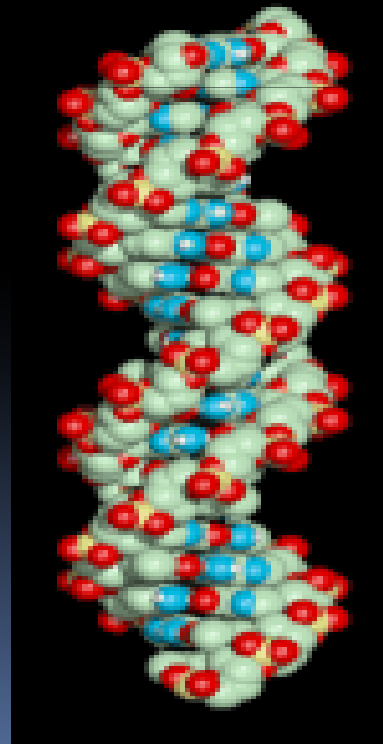


UNIVERSITE MOHAMMED V-AGDAL  
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
Filière Sciences de la Vie (SVI)  
Module de Biochimie (M 11)  
Elément : Biochimie structurale  
- Semestre 3 -  
2008-2009

## Cours des Acides Nucléiques

Pr. BELLAOUI Hicham



# Plan séance 3 et 4

## III- Structure des acides nucléiques:

### 1. L'ADN

- a . Structure primaire et polymérisation des nucléotides
- b. Structure secondaire
  - . La double hélice: modèle de Watson et Crick
  - . Principales caractéristiques des chaînes d'ADN
  - . Les variants conformationnels de la double hélice
- c . Structure tertiaire de l'ADN

## IV- Caractéristiques physicochimiques et fonctionnelles de l'ADN

### 1. Propriétés physicochimiques de l'ADN

- a- Nature fibreuse et taille
- b- Dénaturation et renaturation thermique
- c- Densité, charge et propriétés spectrales

### 2. Méthodes d'études des ADN

- a- Purification et extraction de l'ADN
- b- Hydrolyse chimique et enzymatique
- c- Action d'autres enzymes
- d- Techniques d'analyses de l'ADN: Southern blot, PCR et séquençage

### 3. Conservation de l'information génétique: Réplication semi-conservative de l'ADN

# ACIDES NUCLEIQUES

## STRUCTURE PRIMAIRE DE L'ADN

### Taille des ADN

virus : phage I : 48 kb soit  $32 \cdot 10^6$  Da soit 17  $\mu\text{m}$

bactérie : E.coli : 4000 kb soit  $2600 \cdot 10^6$  Da soit 1,36 mm

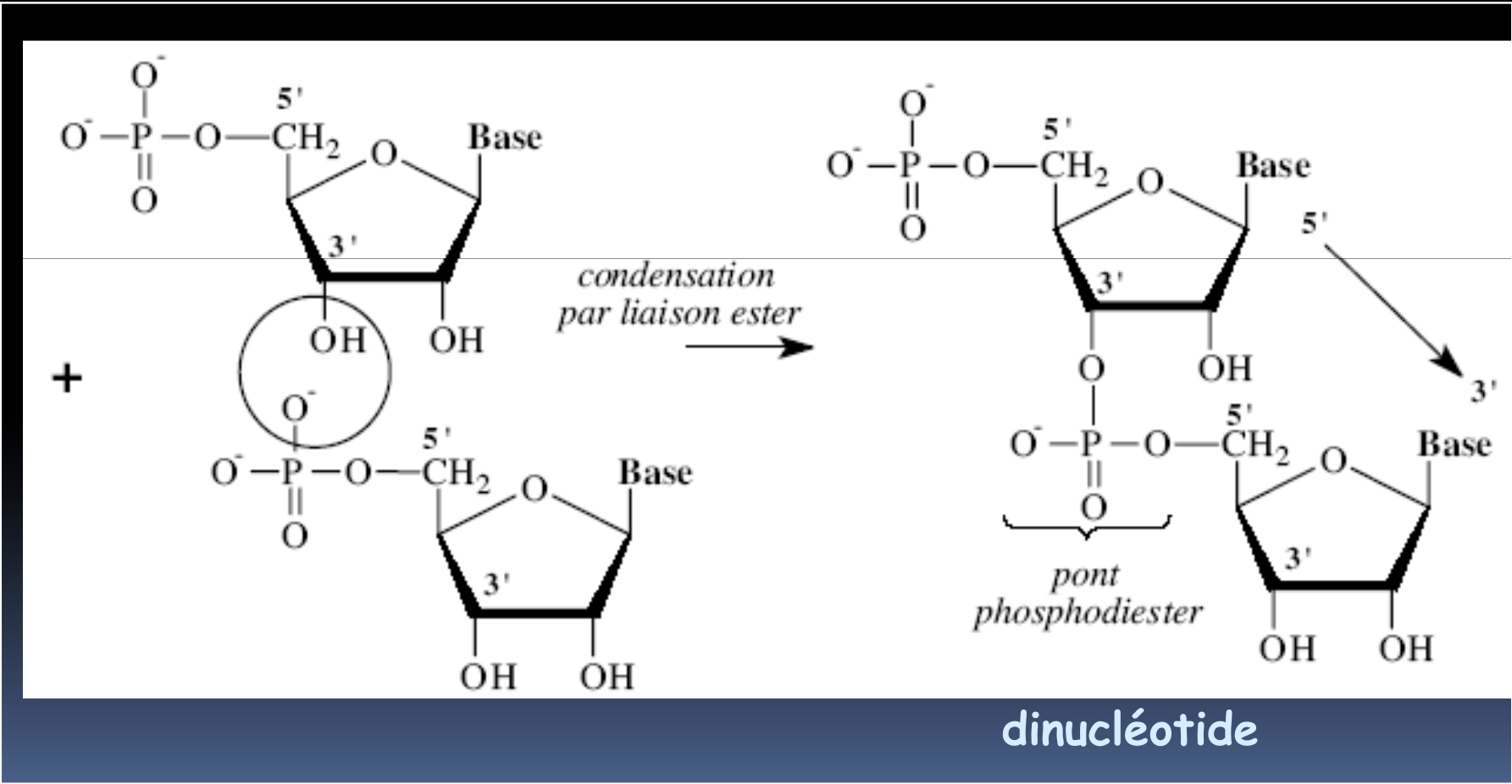
### La règle de Chargaff (1940)

- $(A + G) = (C + T)$  ou  $(A+G) / (C+T) = 1$
- $A/T = 1$
- $G/C = 1$
- $(A+T)/(C+G)$  varie beaucoup : il est caractéristique de l'espèce. Ce coefficient est appelé **coefficient de Chargaff**

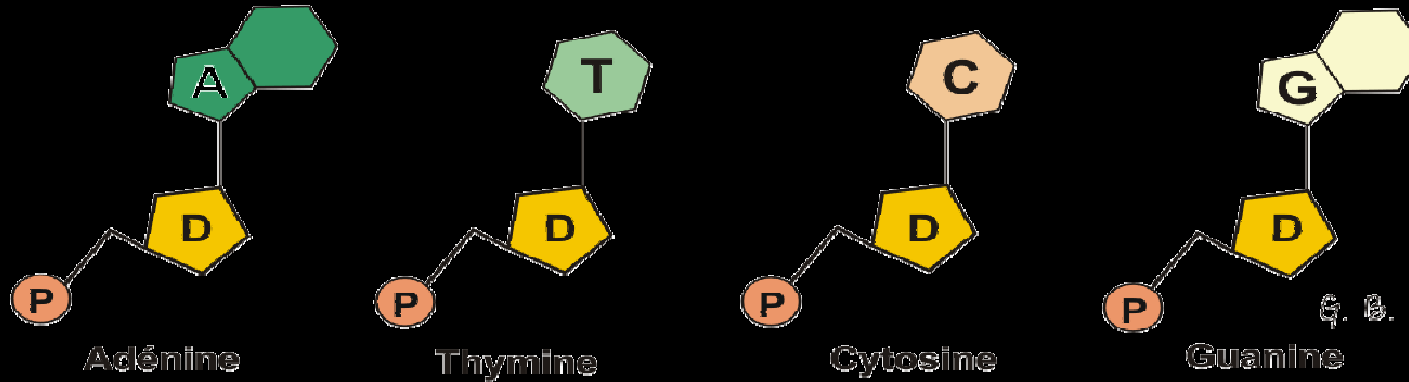
Origine de l'ADN	Bases azotées						A/T	G/C	$\frac{A + T}{G + C}$
	A	G	C	T	5 methyl-C				
Thymus bovin	28,2	21,5	21,2	27,8	1,3	1,01	0,96	1,3	
Rate bovine	27,9	22,7	20,8	27,3	1,3	1,02	1,02	1,25	
Sperme bovin	28,7	22,2	20,7	27,2	1,3	1,05	1,01	1,26	

# Structure primaire des Acides Nucléiques

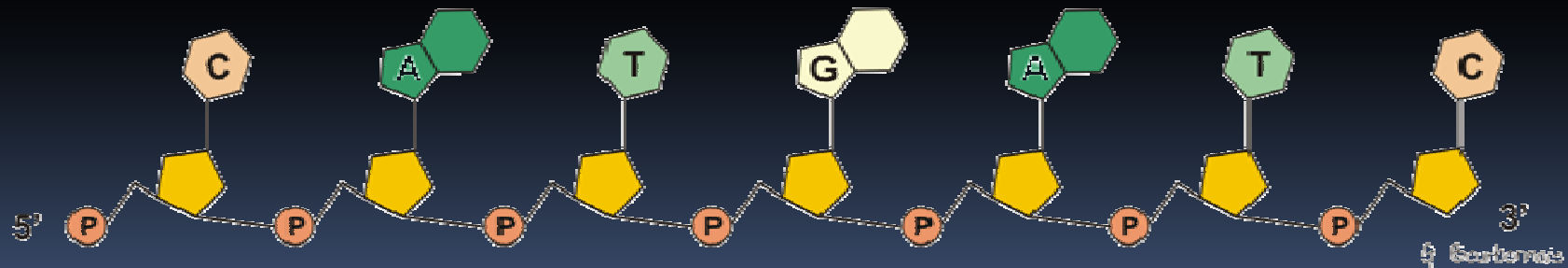
## La liaison Phosphodiester



# Structure primaire des Acides Nucléiques



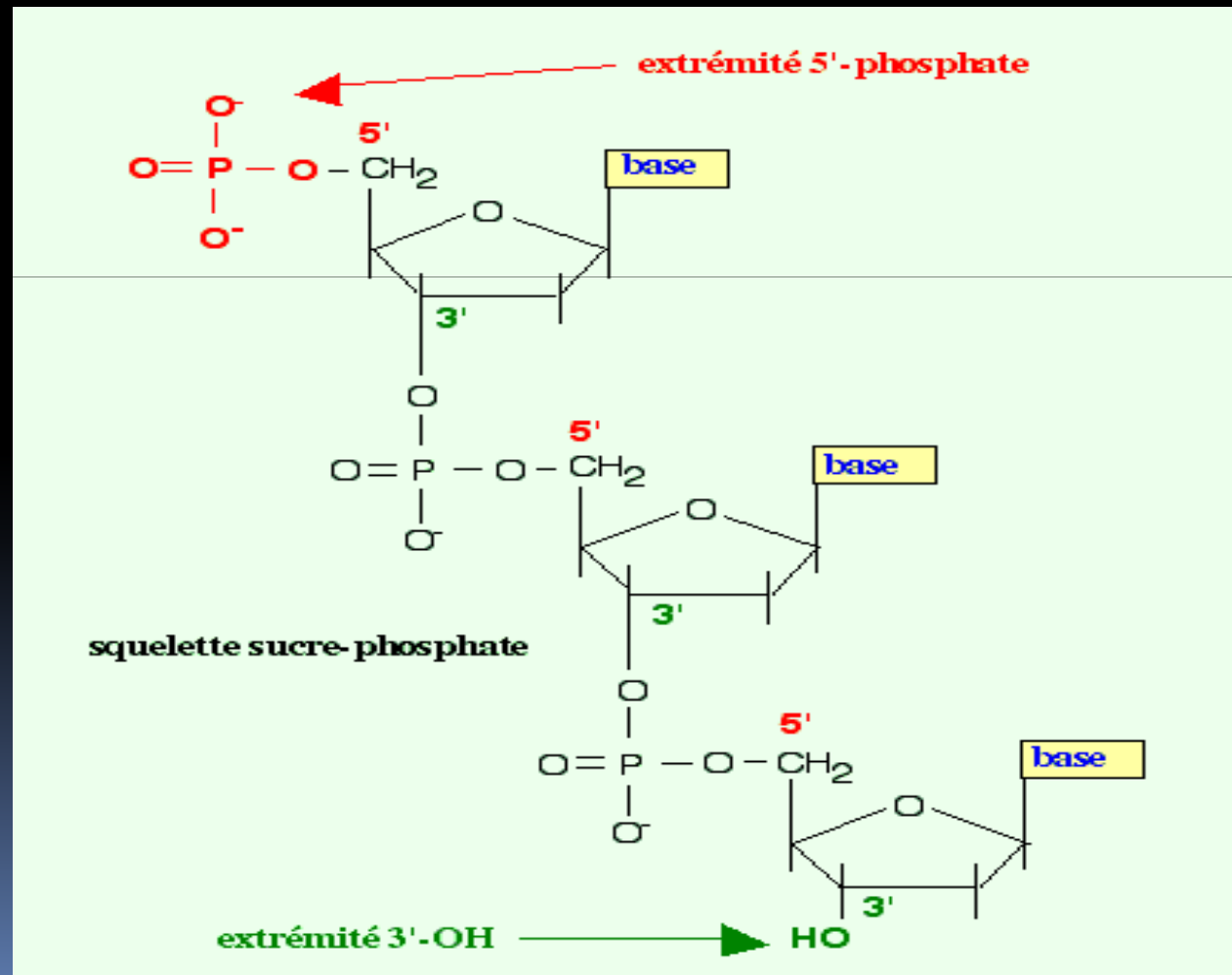
Les nucléotides peuvent se lier les uns aux autres par leur sucre (désoxyribose) et leur groupement phosphate.



# Structure primaire des Acides Nucléiques

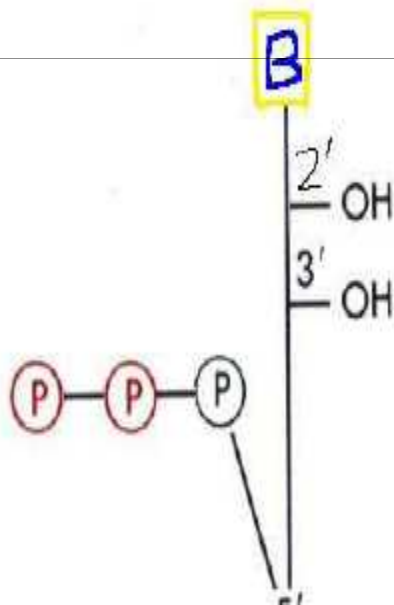
## Polymérisation des Acides nucléiques

### Enchaînement des nucléotides



# Structure primaire des Acides Nucléiques

## Représentation schématique d'un nucléotide

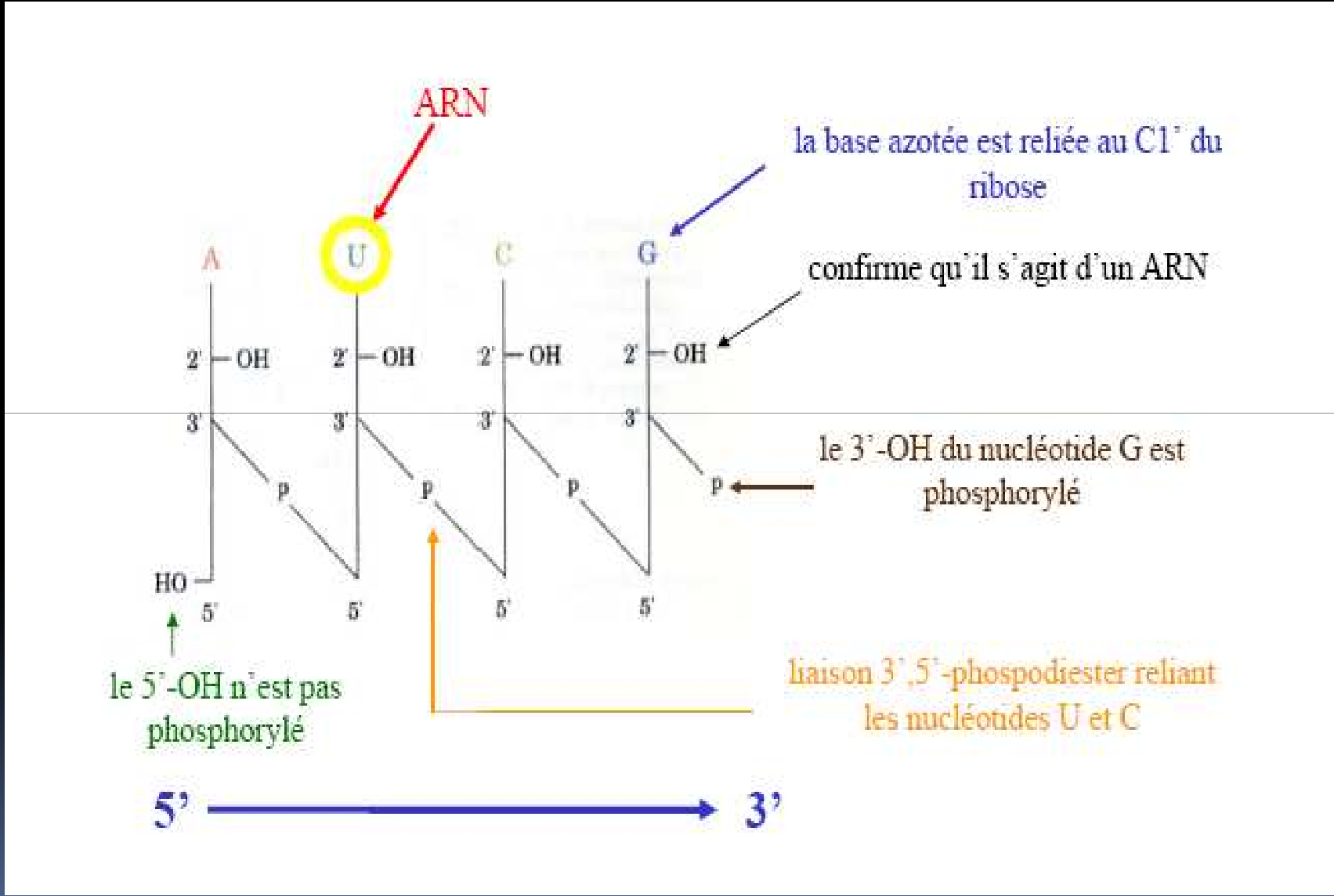


Le sucre est un trait vertical du C1' (haut)  
vers C5' (bas)

