MEDECINE 2eme ANNEE

GENETIQUE

Dr Bouazdi

Faculté de médecine d'Alger, Janvier 2021

Structure des acides nucléiques

ACIDES NUCLEIQUES

INTRODUCTION

Les acides nucléiques ont été caractérisés chimiquement au début du 20ème siècle même si leur rôle est resté relativement longtemps inexpliqué.

Les acides nucléiques ont été isolés initialement des noyaux des cellules. On distingue deux grands types:

- les acides désoxyribonucléiques (ADN) localisés dans le noyau des cellules et au niveau des mitochondries
- les acides ribonucléiques (ARN)localisés dans le cytoplasme cellulaire.

Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont des macromolécules et comportent des sous-unités appelées *nucléotides*.

Ils jouent également un rôle fondamental dans le métabolisme énergétique sous forme di- et tri-phosphorylée (ATP et GTP) ainsi que dans la transmission de l'information dans la cellule (AMPc et GMPc).

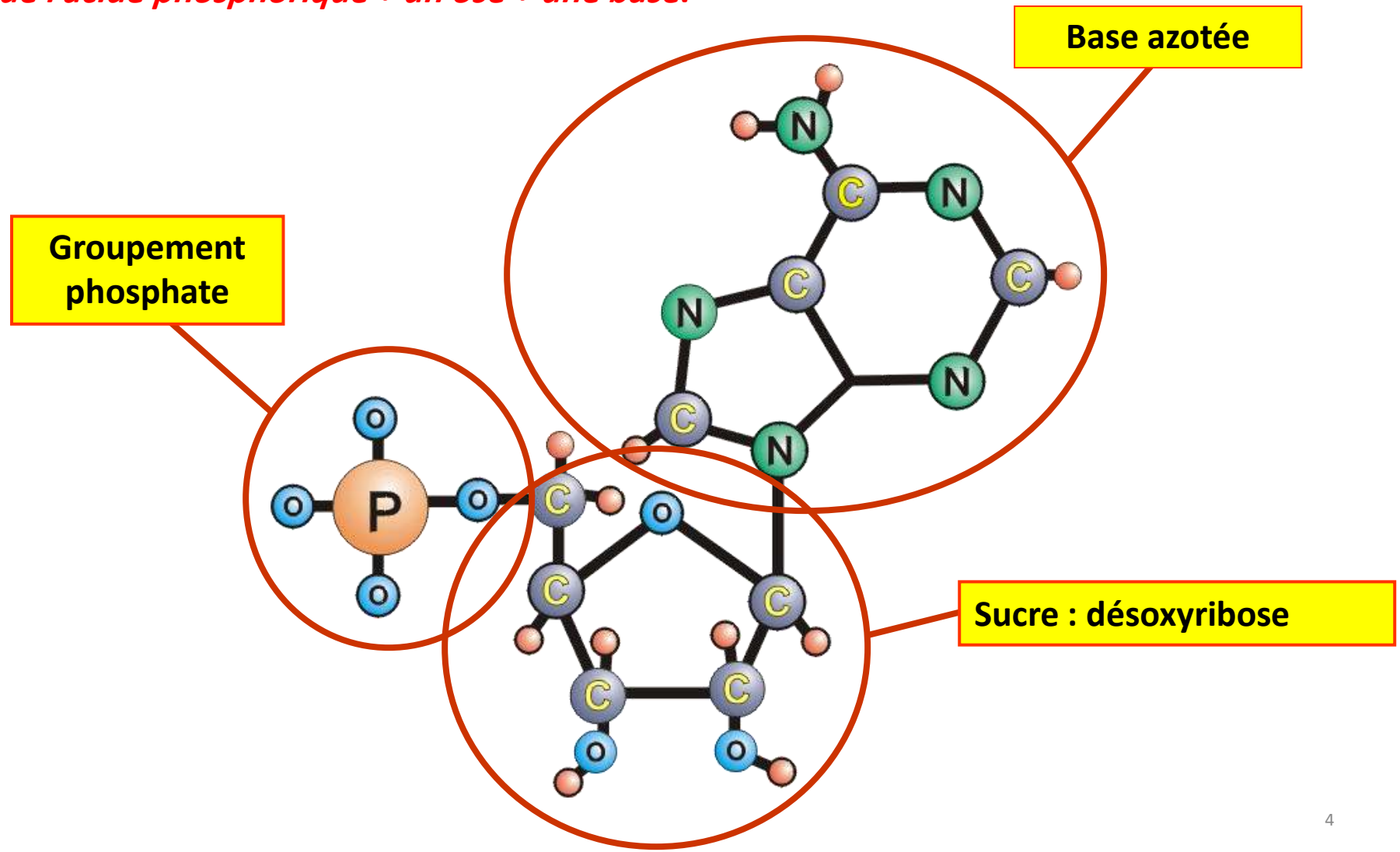
UNITÉ de base de l'ADN = LE NUCLÉOTIDE

Les polynucléotides biologiques sont :
- le support moléculaire de l'information génétique : l'ADN (et ARN pour certains virus) est le support de l'hérédité et du codage des composés biologiques (les ARN, les protéines),
- des effecteurs de l'expression de l'ADN en peptides et protéines : acide ribonucléique dont l'abréviation est ARN (RNA : anglo-saxon) regroupés en trois classes :
- les ARN messagers (ARNm)
- les ARN de transfert (ARNt)
- les ARN ribosomaux (ARNr)

UNITÉ de base de l'ADN = LE NUCLÉOTIDE

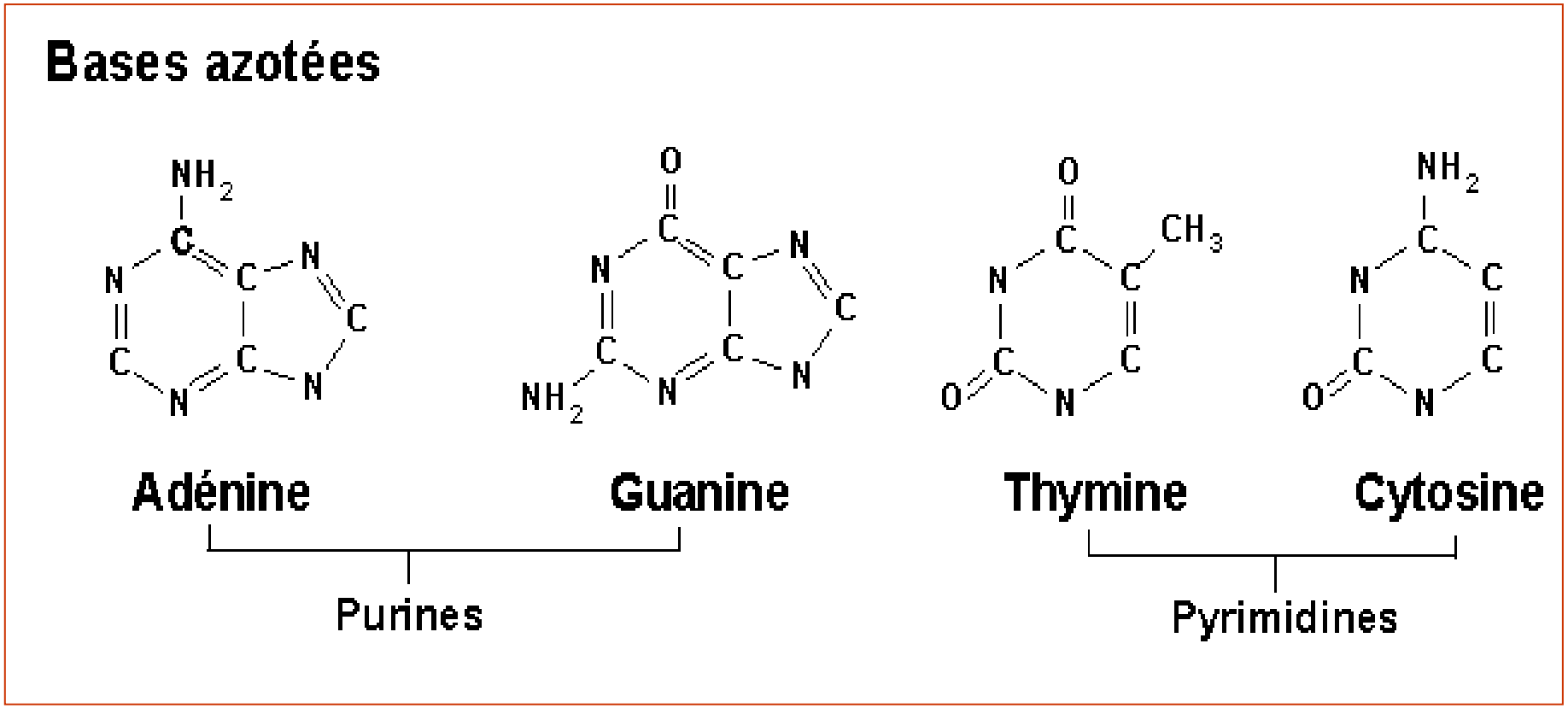
Un nucléotide comporte **trois composants:**

