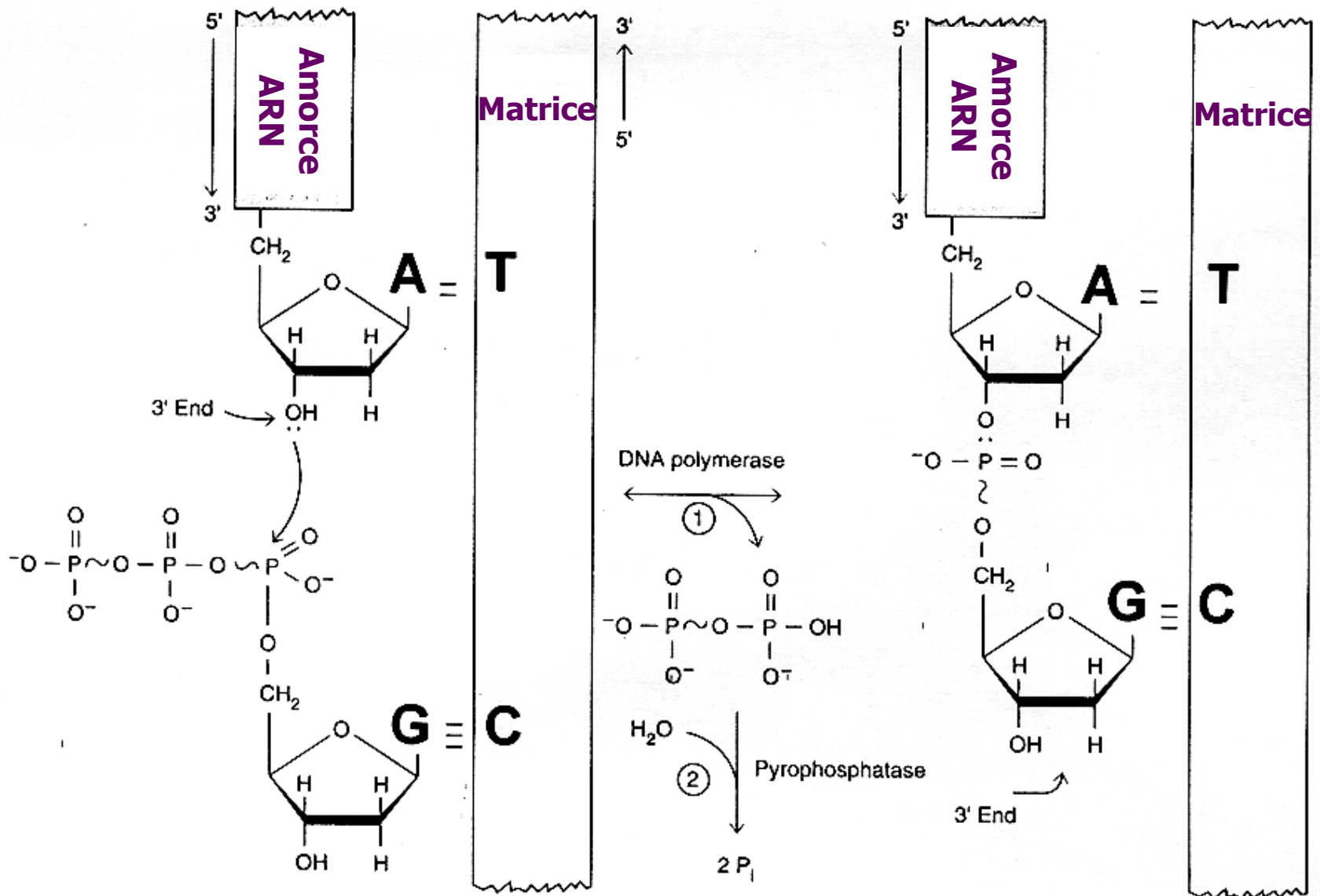
# Mécanisme de la réplication

- **Conditions requises par l'ADN-polymérase- $\alpha$** 
  - **Dénaturation locale de l'ADN**: accès à chacun des brins  $\rightarrow$  matrice pour la synthèse du brin complémentaire
  - **Substrats**: désoxyribonucléoside-triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
  - **Amorce d'ARN**: synthèse par une sous-unité de l'ADN-polymérase- $\alpha$  (primase)  $\rightarrow$  quelques dizaines de nucléotides complémentaires du brin matrice  $\rightarrow$  prolongation par l'ADN-polymérase- $\alpha$
  - **Énergie**: dNTP  $\rightarrow$  dNMP + PP<sub>i</sub>
  - **Direction de synthèse**: 5'  $\rightarrow$  3'
- **ADN-polymérase- $\delta$  et  $\epsilon$** : élongation des brins en cours de synthèse, vérification  $\pm$  hydrolyse de la dernière liaison phosphodiester (mésappariements)
- **ADN-polymérase- $\beta$** : réparation des mutations
- **RNA-se H**: hydrolyse des amorces d'ARN
- **ADN-polymérase- $\delta$** : ajout des dNTP à la place des amorces.