La base est notée par son symbole (liée à C1')

Dans le cas d'un déoxy(ribo)nucléotide, le  
OH lié à C2' est omis et U est remplacé par T

# Structure primaire des Acides Nucléiques

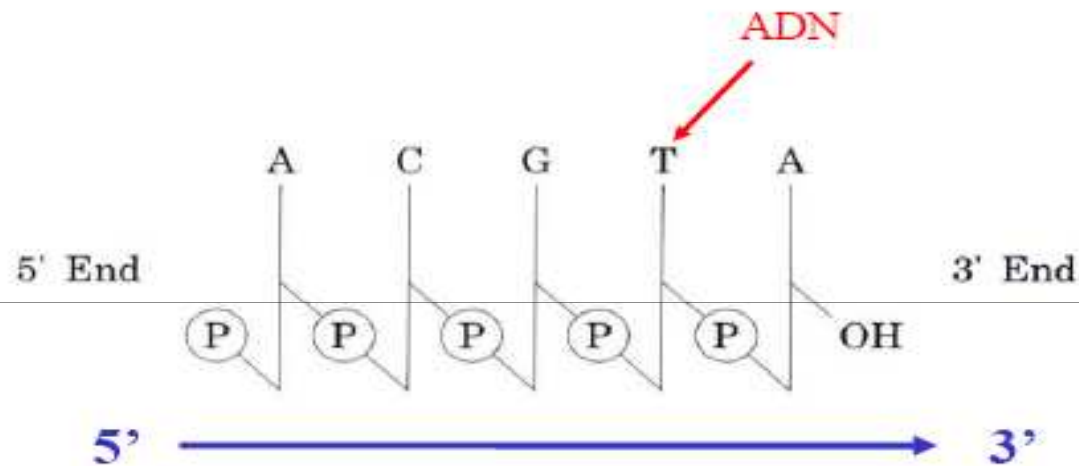




# Structure primaire des Acides Nucléiques

Trois représentations équivalentes d'un oligonucléotide

1



2

pApCpGpTpA

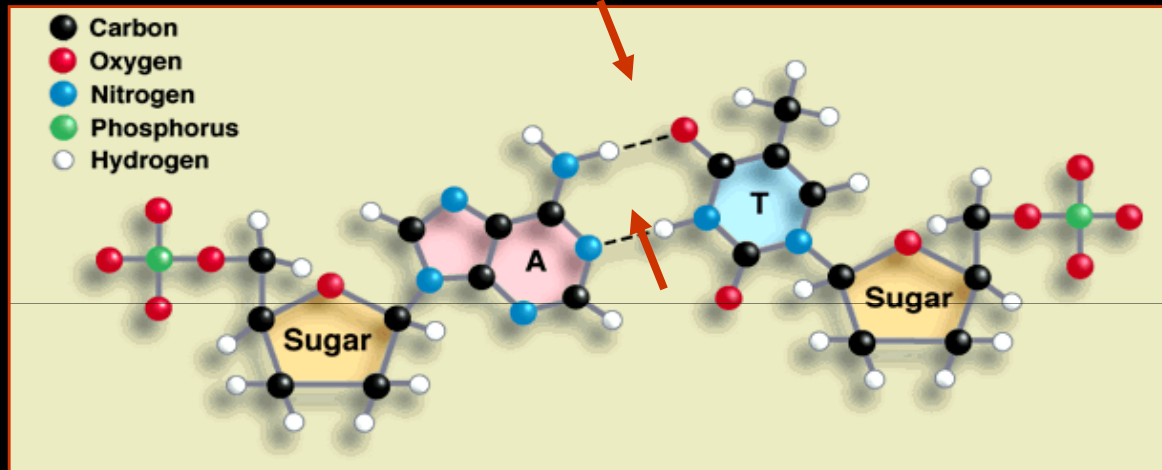
3

ACGTA

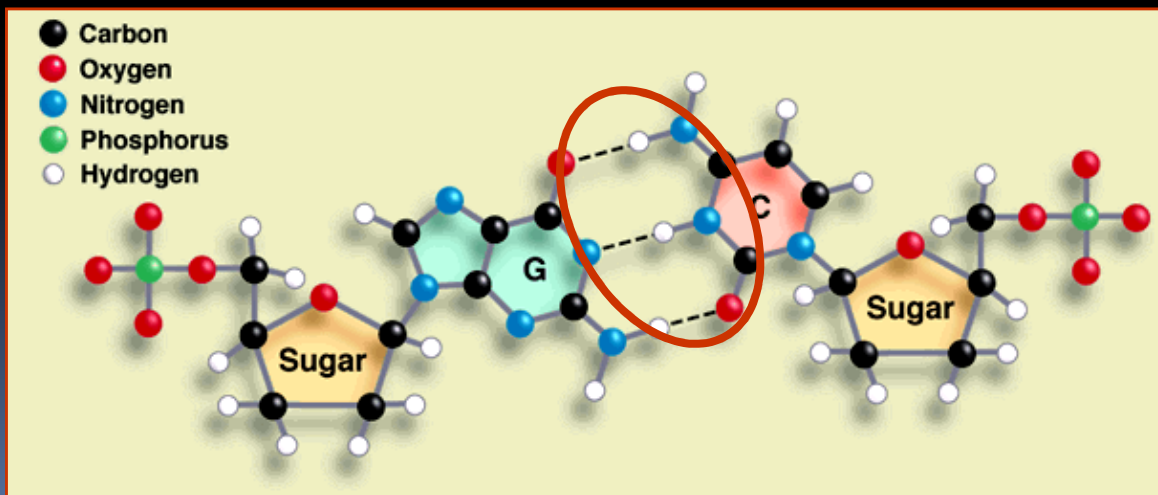
# Structure Secondaire de l'ADN

Appariements spécifiques des bases

A s'apparie avec T et C avec G:



A avec T : deux liaisons hydrogène (liaisons faibles)

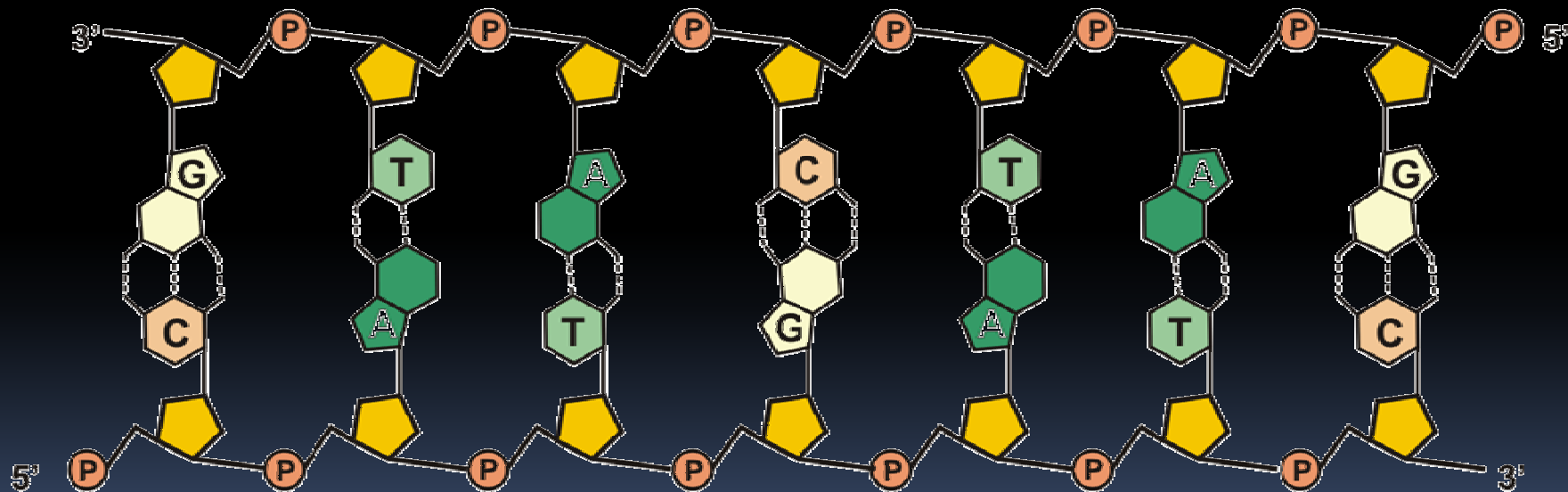


C avec G : trois liaisons hydrogène

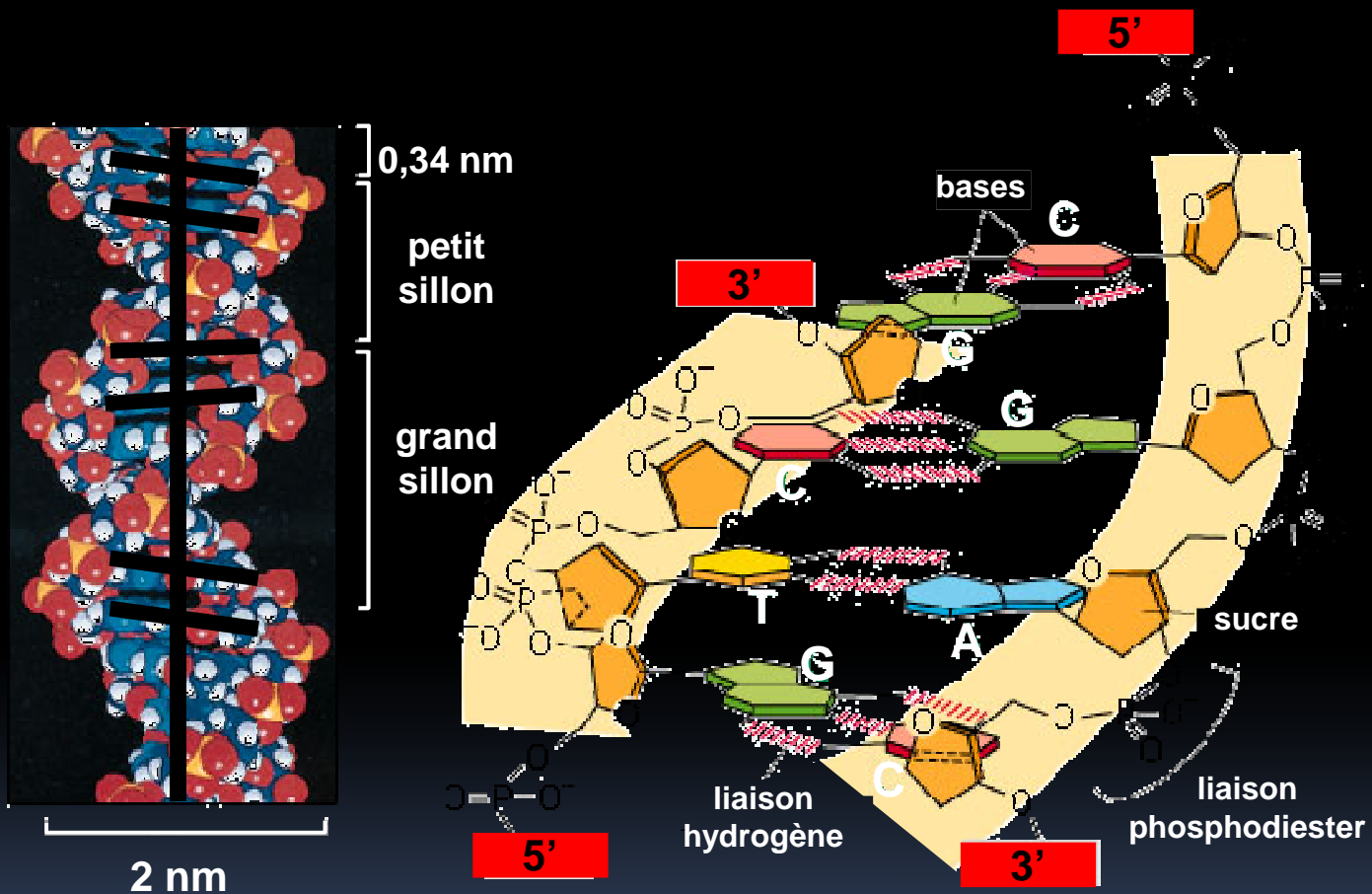
# Structure Secondaire de l'ADN

Deux chaînes de nucléotides peuvent s'unir l'une à l'autre si leurs bases sont complémentaires

(A face à T et C face à G)



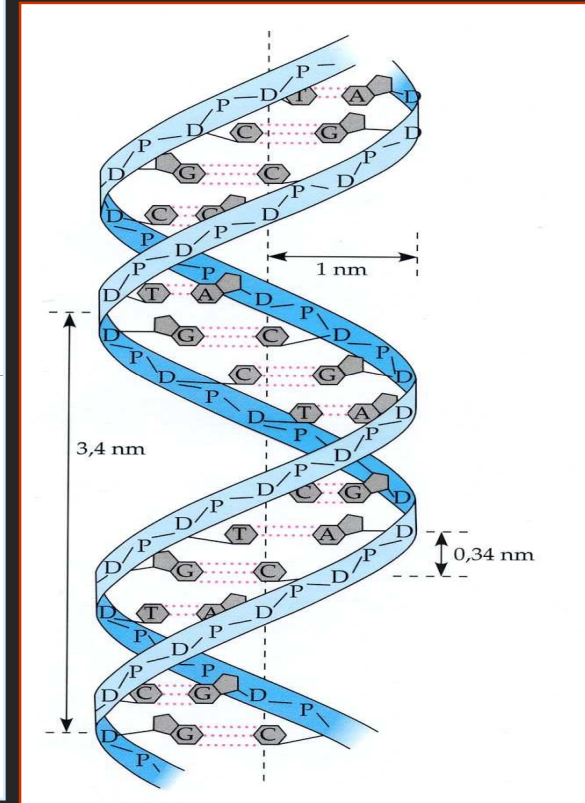
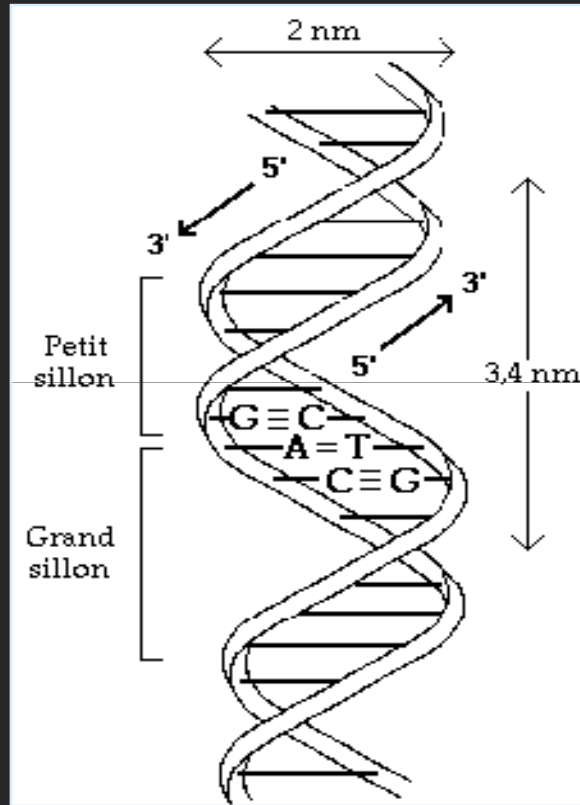
# Structure Secondaire de l'ADN



# Structure Secondaire de l'ADN

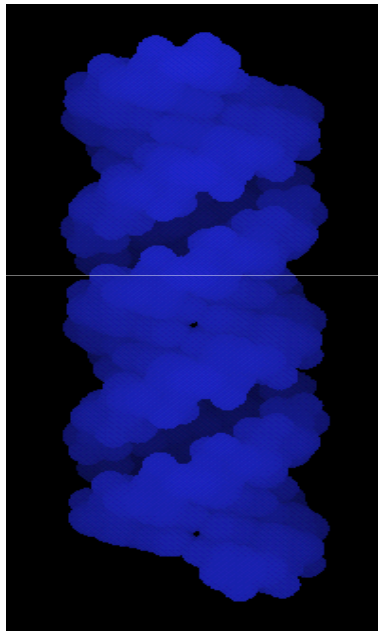
## Modèle de Watson et Crick (Proposé en 1953.)