de l'acide phosphorique + un ose + une base.



A- BASES AZOTÉES

Il y a 4 sortes de bases azotées:qui appartiennent à deux classes de molécules selon le noyau aromatique qui en constitue le squelette.

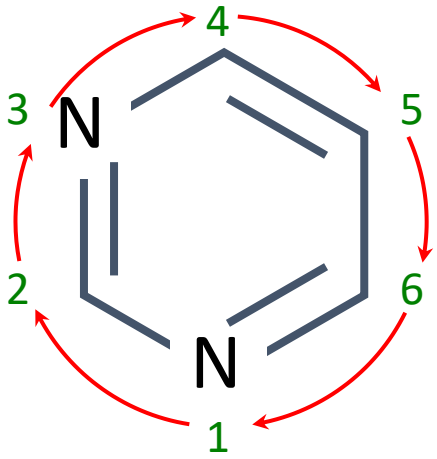


Il peut y avoir plus de AT que de CG ou l'inverse (ça varie selon les espèces), mais il y a toujours autant de A que de T et de C que de G.

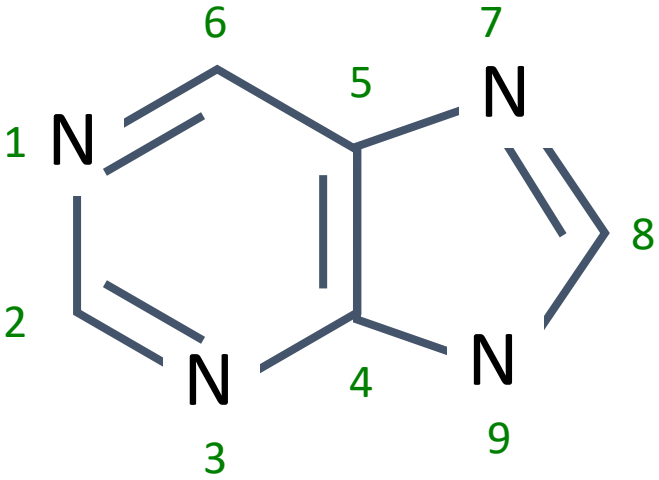
A = T et C = G

2 sortes de bases azotées hétérocycliques

bases pyrimidiques
(noyau pyrimidine)



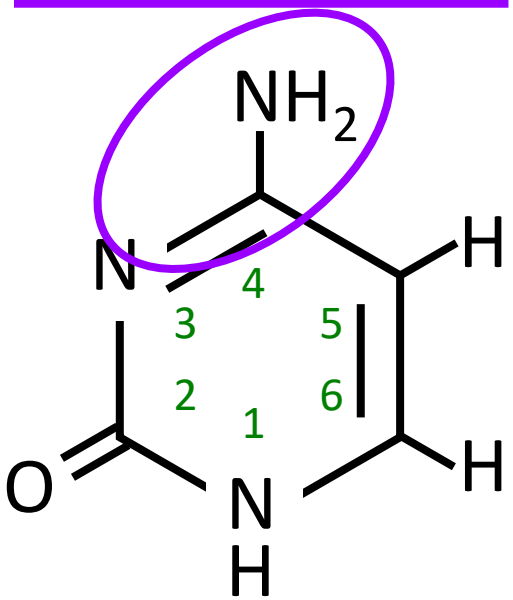
bases puriques
(noyau purine)



Le noyau pyrimidine est le plus simple : c'est un noyau aromatique hexagonal à six atomes, quatre carbones et deux azotes (n° 1 et 3).