# Action de l'ADN-polymérase alpha



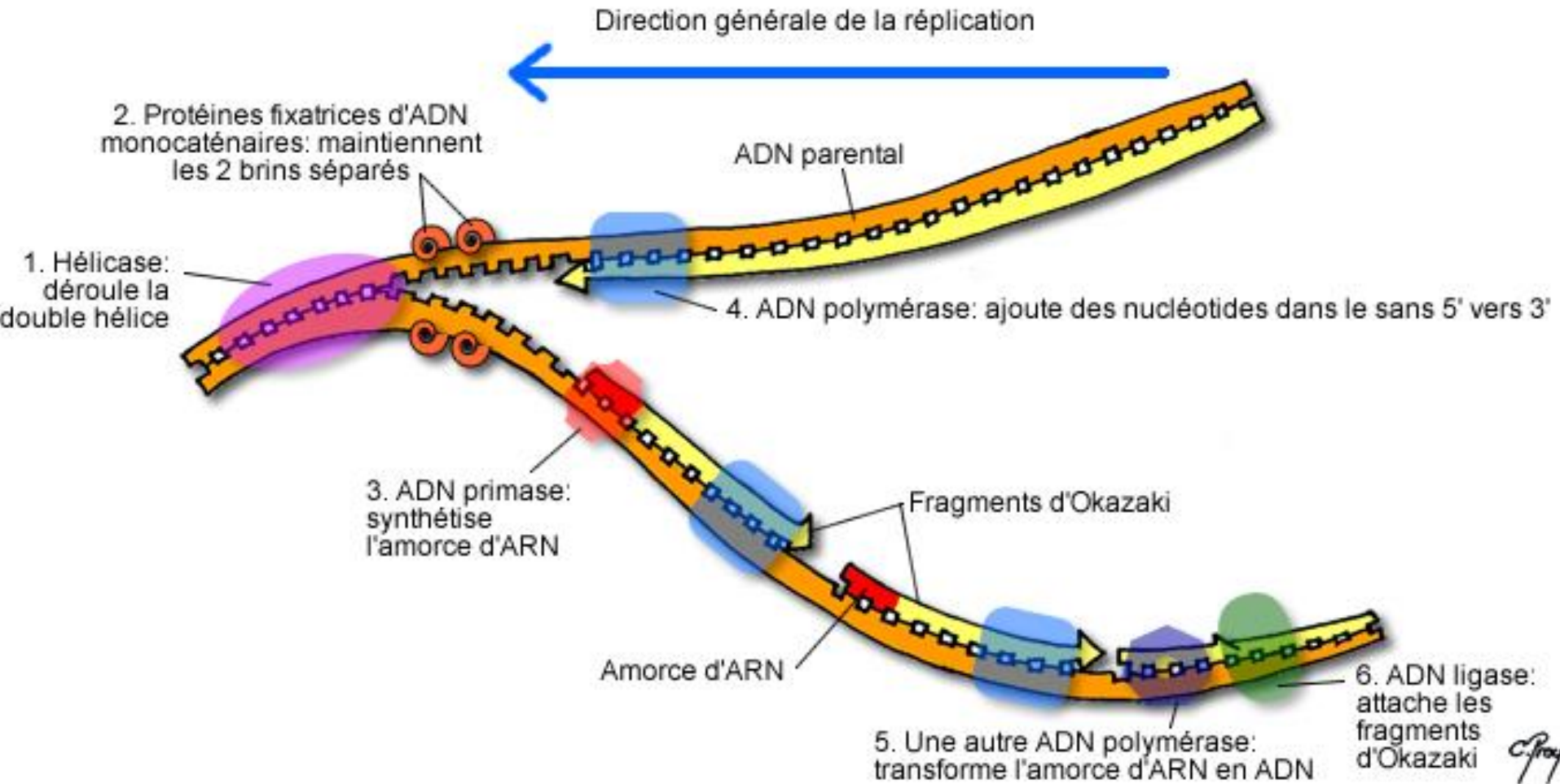
# Réaction de l'ADN-polymérase



# Particularités de la réplication

- **Protéines actives aux points d'initiation**
  - **ADN-hélicase**: dénaturation locale de l'ADN → déplacement dans la direction de la réplication (ATP → énergie)
  - **Protéines de liaison à l'ADN monobrin (SSB)**: stabilisation des brins → prévention de leur réassociation
  - **ADN-topoisomérases**: coupure (nucléases) + raccordement (ligases) des brins → élimination des forces de tension
    - **Inhibiteurs**: médicaments cytostatiques (topoisomérases humaines) et antibiotiques (topoisomérases bactériennes)