- Les bases s'apparient par 2 pour former des paires de bases. Elles sont liées l'une à l'autre par des liaisons H.
- Les 2 chaînes sont **antiparallèles** : orientées en **sens inverse**
- le pas de l'hélice = distance pour un tour de spire = **3,4 nm**
- Il y a donc 10 paires de base en moyenne par tour de spire.
- Le diamètre de l'hélice et de **2nm**
- Le squelette central est **hydrophobe**; l'extérieur est **hydrophile**

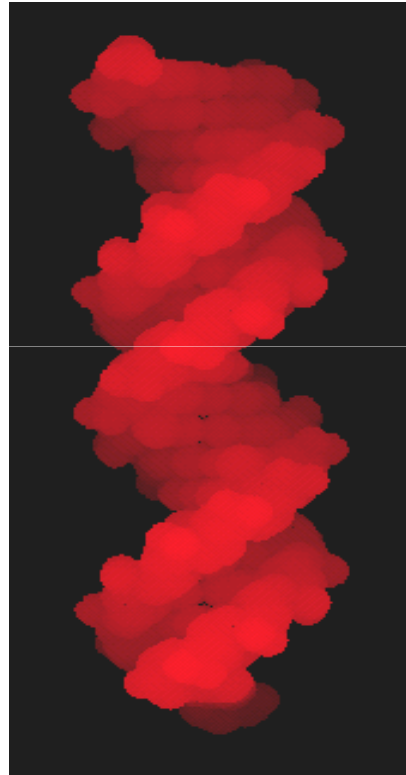


# Structure Secondaire de l'ADN

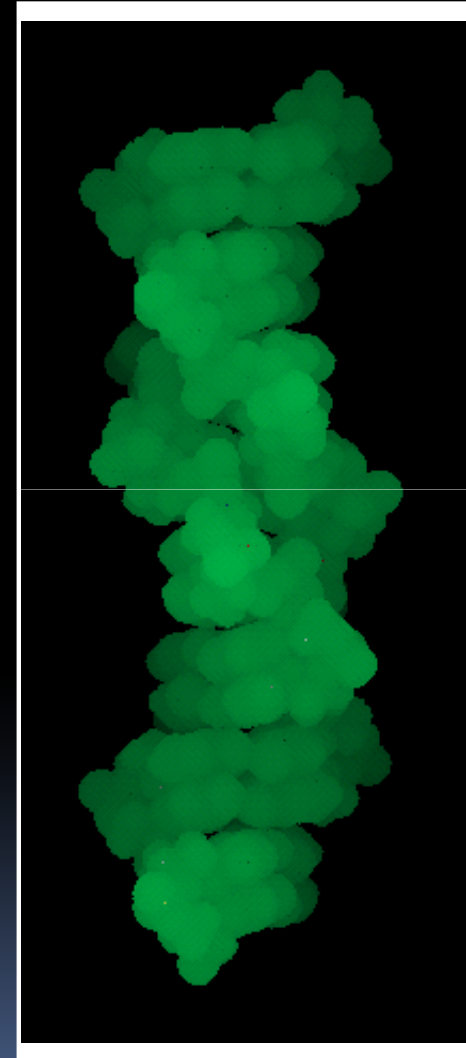
ADN-A



ADN-B



ADN-Z



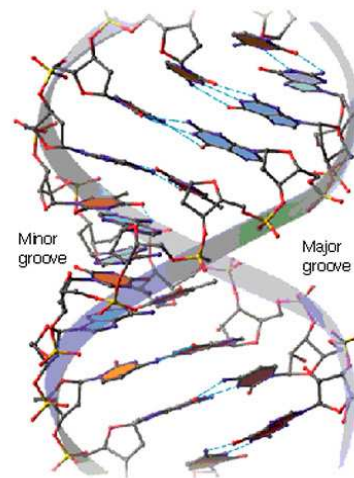
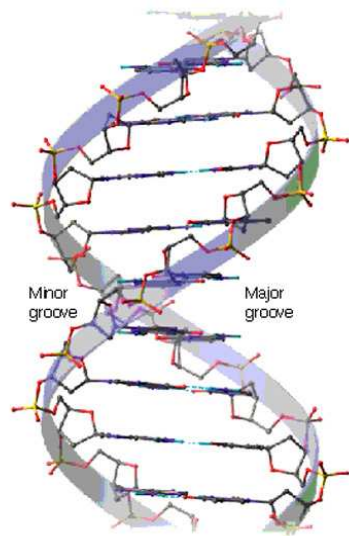
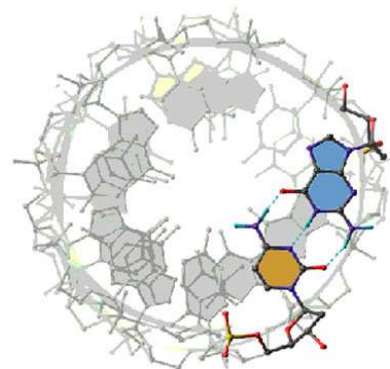
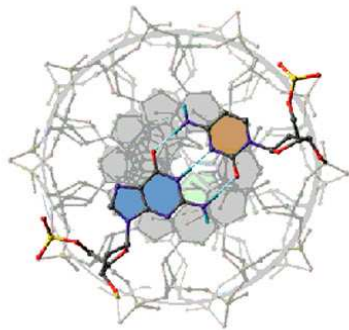
## Structure Secondaire de l'ADN

	Hélice A	Hélice B	Hélice Z
<b>Sens de l'hélice</b>	droit	droit	gauche
<b>Diamètre</b>	≈ 2,6 nm	≈ 2,0 nm	≈ 1,8 nm
<b>Résidus par tour</b>	11	10	12 (6 dimères)
<b>Ecart entre 2 pb</b>	0,26 nm	0,34 nm	0,37 nm
<b>Pas de l'hélice</b>	2,8 nm	3,4 nm	4,5 nm
<b>Rotation de l'hélice par résidu</b>	33°	36°	-60° (par dimère)
<b>Inclinaison normale des bases vers l'axe de l'hélice</b>	20°	6°	7°

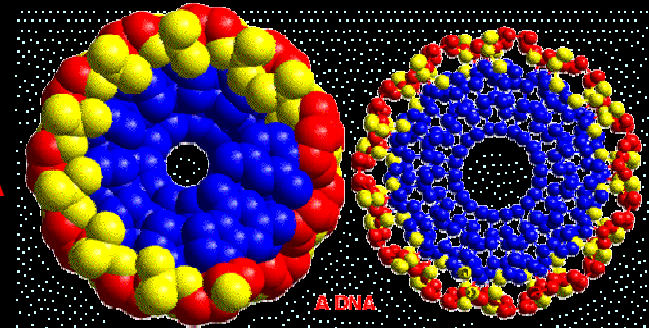
# Structure Secondaire de l'ADN

## Vues de dessus

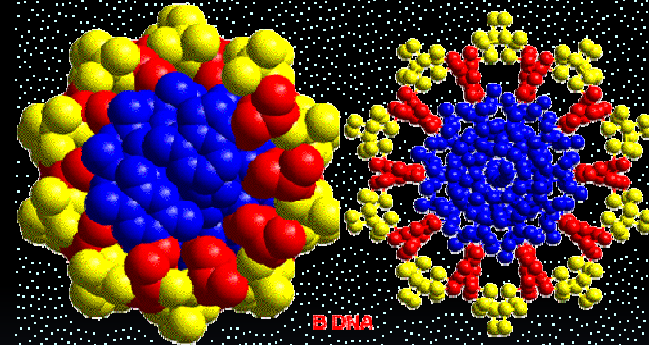
### A and B Double Helices



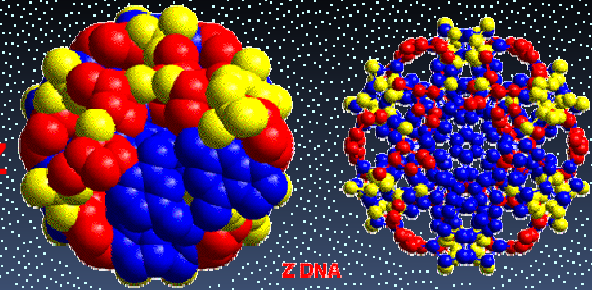
ADN A



ADN B



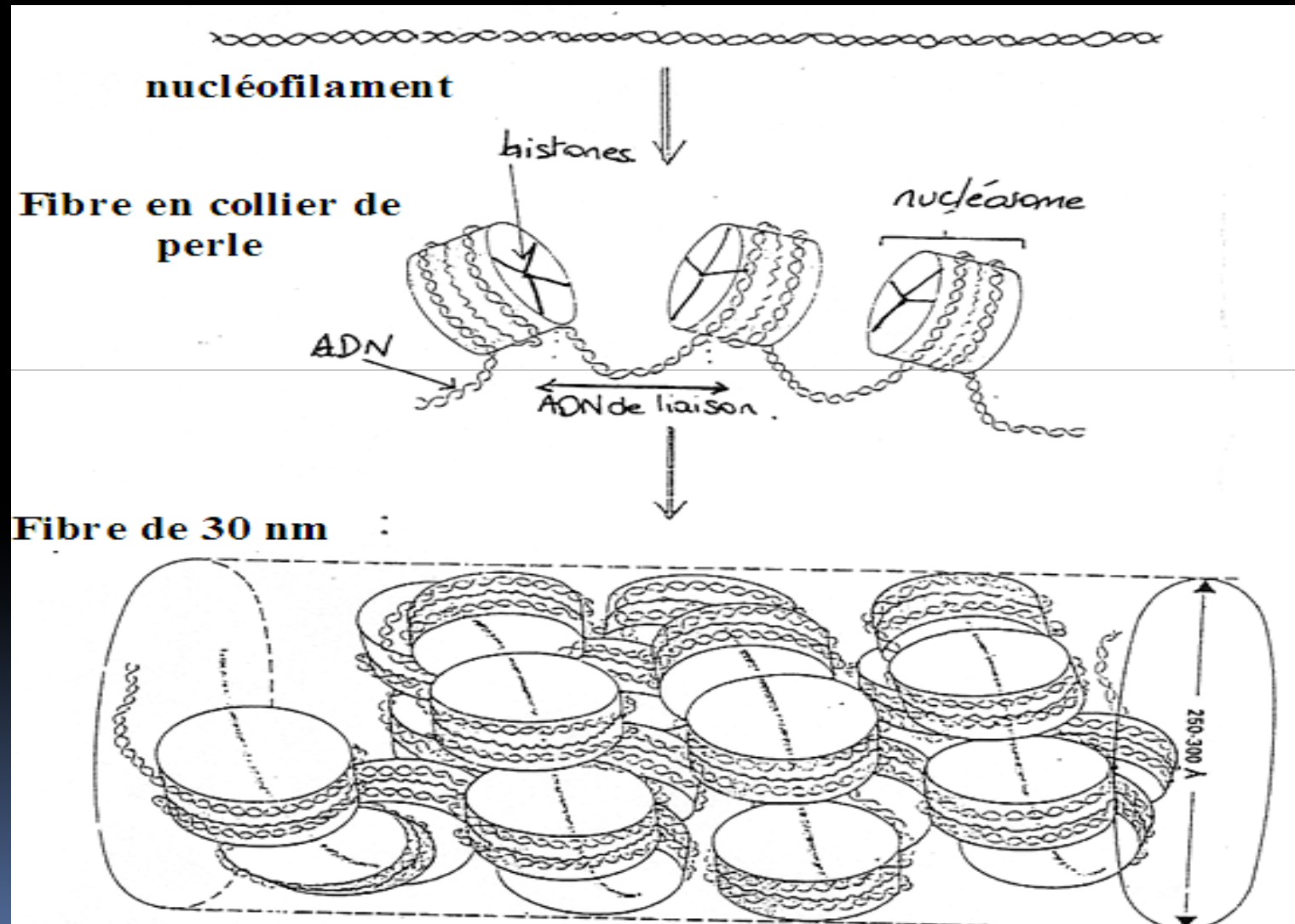
ADN Z



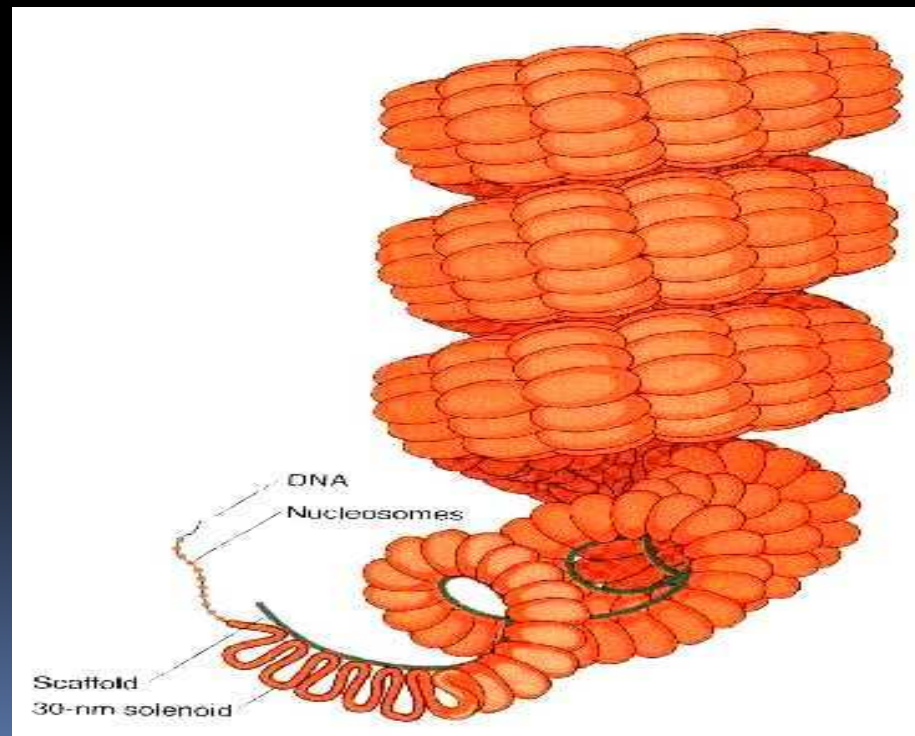
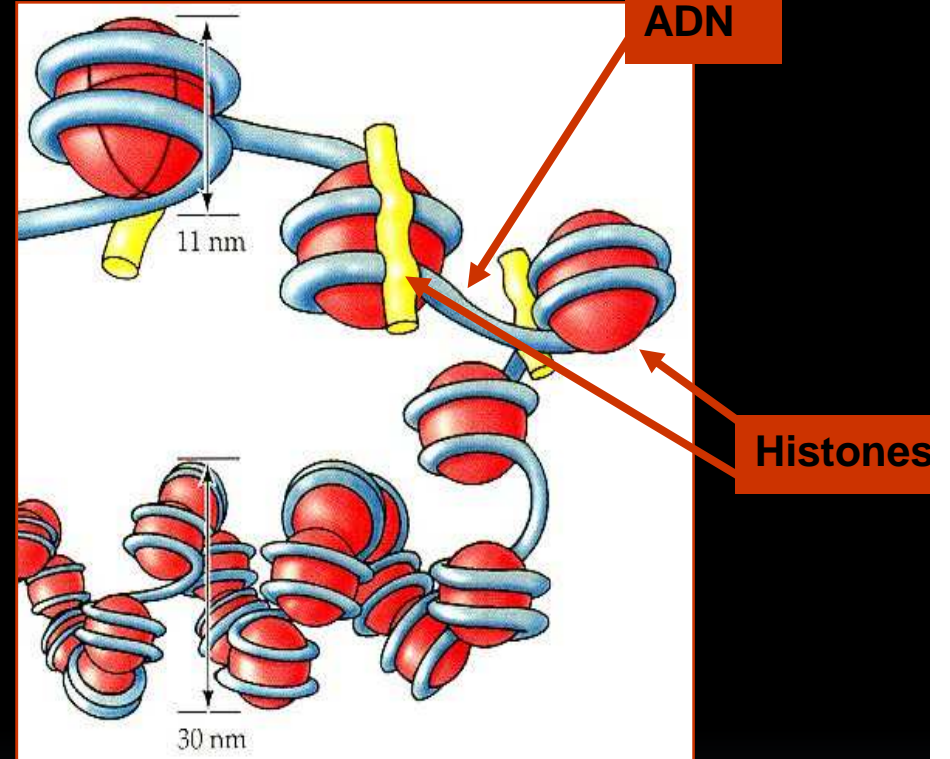
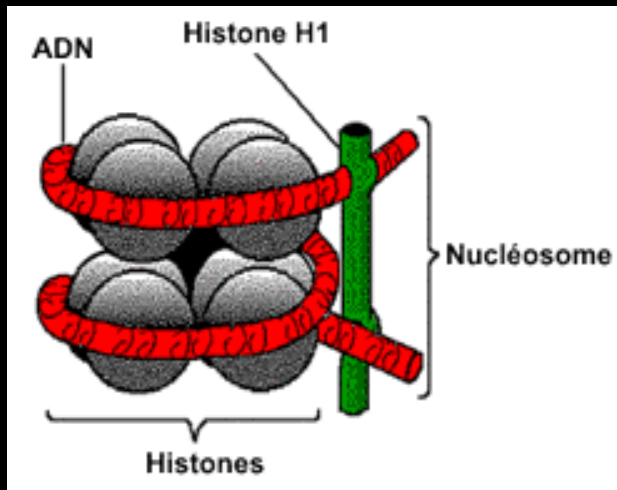


# Structure Tertiaire de l'ADN

## L'ADN des cellules eucaryotes



# Structure Tertiaire de l'ADN



Chaque molécule d'ADN s'enroule sur des protéines (histones) et forme un **chromosome**.

Un chromosome = une molécule d'ADN et les protéines sur lesquelles elle s'enroule.

L'ensemble des chromosomes forme la chromatine

# Structure Tertiaire de l'ADN

Différents niveaux d'organisation de l'ADN pour former un chromosome

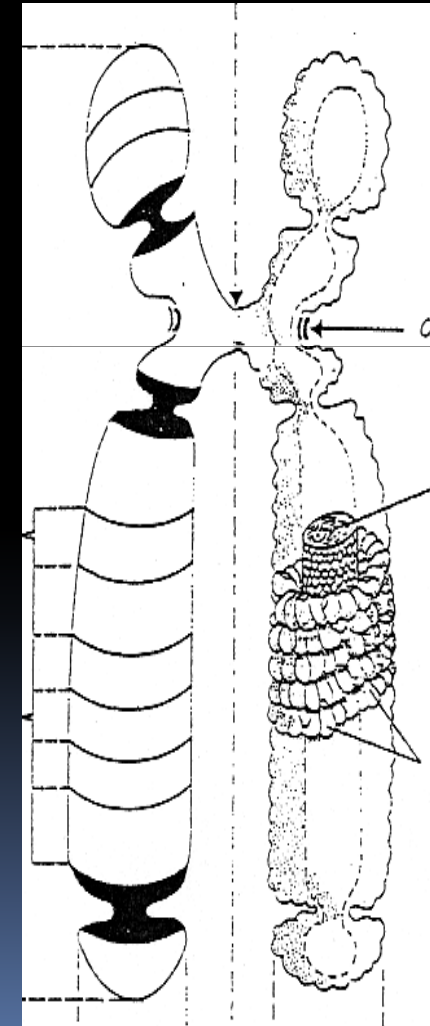
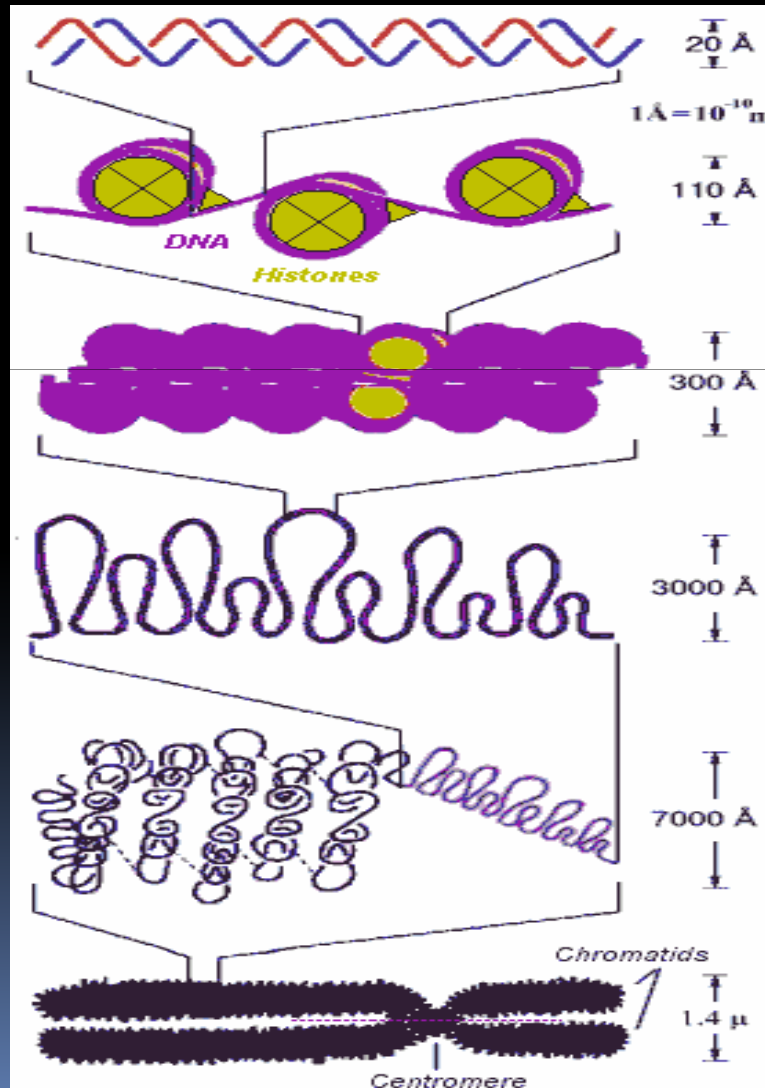
ADN double  
brin

Nucléosome

Fibre de  
chromatin  
e

Section d'un  
chromosome  
en métaphase

Chromosome  
entier



# Structure Tertiaire de l'ADN

## L'ADN des cellules eucaryotes

L'ADN eucaryote est

- sous forme de plusieurs molécules (correspondant aux chromosomes à l'état condensé) incluses dans la chromatine (à l'état décondensé)
- double brin, bicaténaire.
- Séquences répétées nombreuses (40 à 70%) , non codantes
- Associé à des protéines : les histones pour former un complexe nucléoprotéique.