1- Bases pyrimidiques

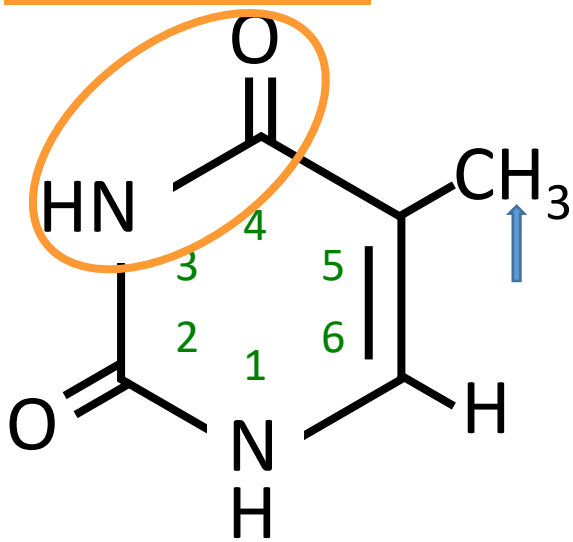
fonction imino-amine



cytosine (C)

ADN/ARN

fonction amide

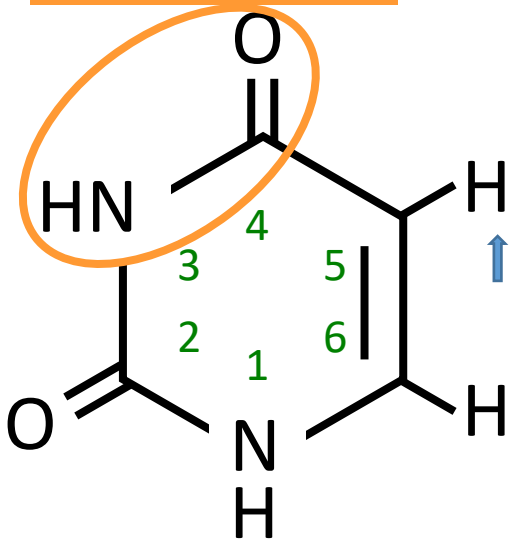


thymine (T)

5-méthyl-uracile

ADN

fonction amide



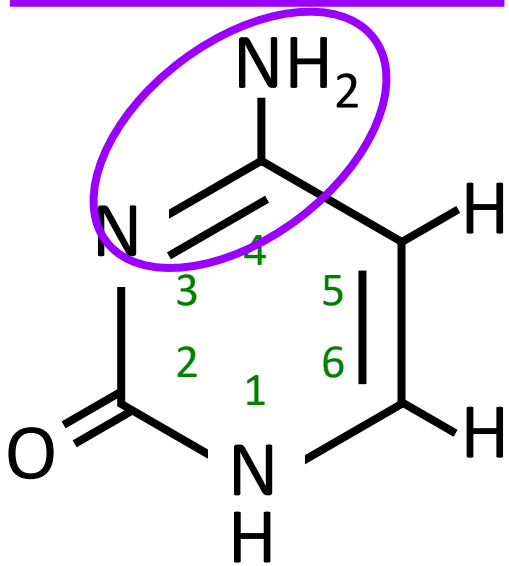
uracile (U)

ARN

Les bases pyrimidiques sont au nombre de 3 : la cytosine, la thymine et l'uracile

- **La cytosine :le carbone 4 est substitué par une fonction amine et le carbone 2 par une fonction cétone.**
- **L'uracile : les carbones 2 et 4 portent des fonctions cétone.**
- **La thymine : les carbones 2 et 4 portent des fonctions cétone, le carbone 5 est substitué par un méthyl.**

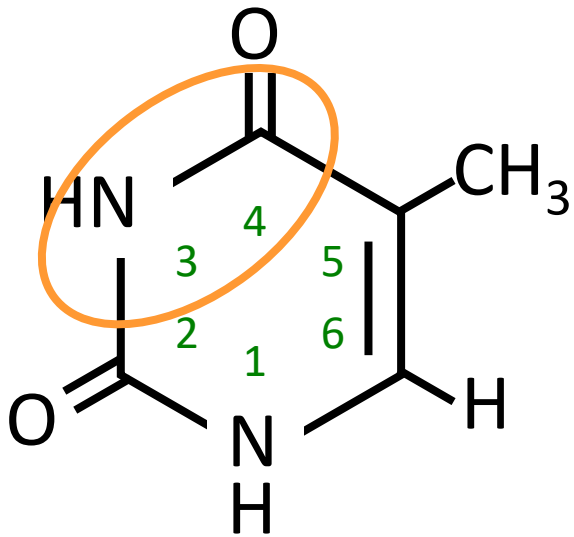
fonction imino-amine



cytosine (C)