- **Réplication semi-conservative**
  - 2 molécules filles: 1 brin parental (matrice) + 1 brin nouveau
  - Synthèse du brin nouveau: principe de la complémentarité des bases → vérification de chaque nucléotide (complémentarité) → nouvelle liaison phosphodiester.

# Fourche de réplication





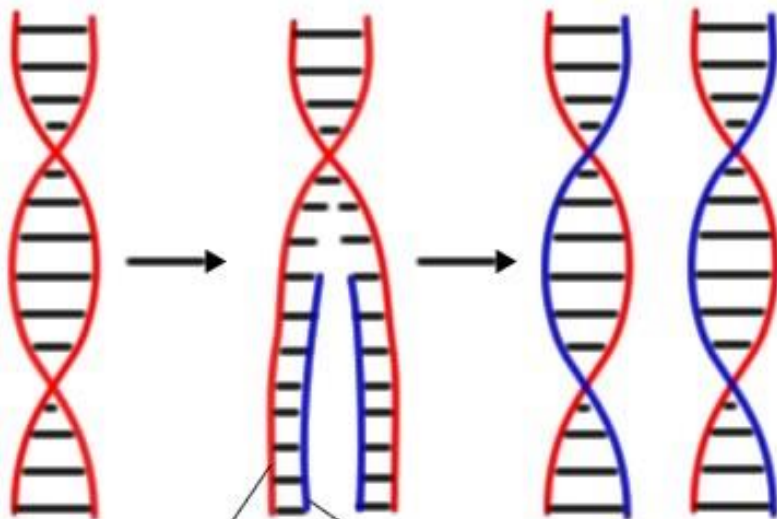
# Réplication semi-conservative

ADN parental double brin



Chaque brin de l'ADN parental sert de matrice

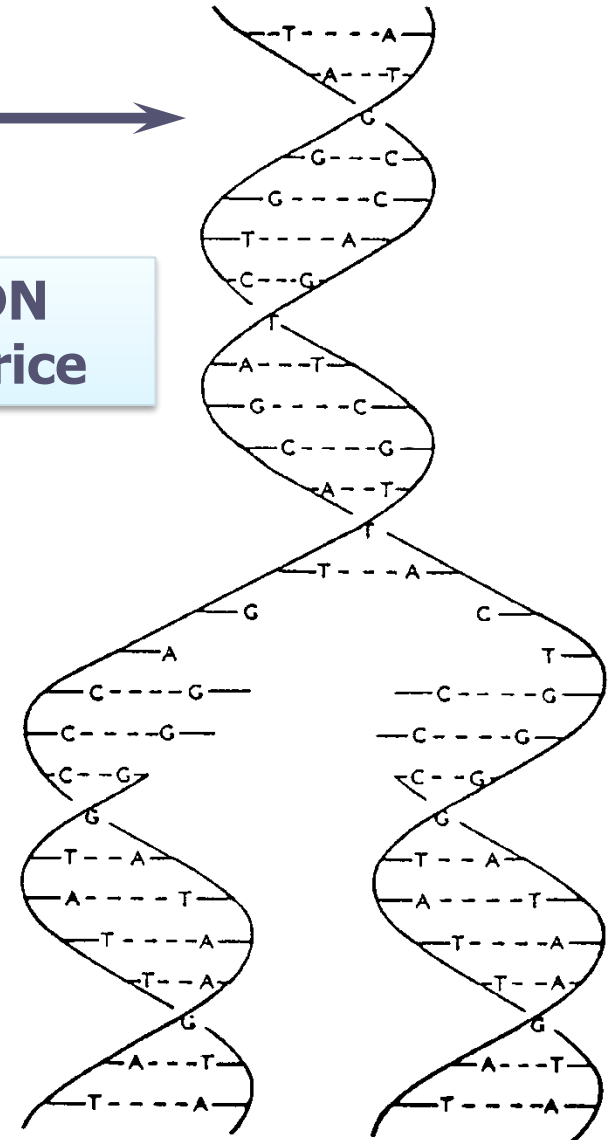
ADN issu de la réplication  
1 brin nouveau + 1 brin ancien