# Structure Tertiaire de l'ADN

## L'ADN des cellules eucaryotes

### Les histones

5 types d'histones interviennent dans le chromatine : H<sub>2A</sub>, H<sub>2B</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, et H<sub>1</sub>

Ce sont des protéines très basiques du fait d'un grand nombre de résidus Arg et Lys dans leur structure. Elles sont riches en charge positive et pourront établir des liaisons avec les phosphates.

# Structure Tertiaire de l'ADN

## L'ADN des cellules eucaryotes

### Les nucléosomes

Ce sont les « sous-unités » de la chromatine. Ils sont formés par l'association histones / ADN selon :

Les histones  $H_{2A}$ ,  $H_{2B}$ ,  $H_3$ ,  $H_4$  s'associent par paire puis entre eux pour former un octamère d'histones autour duquel l'ADN s'enroule par 1,8 tours (soit 146 pb) en superhélice. (core)

Entre 2 nucléosomes, il y a environ 50 pb correspondant à l'ADN de liaison : partie la plus sensible aux nucléases (= enzymes de digestion de l'ADN)

Cette association forme « la fibre en collier de perle de 10 nm » ; qui correspond à une réduction de longueur de l'ADN d'un facteur 6.

# Structure Tertiaire de l'ADN

## L'ADN des cellules eucaryotes

### La fibre de 30 nm

Elle correspond à un compactage de la fibre de collier de perle assuré par les molécules d'histones H<sub>1</sub> fixées sur l'ADN de liaison et qui s'associe à chaque nucléosome. Ce compactage entraîne la formation d'un arrangement hélicoïdal (= solénoïde) qui diminue la longueur de la molécule d'ADN d'un facteur 50. (la chromatine)

Remarque : pour que la longueur de la chromatine entre dans la longueur des chromosomes, il faut un facteur 7000 ; ce niveau supérieur d'organisation est encore mal connu.

# *Propriétés physicochimiques de ADN*

## *Solubilité*

L'ADN est un **polyanion** dont les sels de sodium sont solubles dans l'eau en formant des solutions à viscosité élevée.

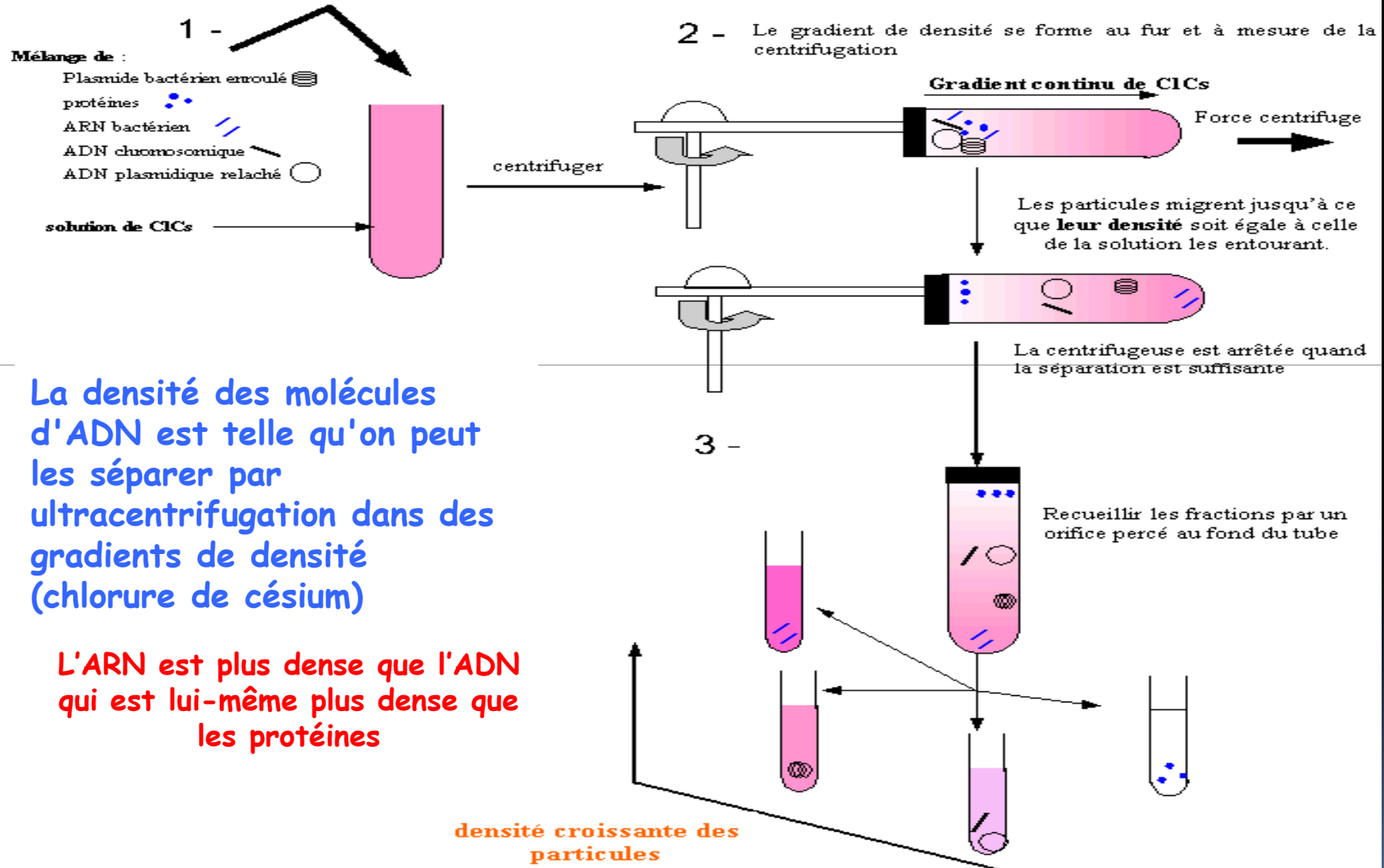
Les alcools, et en particulier l'éthanol, précipitent les molécules d'ADN sous forme d'agglomérat en longues fibres





# Propriétés physicochimiques de ADN

## Densité

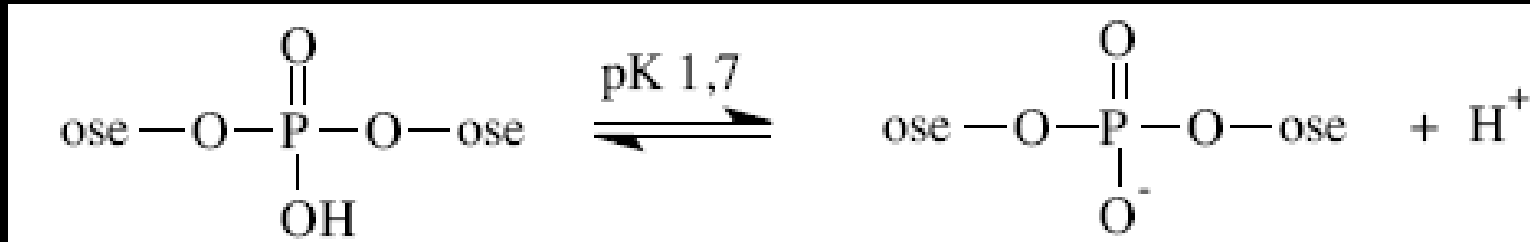


La densité des molécules d'ADN est telle qu'on peut les séparer par ultracentrifugation dans des gradients de densité (chlorure de césium)

L'ARN est plus dense que l'ADN qui est lui-même plus dense que les protéines

# Propriétés physicochimiques de ADN

## Charge

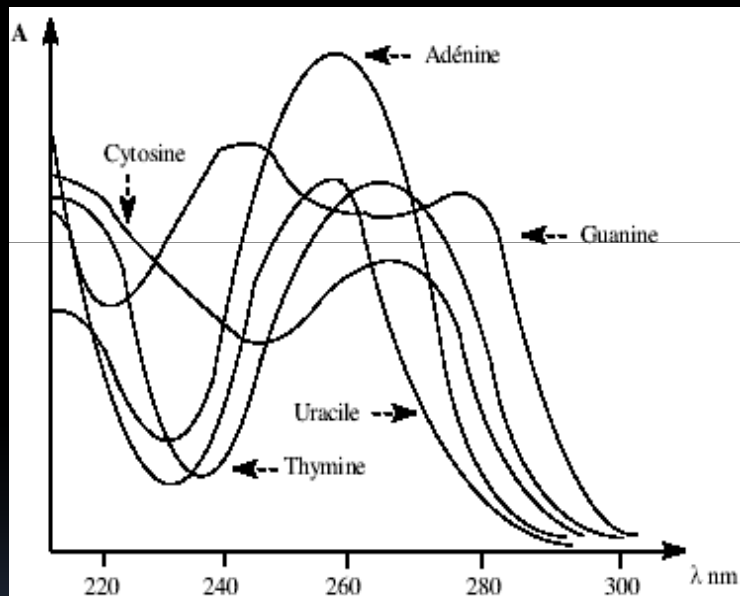


La charge de ces molécules à pH physiologique est négative. Charge dont la contribution est uniquement due aux groupements phosphates (à ce pH, les bases ne portent aucune charge). Cette propriété est utilisée pour les séparer par électrophorèse.

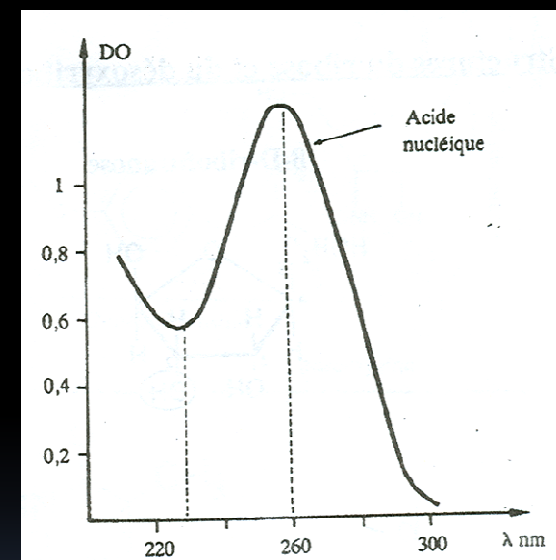
# Propriétés physicochimiques de ADN

## Propriétés spectrales

Spectre d'absorption dans l'ultra-violet (UV) des bases azotées à pH 7



Spectre d'absorption d'un acide nucléique

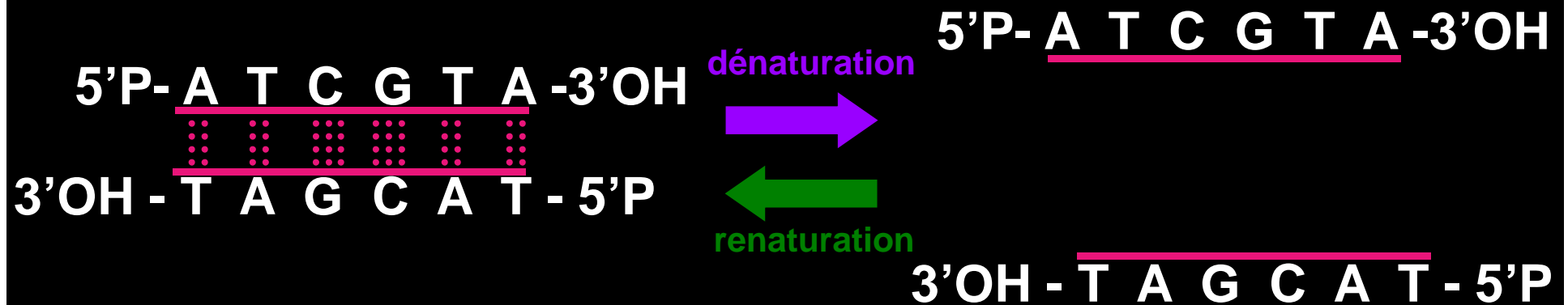


Coefficients d'absorption molaire des nucléotides à 260 nm

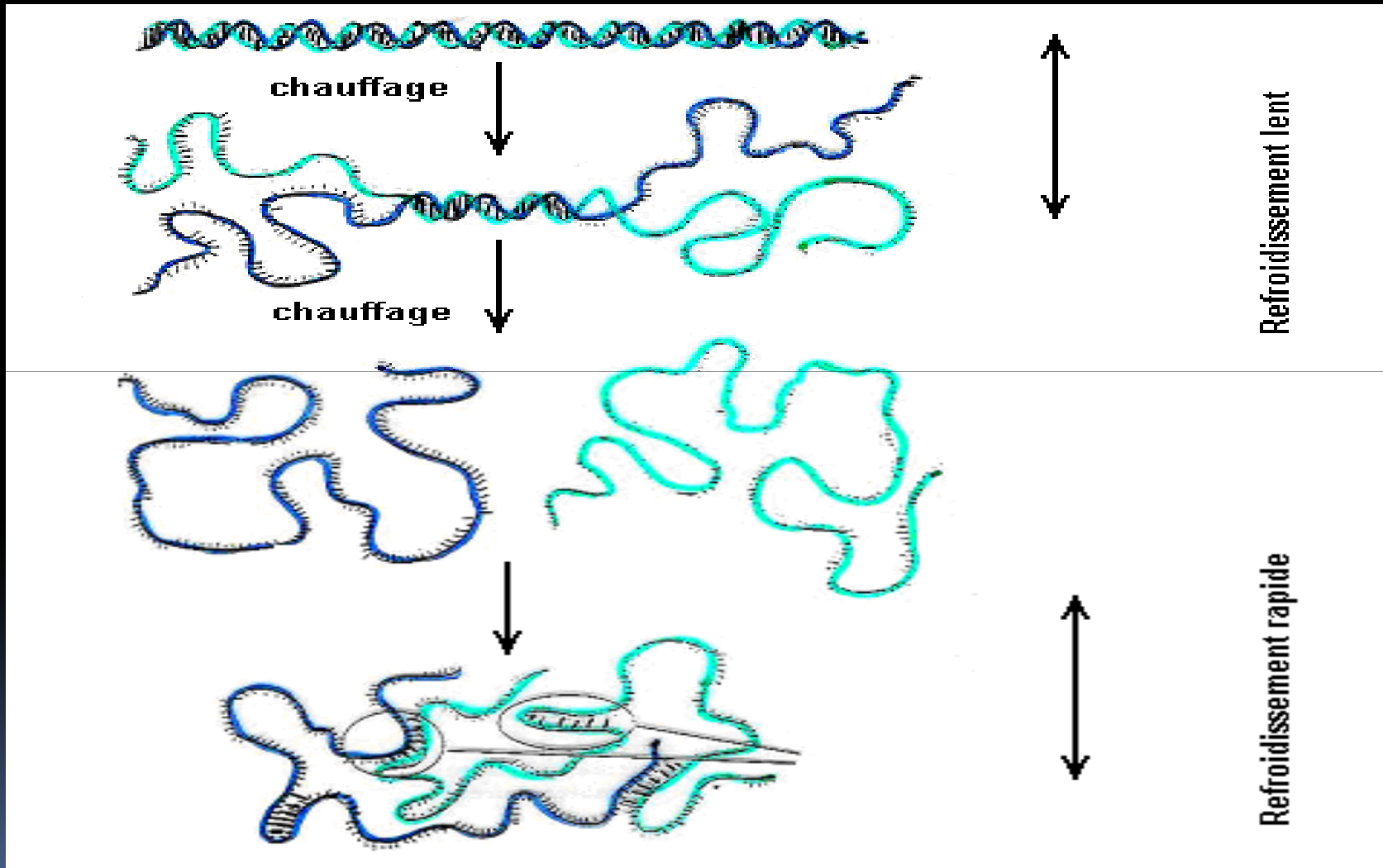
AMP	GMP	CMP	UMP	dTMP
15400	11700	7500	9900	9200

# Propriétés physicochimiques de ADN

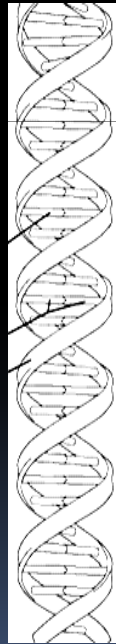
## Dénaturation et renaturation:



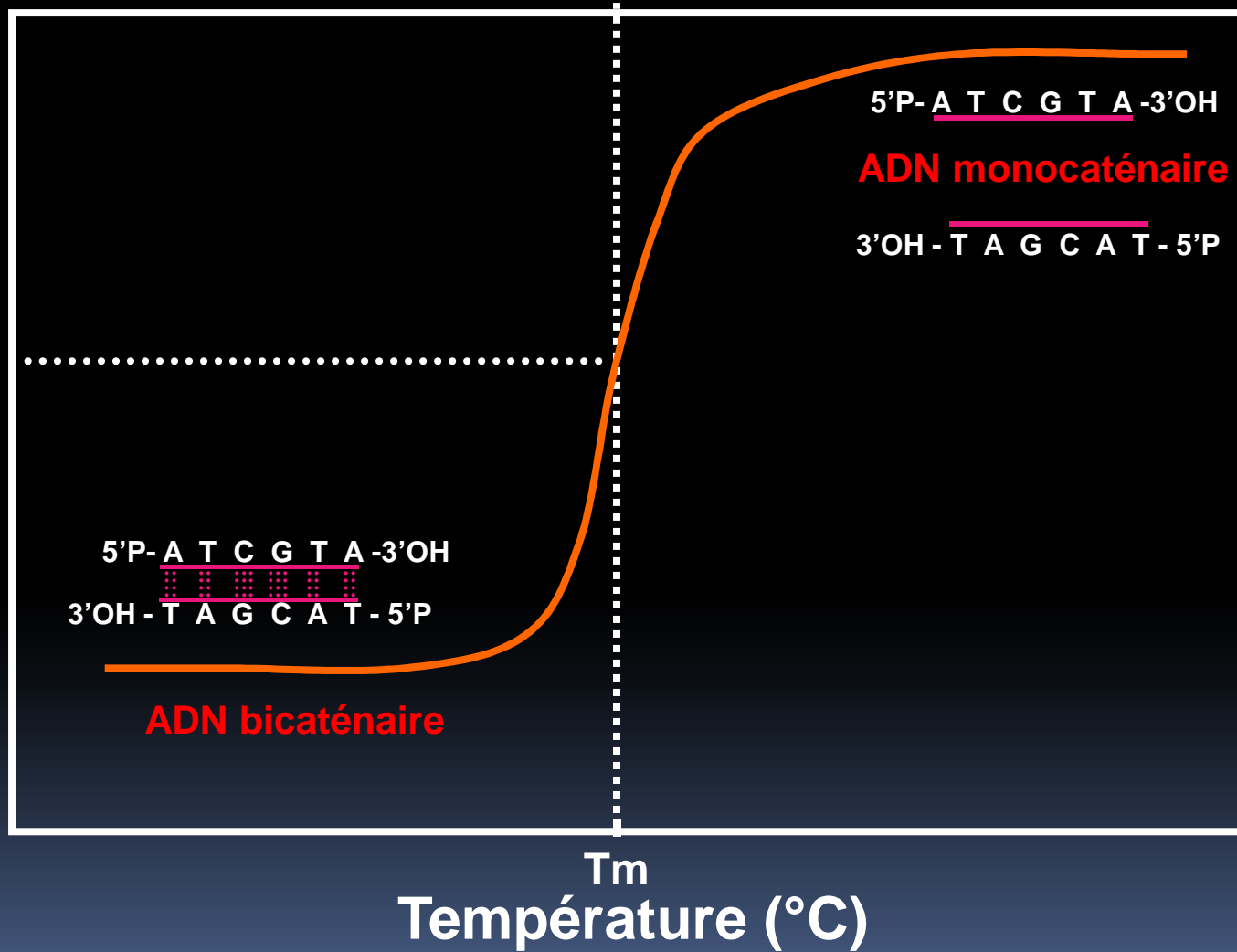
## Dénaturation et renaturation:



# Propriétés physicochimiques de ADN

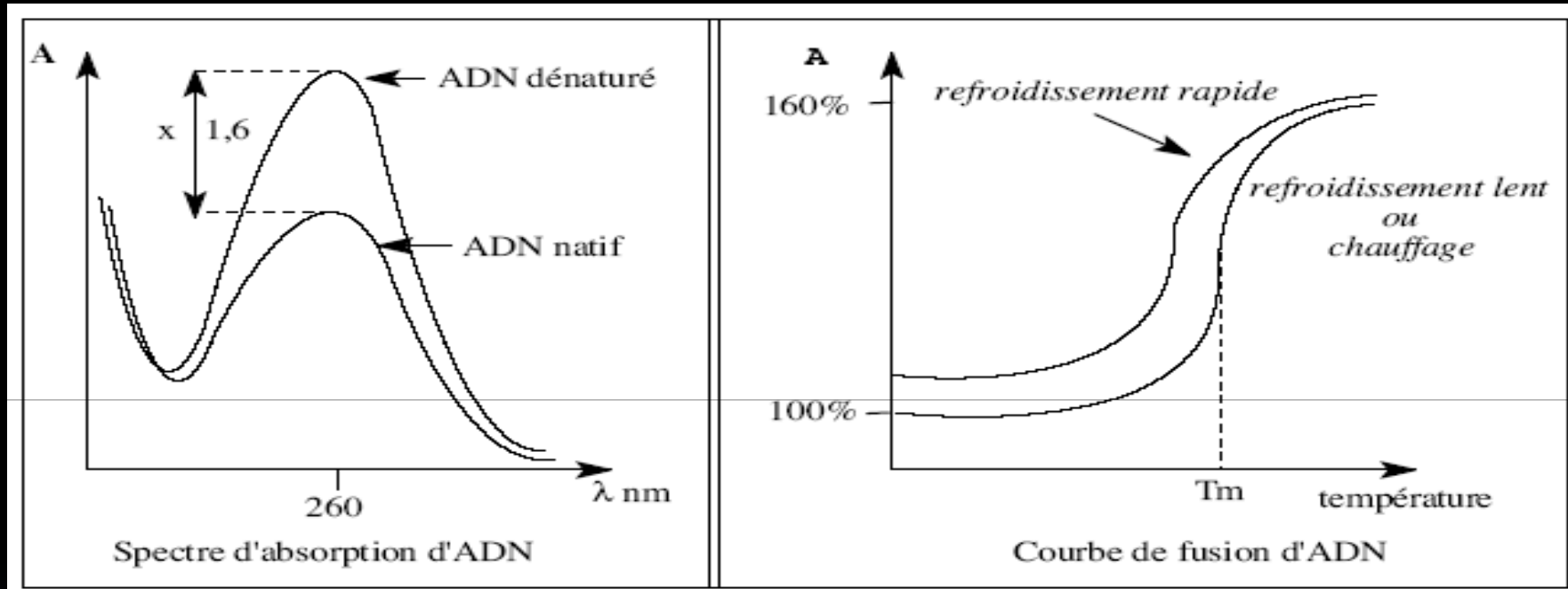


Densité optique 260 nm



# Propriétés physicochimiques de ADN

## L'effet Hyperchrome



par la chaleur (chauffage à 100°C) ou par l'urée ou encore à pH très alcalin. L'ADN dénaturé a une absorption à 260 nm plus élevée que l'ADN natif, d'un facteur 1,6. Cette propriété est appelée l'effet hyperchrome ou hyperchromicité. La courbe de refroidissement rapide aboutit à la même valeur originale de l'absorption, mais à une valeur plus élevée de  $T_m$  : c'est le phénomène d'hystérésis.

# *Propriétés physicochimiques de ADN*

Température de fusion :  $T_m$

$$T_m = 81,5 + 16.6 \log [Na^+] + 0.41\%(G+C) - 600/n - 0,1(\% \text{ form})$$

$[Na^+]$  en Molaire, entre 0,01 et 1 M

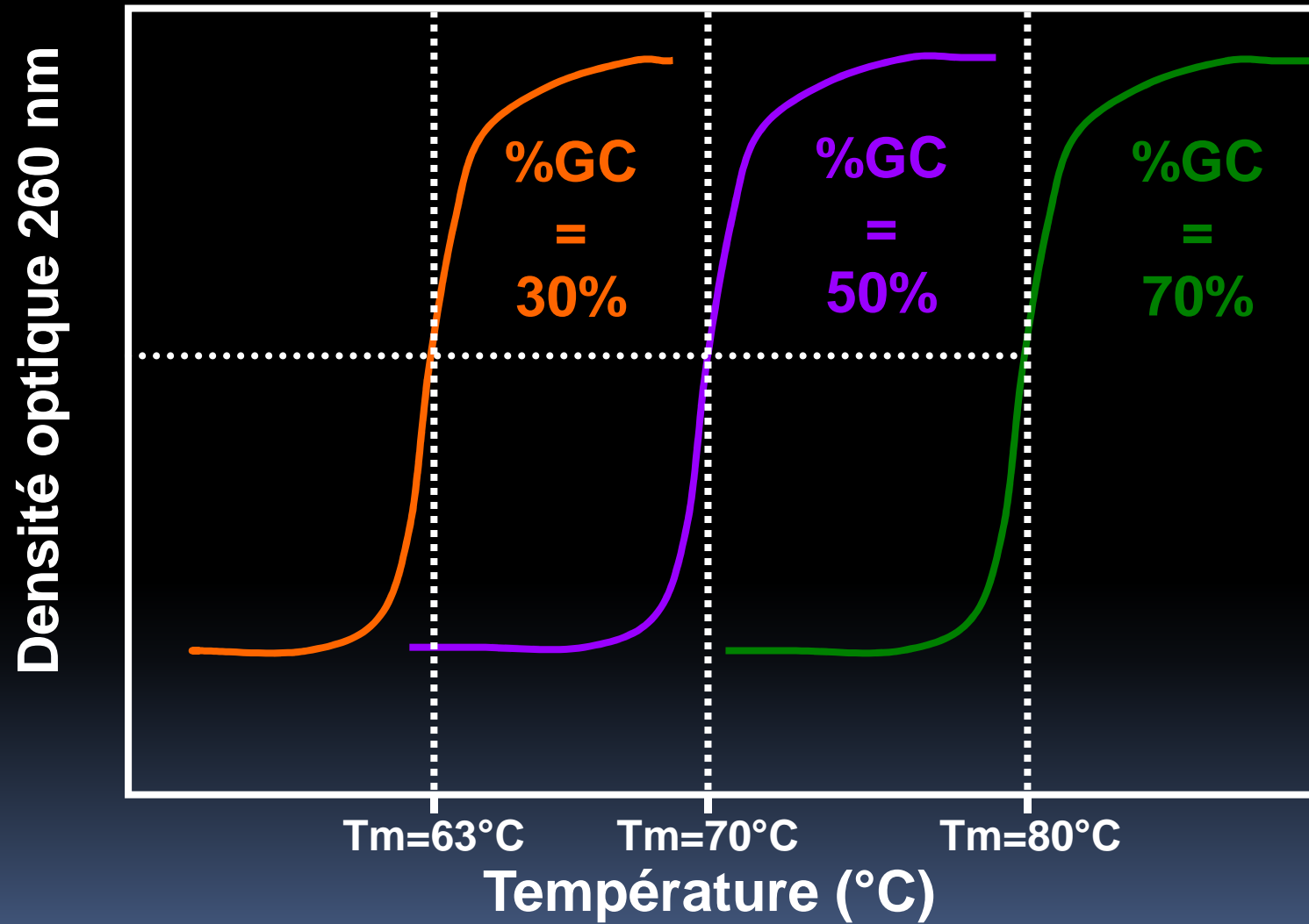
$n$  = nombre de paires de bases > 100

Form = formeamide (entre 0 et 50 %)

$\%(G+C)$  : 75 et 30

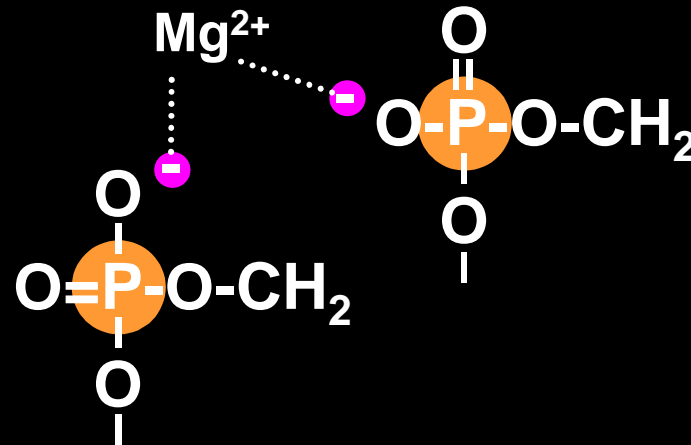
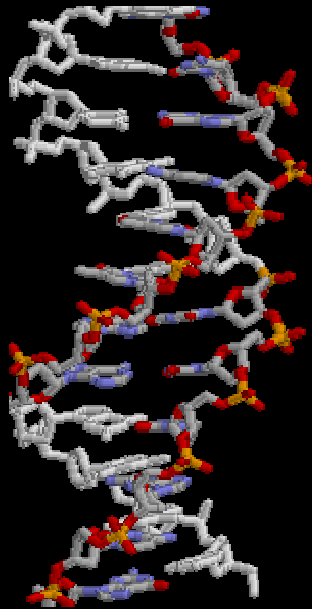


# *Propriétés physicochimiques de ADN*



## Interactions de l'ADN

Les ions divalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) peuvent stabiliser ou déstabiliser l'ADN.

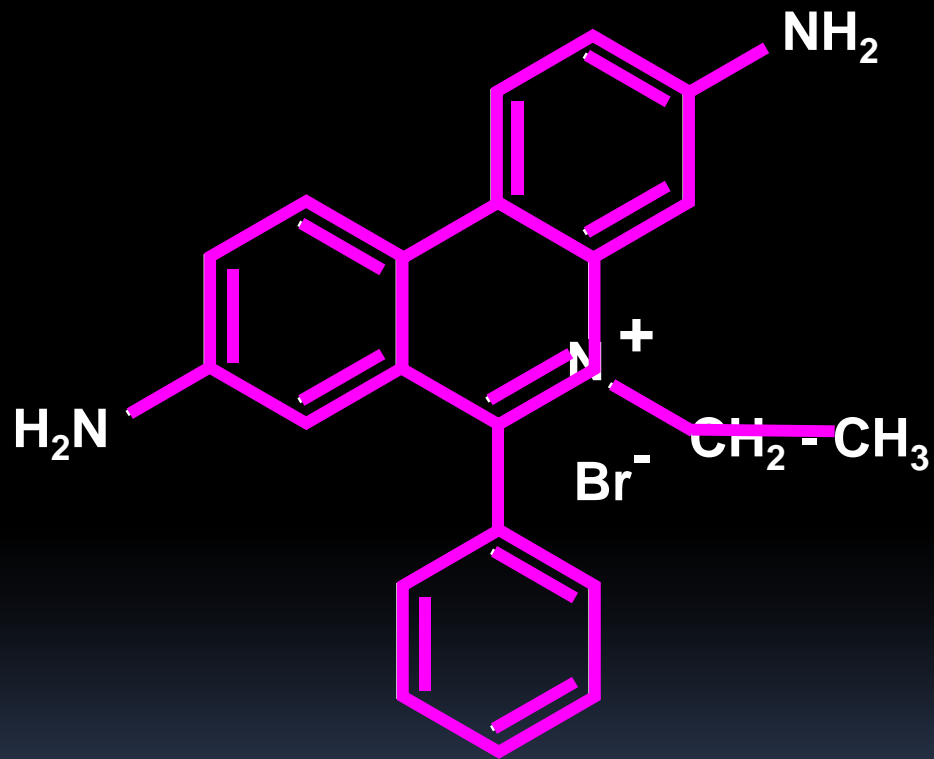


Le magnésium transforme une répulsion  $-/-$  en  $(+/-)_2$  :  
→ stabilisation de l'hélice (augmentation de la température de fusion de l'ADN).

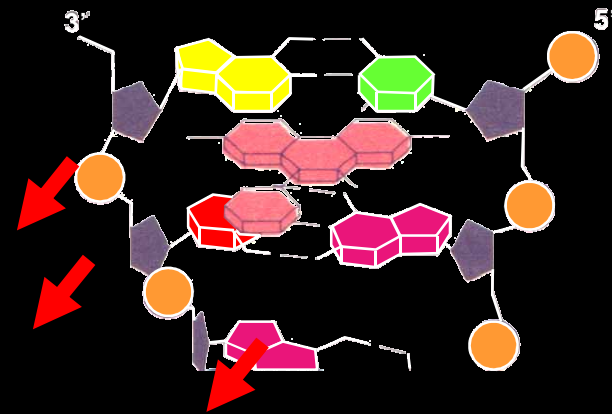
Le cuivre se lie avec les bases (N et O) :  
→ déstabilisation de l'ADN (diminution de la température de fusion de l'ADN).

## Interactions de l'ADN

On a retrouvé de l'eau fortement liée à l'ADN (cristaux). Pour qu'une molécule puisse se lier à un sillon de l'ADN il faudra **chasser** l'eau.

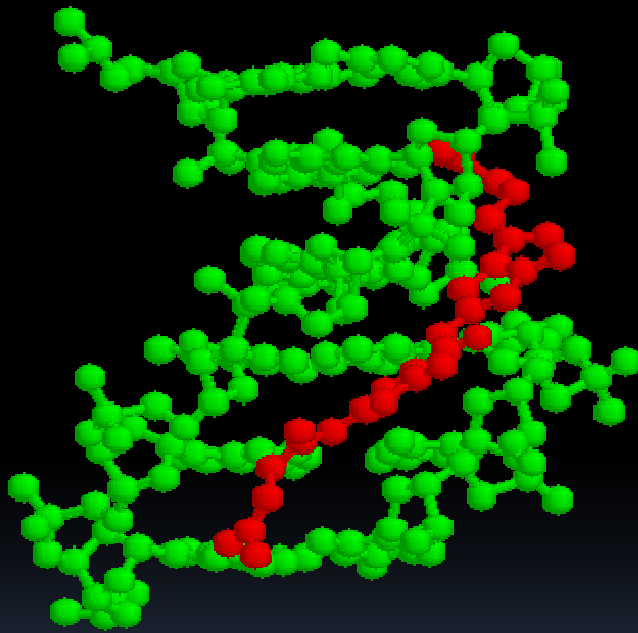


bromure d'éthidium (BET)

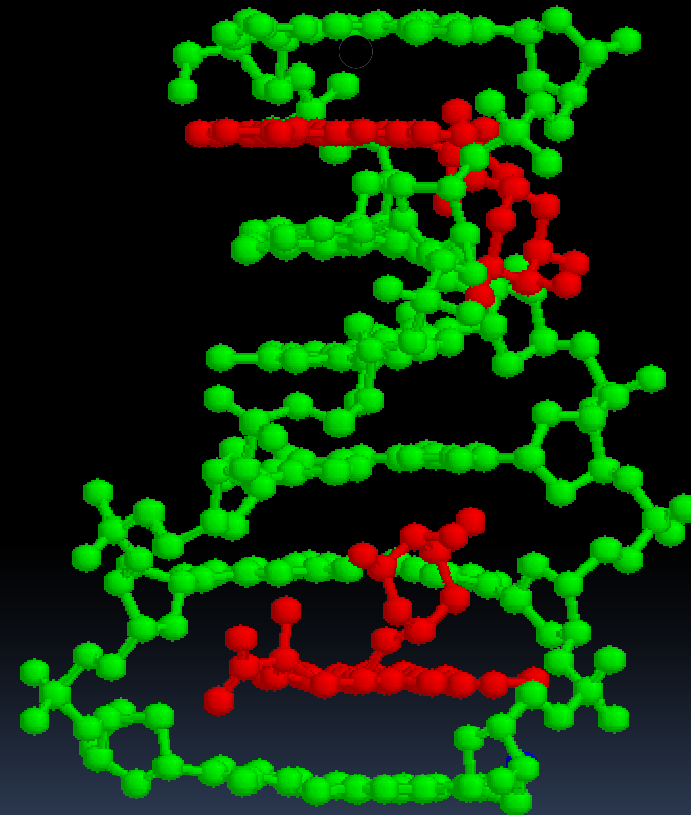


## Interactions de l'ADN

Certains antibiotiques peuvent s'insérer dans un des sillons de l'ADN (Nétropsine par exemple) et d'autres s'intercalent entre les bases (Daunomycine par exemple).



Nétropsine (rouge)



Daunomycine (rouge)



# *Différents types et état des ADN*

## *L'ADN mitochondrial*

**Les mitochondries des cellules eucaryotes contiennent**

- **4 à 6 molécules d'ADN**
- **bicaténaire et circulaire**
- **de composition nucléotidique différente de celle du noyau**
- **avec taux de GC faible**

# *Différents types et état des ADN*

## *L'ADN bactérien*

Il correspond à l'ADN des Procaryotes.