ADN/ARN

fonction amide

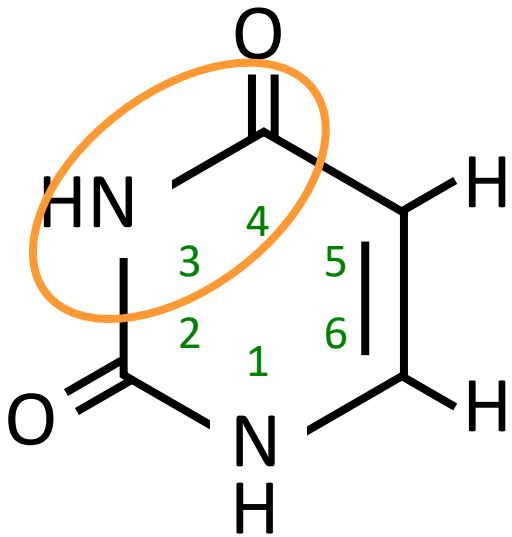


thymine (T)

5-méthyl-uracile

ADN

fonction amide



uracile (U)

ARN

La désamination oxydative de la **cytosine** en **uracile**:

•Dans l'ADN, *l'uracile sera réparé par des enzymes de réparation*

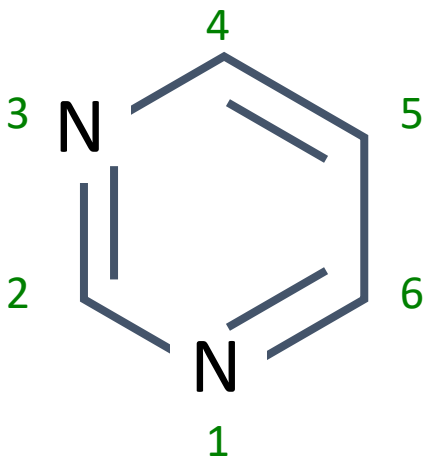
•Dans l'ARN, ces changements ne sont pas graves car la durée de vie de l'ARN et des protéines est courte.

L'absence de T permet la **reconnaissance de l'ARN** pour les enzymes de dégradation et un gain d'énergie.

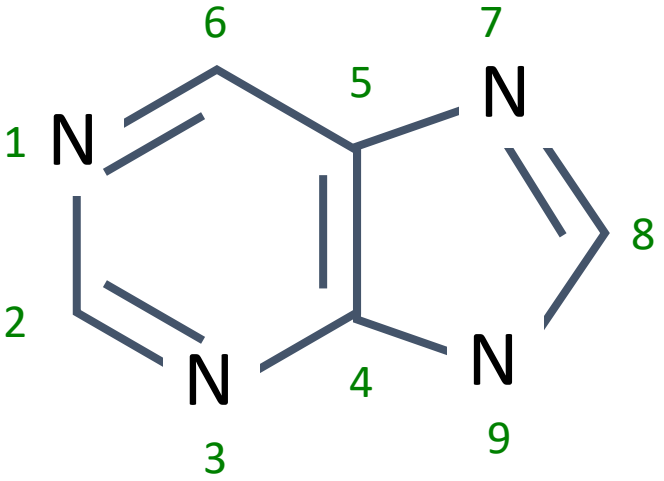
***La désamination oxydative* de la cytosine Methylée → Thymine (pas de réparation) : Dans L'ADN, elle est source de mutations (Pts chauds de mutations ou hot spot fréquente dans les ilots CG)**

2 - Bases puriques

bases pyrimidiques
(noyau pyrimidine)