Ancien brin

Nouveau brin

9/4



# Fourche de réplication

- **Synthèse des brins nouveaux**: direction 5'→3'
- **Avancement de la réplication** → ADN duplex (non-répliqué)
- **Brin avancé**: synthèse continue de la chaîne (ADN-polymérase- $\epsilon$ )
- **Brin retardé**: synthèse discontinue
  - **ADN-polymérase- $\alpha$** : synthèse des amorces + début des fragments Okazaki ( $\approx 1000$  nucléotides chacun), sens 5'→3'
  - **ADN-polymérase  $\delta$** : prolongation des fragments Okazaki, ajout des dNTP à la place des amorces
  - **RNA-se H**: hydrolyse des amorces
  - **ADN-ligase**: raccordement des fragments Okazaki → liaison phosphodiester entre les nucléotides adjacents (brin matrice intact, ATP).

# Fourche de réplication

Amorce d'ARN



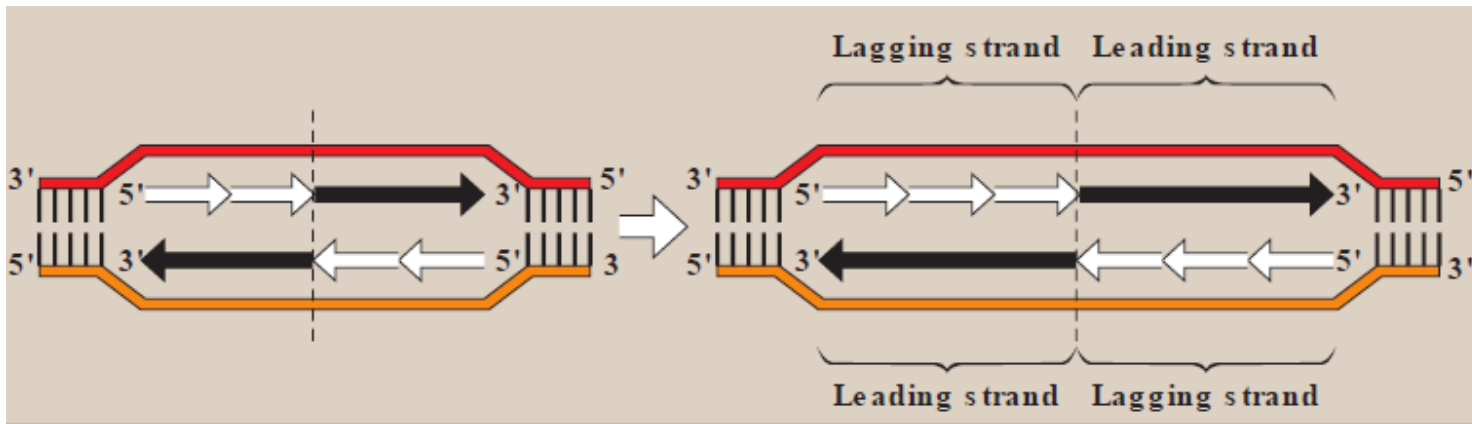
Direction de synthèse du brin avancé

5'  
3'