- Non contenu dans un noyau pourvu d'une enveloppe nucléaire.
- ADN = 1 seule molécule
- Circulaire
- Bicaténaire
- Structure très condensée

Exemple : E.coli : ADN =  $4 \cdot 10^6$  pb ; 3.109 Da ; 1,36 mm dans une bactérie d'environ 5  $\mu$ m de long

Structure en superhélices avec des torsades négatives.

# *Différents types et état des ADN*

## *L'ADN des plasmides*

**Plasmides = éléments génétiques extrachromosomiques présents chez de nombreuses bactéries, porteurs de gènes et capables d'autoreproduction.**

**ADN = bicaténaire, circulaire et de taille variable**

# *Différents types et état des ADN*

## *L'ADN viral*

Les virus ne comportent pas tous de l'ADN (certains virus portent de l'ARN)

• La structure la plus courante de l'ADN des virus à ADN : bicaténaire et circulaire

Mais il existe aussi des virus à

• ADN monocaténaire circulaire (phage X174 d'E.coli)

• ADN linéaire (phage T7)

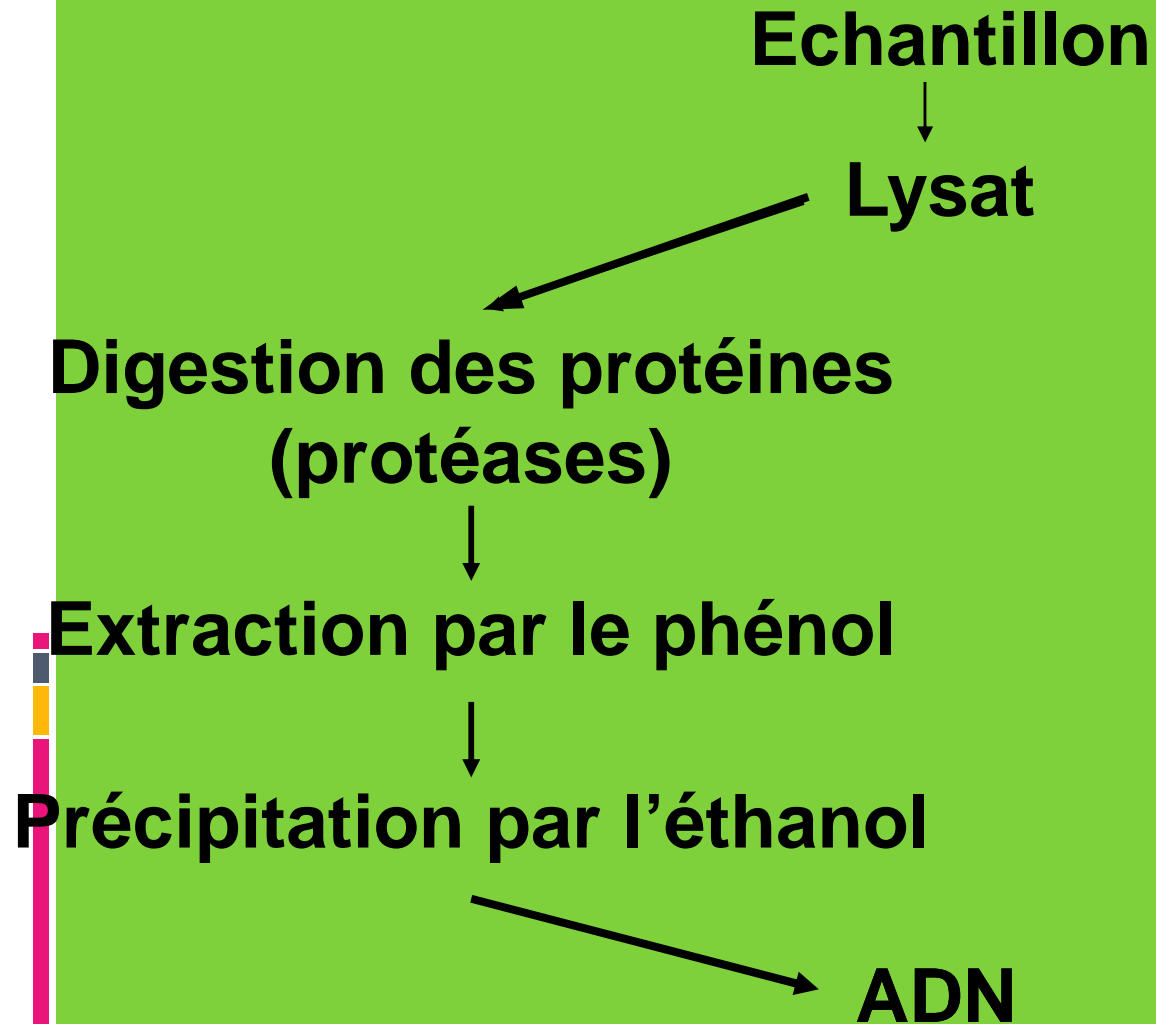
• ADN circulaire ou linéaire selon le stade de son développement (phage  $\lambda$ ) car possède des extrémités monocaténares complémentaires permettant la cyclisation.



*Méthodes d'étude des acides nucléiques*

# Extraction d'ADN

---



## Hydrolyse chimique des Acides Nucléiques

Type d'hydrolyse chimique	Produits d'hydrolyse	
	ARN	ADN
<i>alcaline</i>	Nucléosides monophosphate (2' et 3')	_____
<i>acide</i> - pH 1 + chauffage	Pentoses + phosphates + bases	
- pH 4	Bases puriques + acides nucléiques apuriniques	

- 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. C'est la présence de l'hydroxyle libre en 2' qui permet cette hydrolyse qui donne un intermédiaire cyclique 2':3' P, aboutissant à des nucléotides 2' P ou 3' P.

## Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques

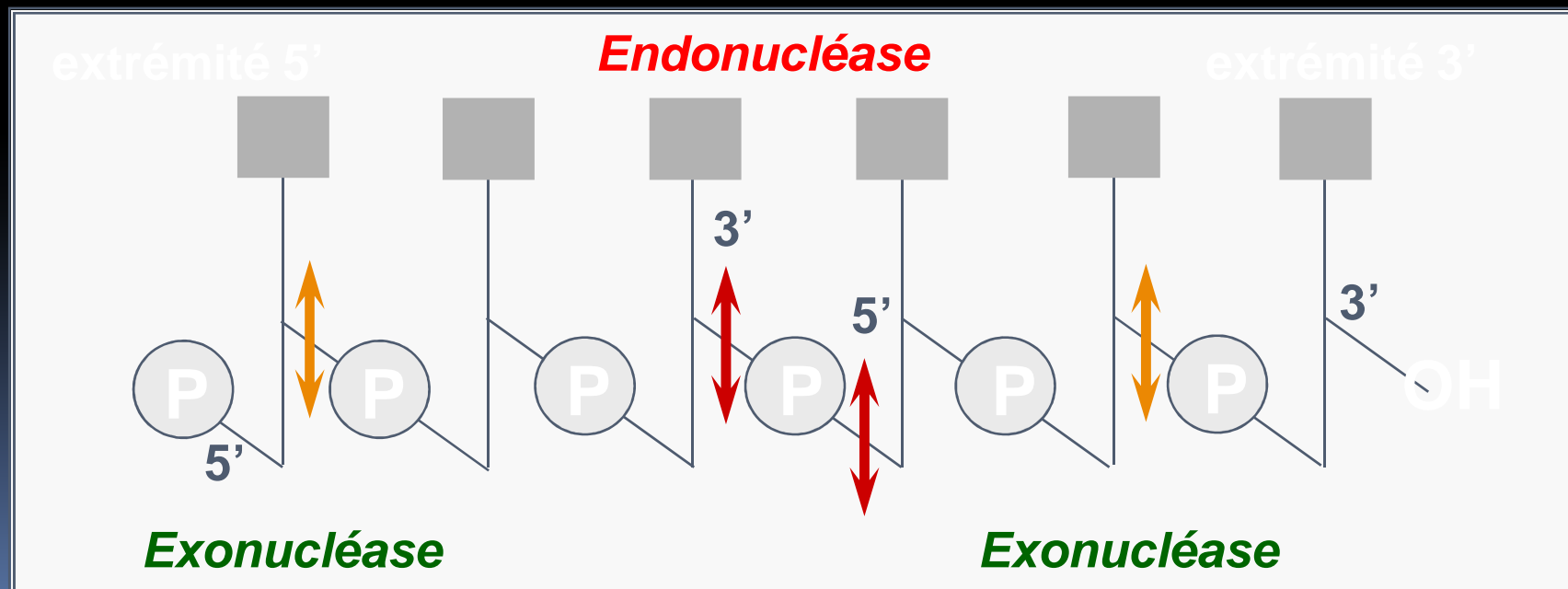
Ce sont phosphodiesterases spécifiques appelées **nucléases**

Elles présentent des niveaux de spécificité et sont classées par :

- leur mode d'attaque de la chaîne : extrémité (exo) ou intérieur (endo)
- leurs spécificité vis-à-vis du substrat : ADN, ARN ou les deux et de la structure, simple ou double brin
- leur spécificité de reconnaissance des sites : bases ou leur enchaînement
- le type de coupure de la liaison phosphodiester

## Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques

- **Exonucléases** libèrent par hydrolyse le nucléotide situé à l'extrémité 5' ou 3'
- **Endonucléases** : hydrolysent une liaison ester interne.



# Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques

S : simple brin, d : double brin

N : représente n'importe lequel des nucléotides

**Nucléases**                      **Substrats**                      **Type coupure**                      **Spécificité coupure**

## Exonucléases

phosphodiesterase de venin	ARN, ADN (s)	3'	extrémité 3'
phosphodiesterase de la rate	ARN, ADN (s)	5'	extrémité 5'
exonucléase I d' <i>E.Coli</i>	ADN (s)	3'	extrémité 3'
exonucléase III d' <i>E.Coli</i>	ADN (d)	3'	extrémité 3'

## Endonucléases

endonucléase S1 d' <i>Aspergillus</i>	ARN, ADN (s, d)	3'	aléatoire
ARNase T1 d' <i>Aspergillus</i>	ARN (s)	5'	-G #N
ARNase de pancréas	ARN (s)	5'	-Pyr # N
ADNase II de thymus	ADN (s)	5'	-dPyr # dPur

## Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques

### endonucléases de restriction

---

#### ■ Origine

- système de protection des bactéries
- spécifiques et d'une séquence de 4 à 10 nucléotides
- le site est palindromique

#### ■ Nomenclature

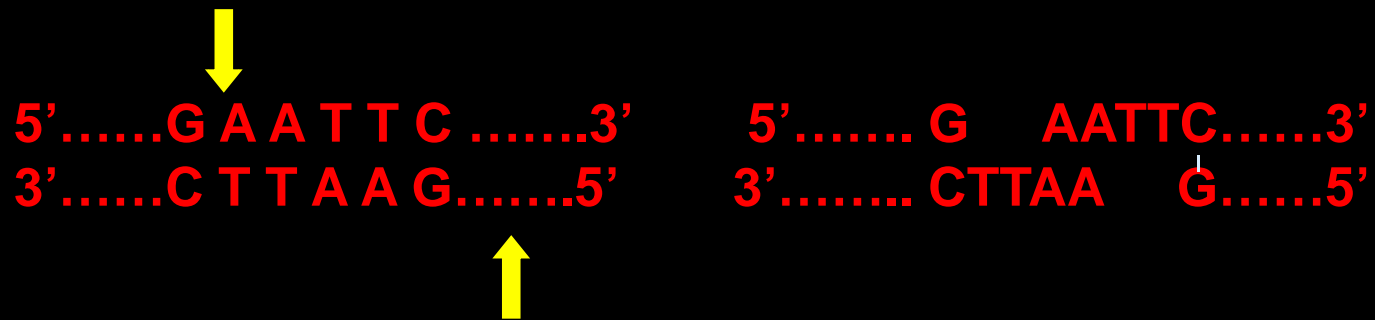
Escherichia coli R y13

EcoR I : 1<sup>ère</sup> enzyme trouvée chez E. coli

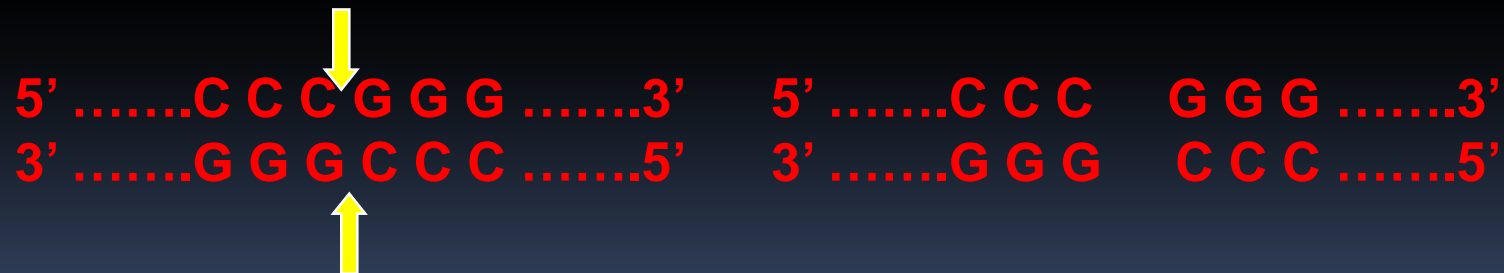
EcoR V : 5<sup>ème</sup> enzyme trouvée chez E. coli

# Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques

## COUPURES A BOUTS COHESIFS Ex : EcoR I



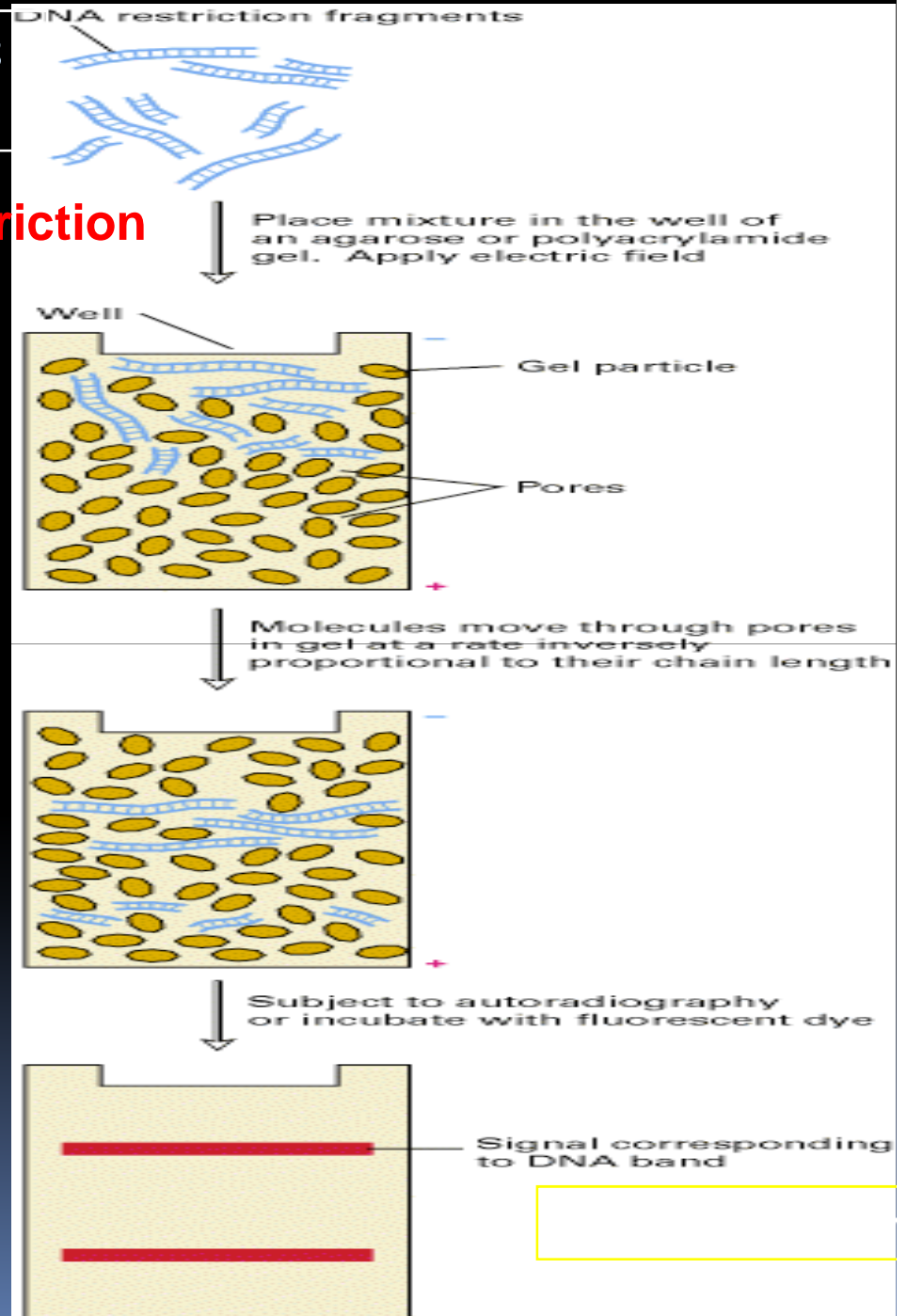
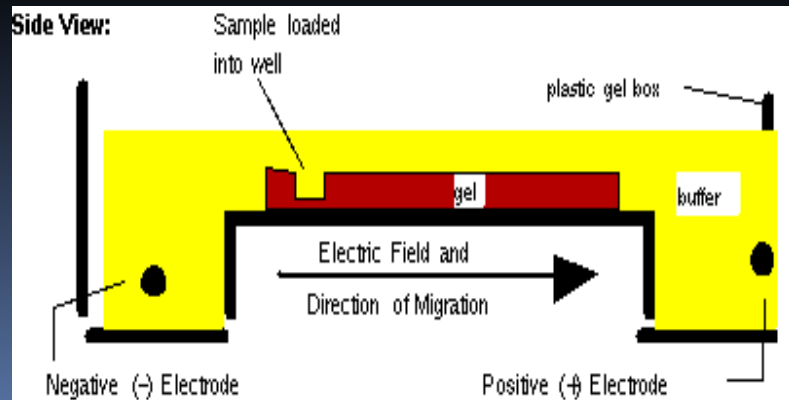
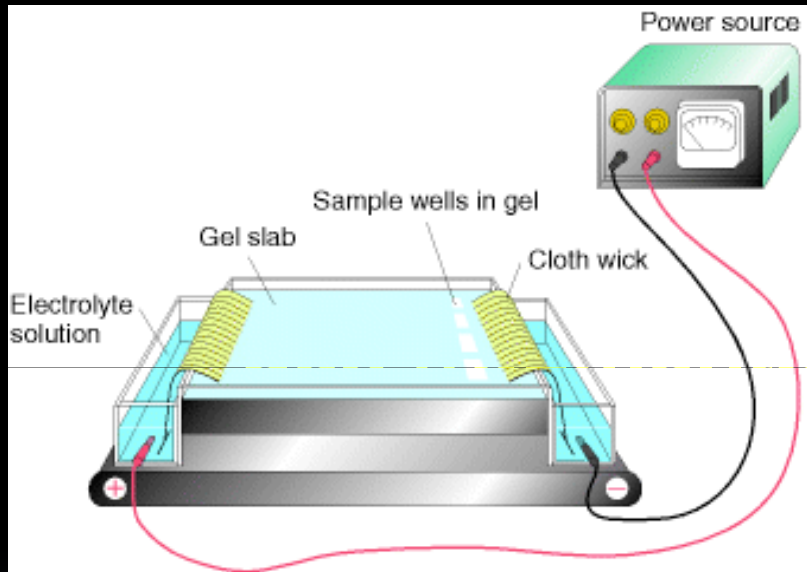
## COUPURES A BOUTS FRANCS (BLUNT ENDS) ex : Sma I