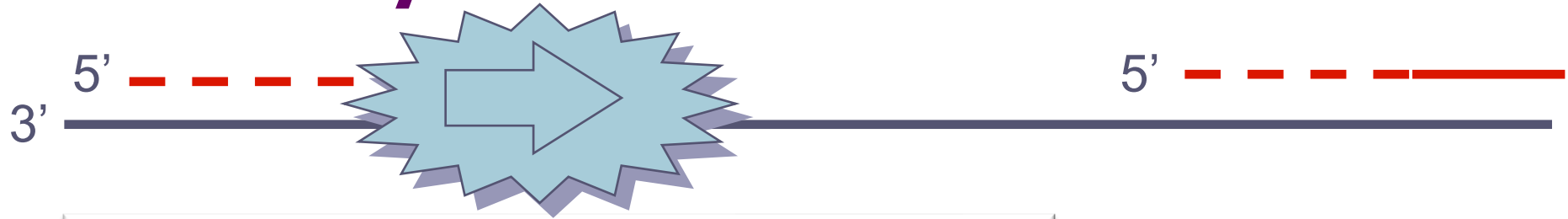
Fourche de réplication

Direction de synthèse du brin retardé

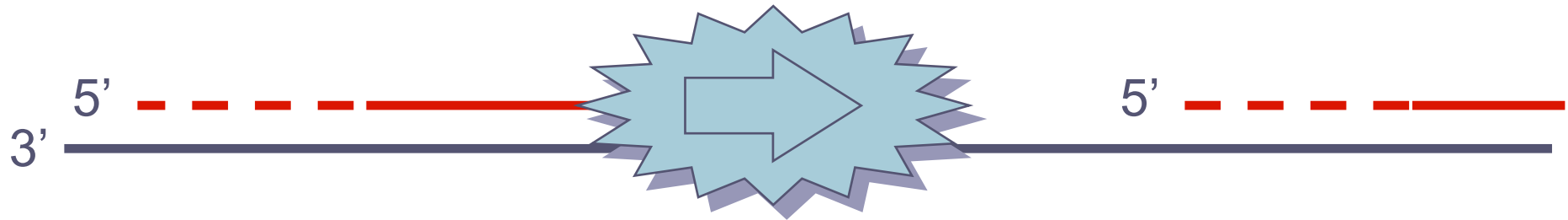
3'  
5'  
3'  
5'