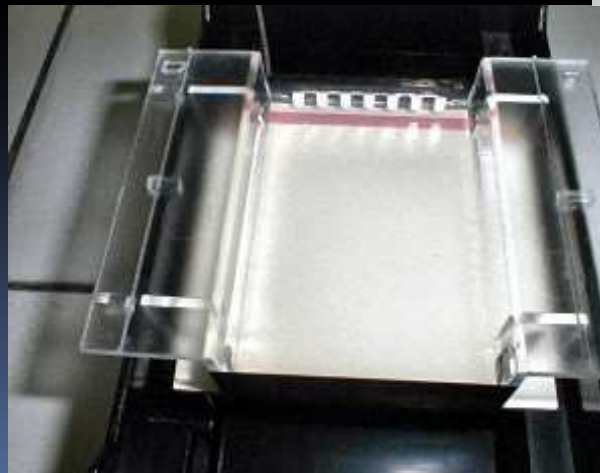
# Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques

## Visualisation des fragments de restriction

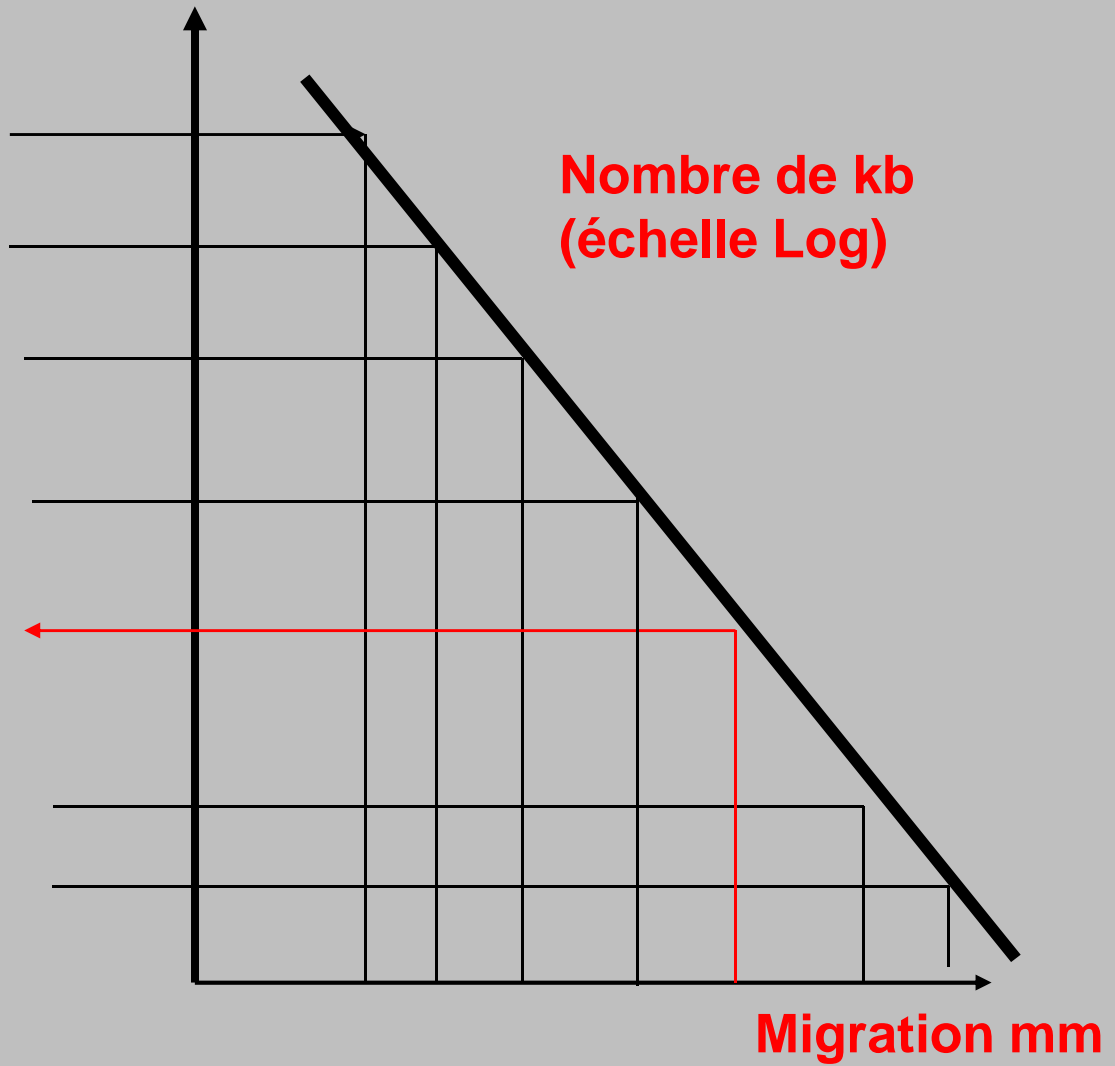
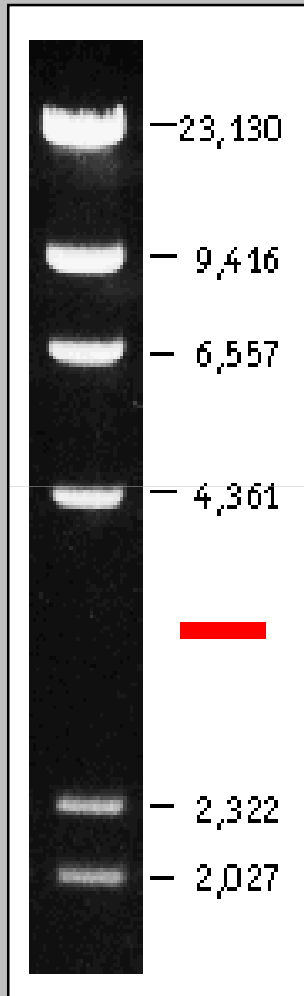


# Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques

## Visualisation des fragments de restriction



# Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques



# Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques

10 kb



ENZYME Eco RI

7 kb



CARTE DE RESTRICTION

3 kb



8 kb



ENZYME Hind III

2 kb



5 kb



3 kb



2 kb



ENZYMES Eco RI  
+Hind III

EcoRI

Hind III

3kb



5kb

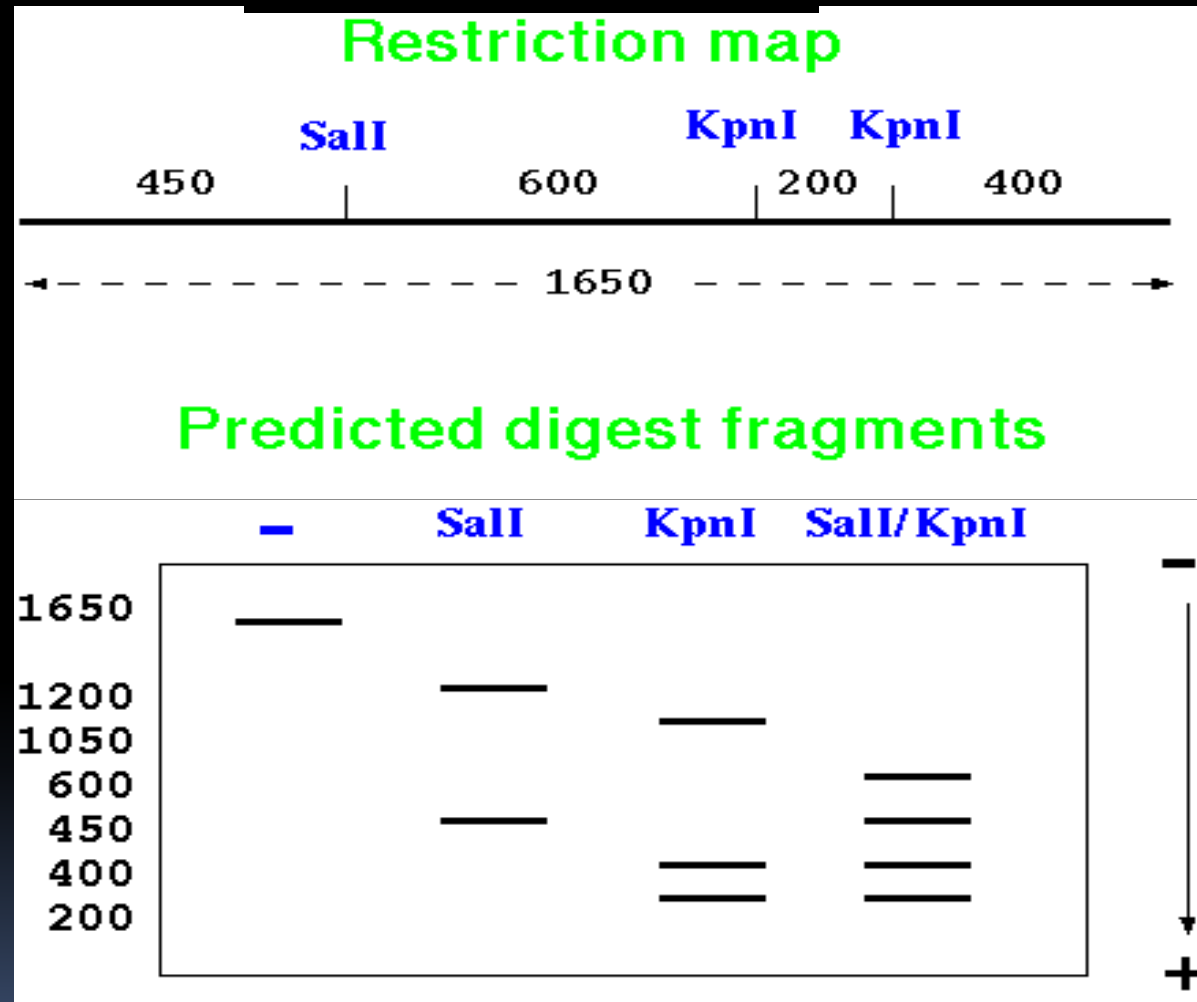


2kb



# Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques

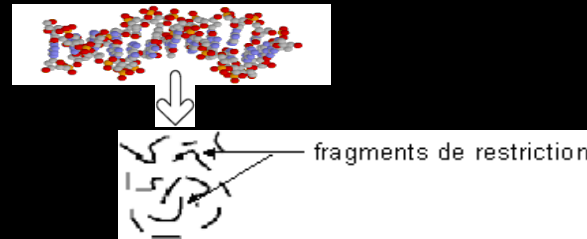
## Enzymes de restriction



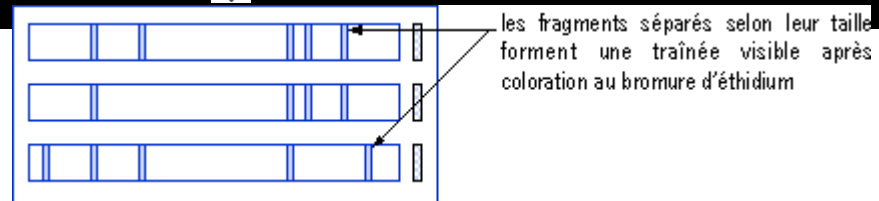
Fragments observés par électrophorèse

# Southern blot

1- Clivage enzymatique de restriction

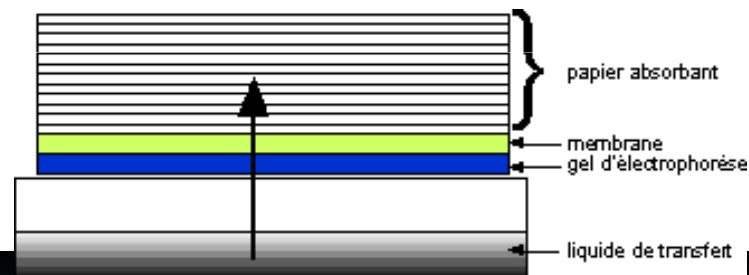


2- Électrophorèse sur gel d'agarose

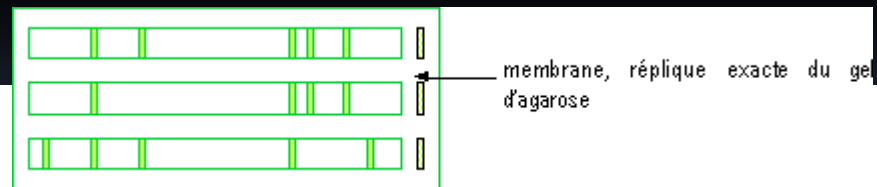


3- Dénaturation dans le gel des fragments de restriction

4- Transfert sur support solide (membrane de nylon ou nitrocellulose) par capillarité (buvardage)

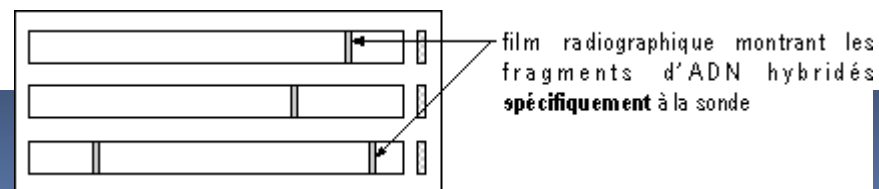


5- Fixation de l'ADN sur la membrane par cuisson (mb. nitrocellulose) ou exposition U.V (mb. nylon)



6- Hybridation avec une sonde marquée dénaturée  
7- lavages

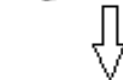
8- Autoradiographie



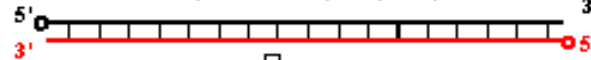
# PCR

1- **digestion enzymatique** par endonucléase de restriction

Quantité infime d'ADN d'un échantillon de sang



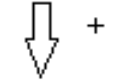
Séquence cible (à amplifier)



2- **dénaturation** de l'ADN à 94°C



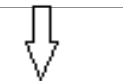
3- préparation de deux **sondes** nucléotidiques complémentaires des extrémités de la séquence cible



+



4- ajout des sondes en excès à 50-60°C : **hybridation**



+ d NTP  
Taq polymérase



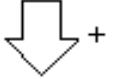
5- synthèse des brins à partir des sondes hybridées servant d'amorces (=primers) à 60-70°C : **extension**



+ d NTP  
Taq polymérase



6- **dénaturation** des duplex néoformés à 95°C puis retour à 60°C



+ d NTP  
Taq polymérase



Reprise de la polymérisation du fait de l'excès d'amorces

Cycle 1

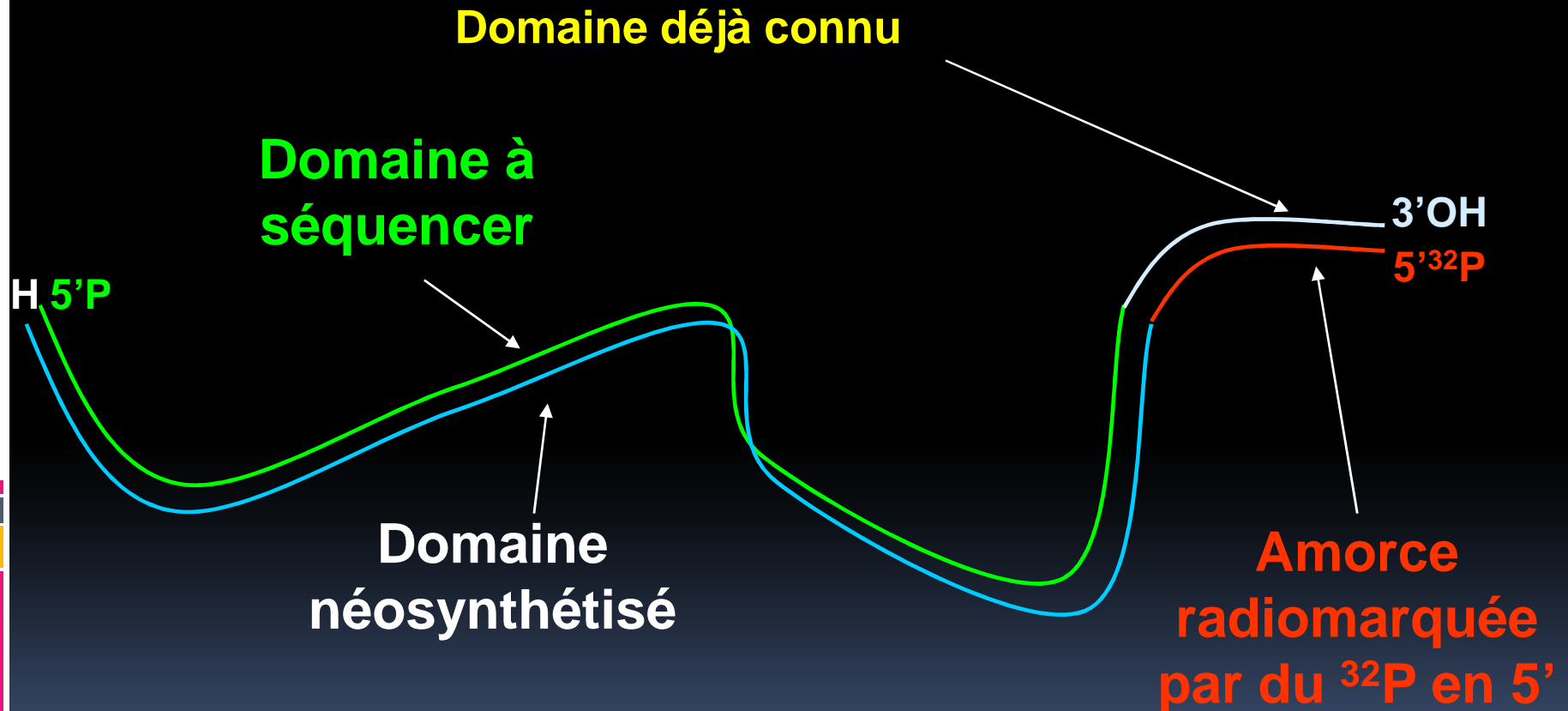
Cycle n

Exp : Amplifier une ADNc à partir d'une ARNm : RT-PCR

Répétition de cycles de synthèse/dénaturation réalise une augmentation exponentielle de la quantité initiale d'ADN (à chaque cycle, le nombre d'exemplaires de la séquence encodée par les deux amorces double !).

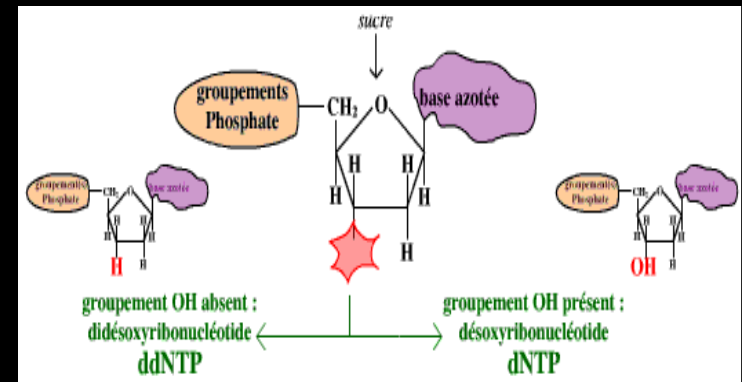
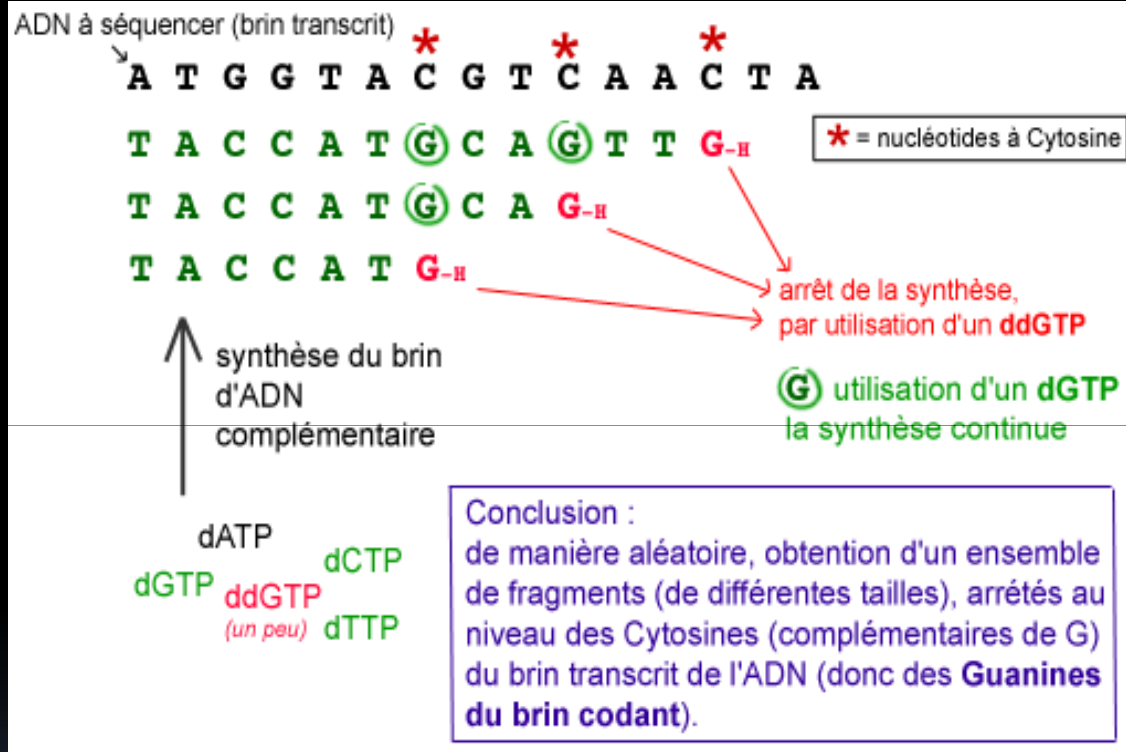
# Méthode enzymatique de Séquençage de l'ADN *selon Sanger*

PRINCIPE : L'UTILISATION D'UNE ADN-POLYMÉRASE





# Méthode enzymatique de Séquençage de l'ADN *selon Sanger*



On utilise 4 tubes : chacun avec un type de ddNTP et le nombre de fragments obtenues est égale à l'occurrence de chaque type de nucléotides

## Lecture du PAGE après électrophorèse

ddATP	ddGTP	ddCTP	ddTTP
-	-	-	-
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
+	+	+	+

La séquence du brin  
néoformé d'ADN se lie  
horizontalement :  
- de l'anode (+)  
(correspondant au côté 5'P)  
- vers la cathode (-)  
(correspondant au côté  
3'OH)

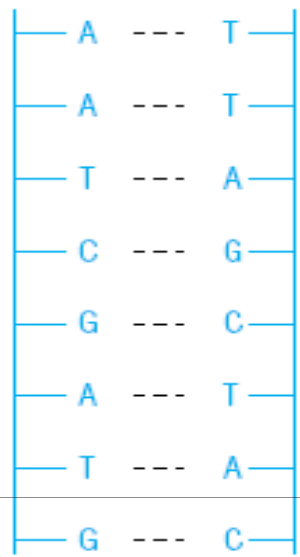
<sup>32</sup>P5'-G-T-C-A-G-G-T-G-A-G-A-C-  
T-X-3'OH

Le brin à séquencer est  
donc:

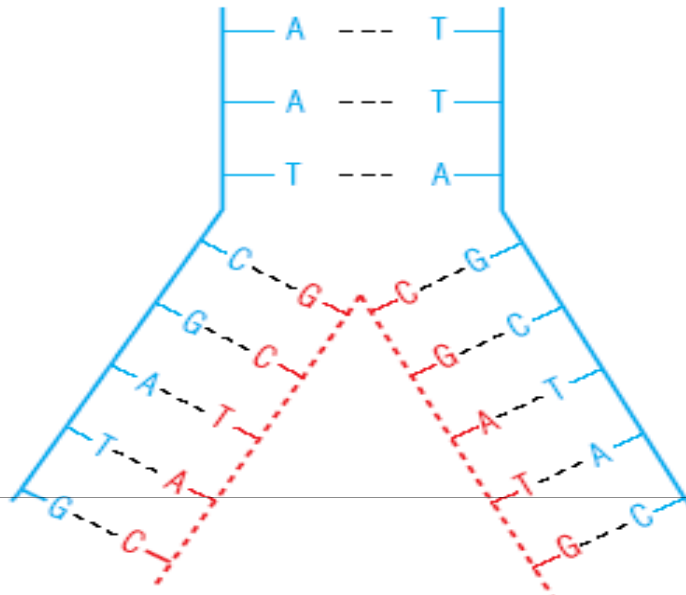
P5'-X-A-G-T-C-T-C-A-C-C-  
T-G-A-C-3'OH

Conservation de l'information génétique:  
Réplication semi-conservative de l'ADN

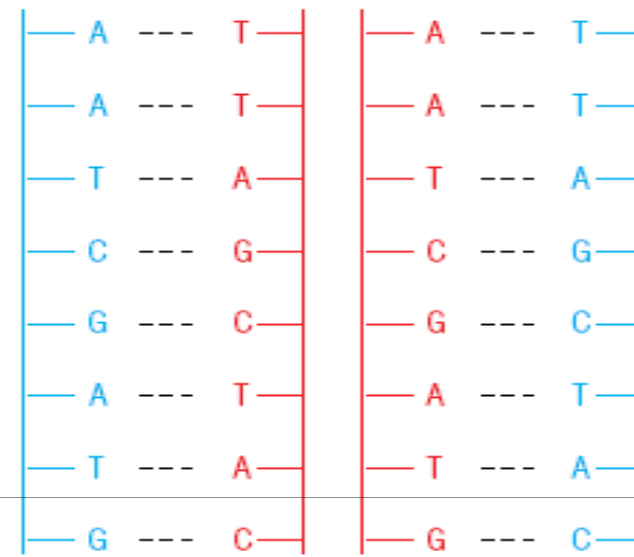
# Réplication semi-conservative de l'ADN



Molécule initiale formée de 2 brins complémentaires



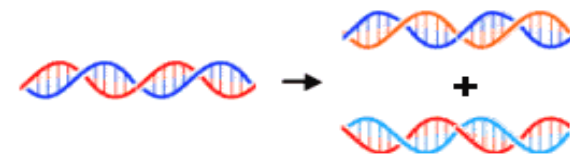
Molécules nouvelles en cours de formation



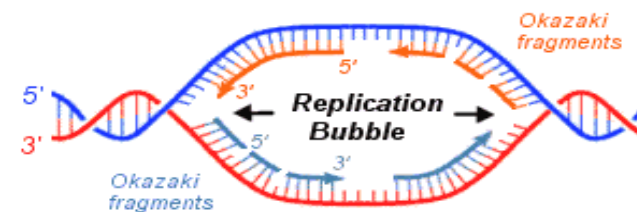
Molécules nouvelles, chacune formée d'un brin ancien et d'un brin nouvellement formé

Les 2 brins d'ADN se séparent.  
Des nucléotides présents dans le milieu viennent s'apparier aux nucléotides de chacun des deux brins de la molécule

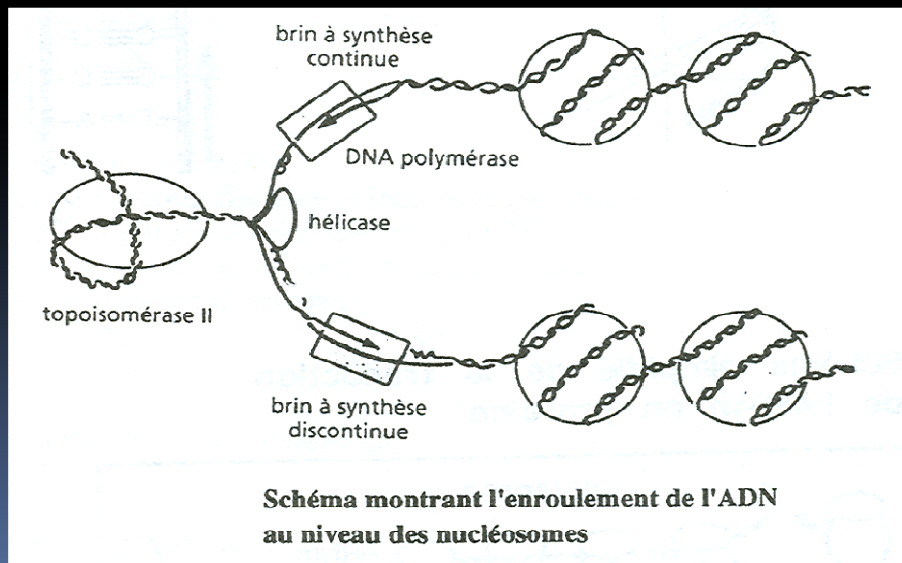
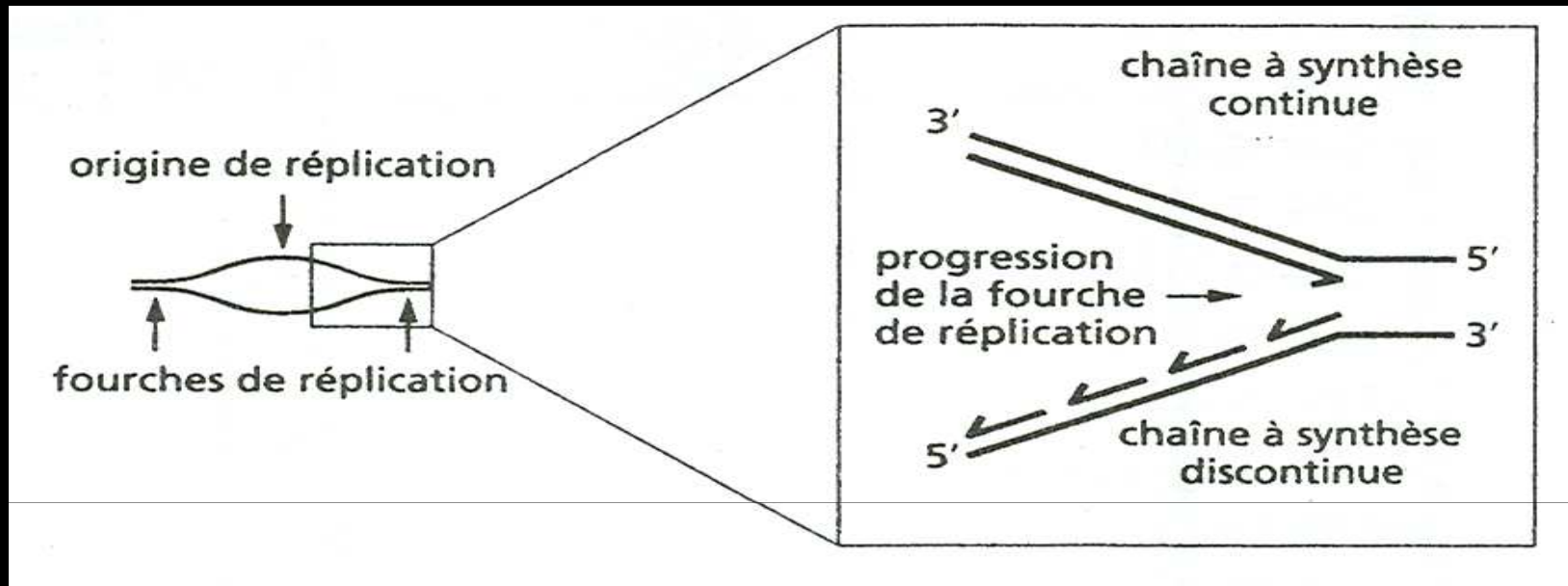
On obtient deux molécules identiques à la molécule de départ



**Semi-conservative Replication**

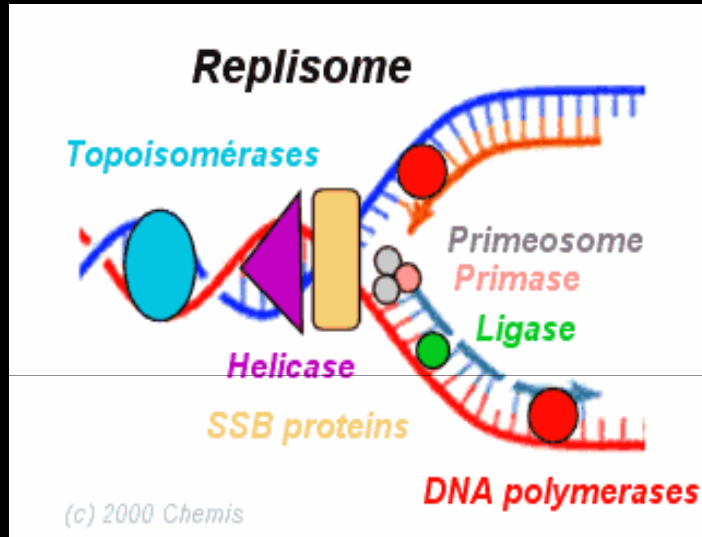


# Réplication semi-conservative de l'ADN

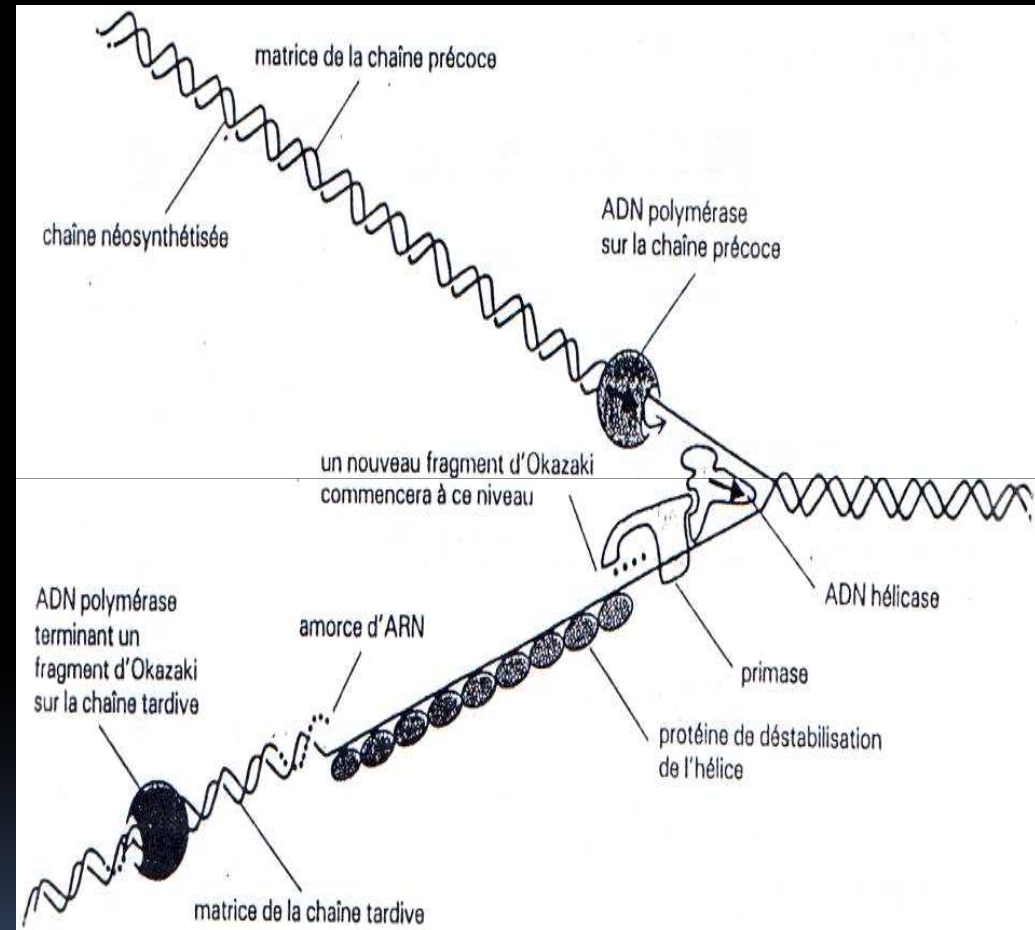


**Photographie au microscope électronique d'ADN en répllication**

# Représentation schématique de la fourche de réplication



Une bulle de réplication s'étendant dans les deux directions



# Etapes de la réplication de l'ADN

## 1. l'initiation

Synthèse des amorces au niveau des origines de réplication.

- a) Reconnaissance de l'origine de réplication par le complexe protéique de réplication
- b) Ouverture de la chaîne par l'hélicase
- c) Synthèse de l'amorce.

## 2 l'élongation

Synthèse de l'ADN dans le sens 5' 3'. Sur le brin également d'ou  
synthèse discontinue  
par petits fragments qui seront collés ensuite.

## 3 la terminaison

Mécanisme encore mal compris. Chez les bactéries des séquences de terminaison (ter) sont reconnues par des facteurs spécifiques (Tus) qui arrêtent la réplication