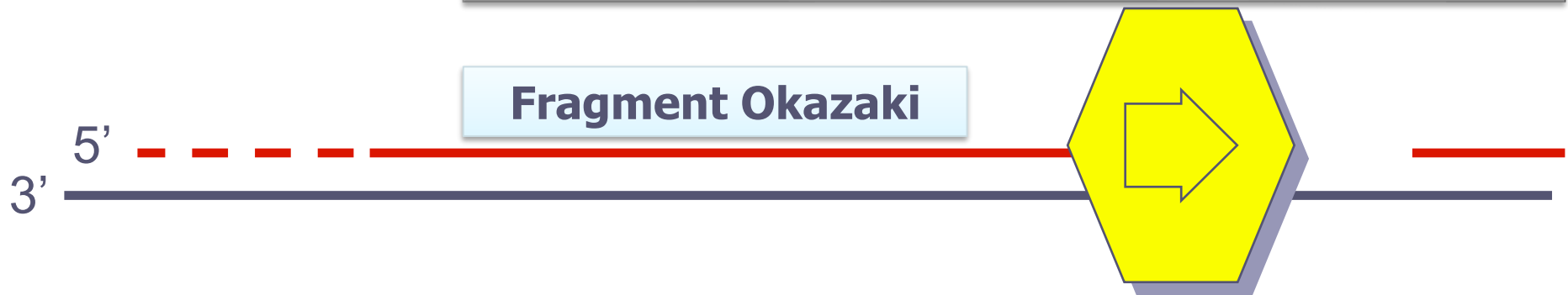
# Synthèse du brin retardé



**ADN-polymérase- $\alpha$ : synthèse de l'amorce**



**ADN-polymérase- $\alpha$ : prolongation de l'amorce**



**Fragment Okazaki**

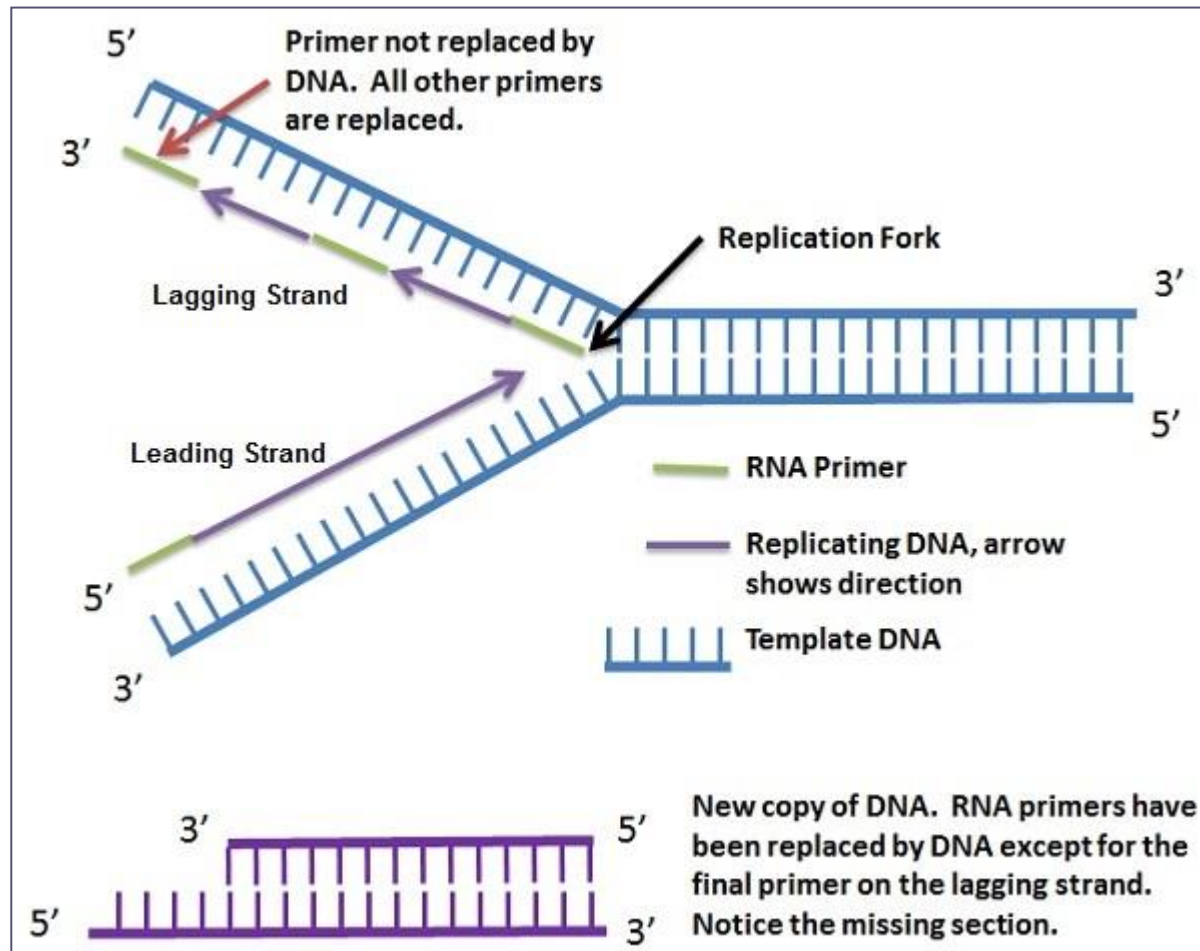
**ADN-polymérase- $\delta$ : synthèse et prolongation des fragments Okazaki (après hydrolyse des amorces)**

# Action de l'ADN ligase



# Action de la télomérase

- **Erosion des télomères**: raccourcissement des chromosomes après chaque division → perte de matériel génétique → vieillissement cellulaire
- **Hydrolyse de la dernière amorce** (extrémité du brin retardé) → impossibilité de synthèse de l'ADN complémentaire.



# Action de la télomérase

- **Télomérase: protection des télomères** (cellules-souche, cellules germinales, tumorales)
- **Reverse-transcriptase** (ARN propre): synthèse de l'ADN complémentaire (extrémité du brin non-répliqué) → primase (amorce), ADN-polymérase- $\alpha$  (prolongation de l'amorce) → synthèse complète du brin complémentaire.