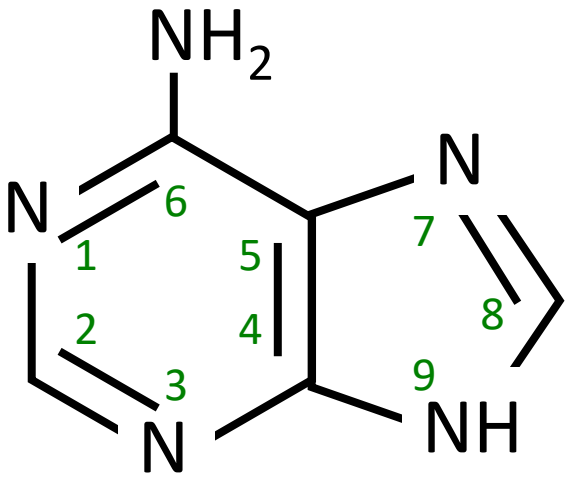
bases puriques
(noyau purine)



Les purines ont un double noyau aromatique comportant :

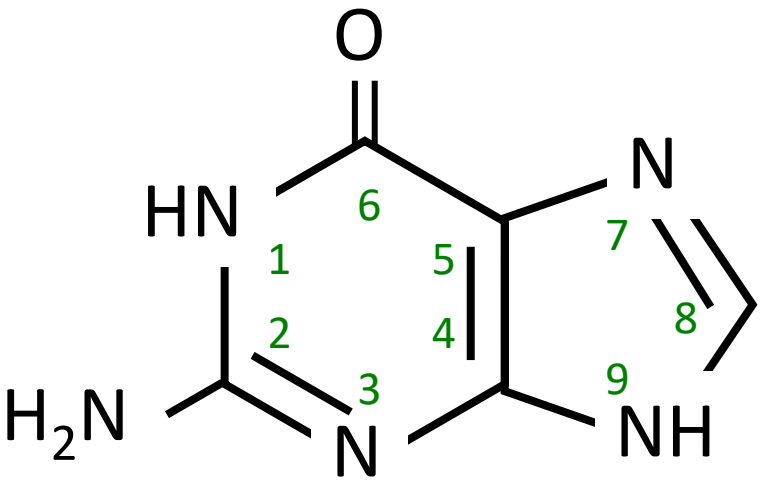
- **à gauche : un cycle hexagonal de 4 carbones et 2 azotes**
- **à droite : un cycle pentagonal de 3 carbones (dont 2 communs avec le précédent) et 2 azotes.**

BASES PURIQUES



adénine (A)

ADN/ARN



guanine (G)

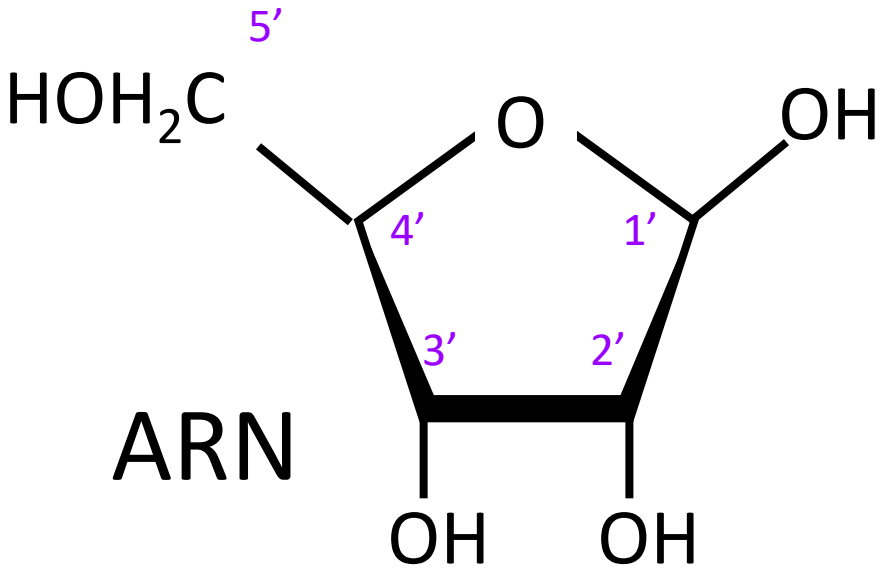
ADN/ARN

Les bases puriques sont au nombre de 2 : l'adénine et la guanine.
L'adénine : le carbone 6 est substitué par une fonction amine. Elle est la seule des bases nucléiques dont la formule ne contient pas d'atome d'oxygène.
• La guanine :le carbone 2 est substitué par une fonction amine et le carbone 6 par une fonction cétone.

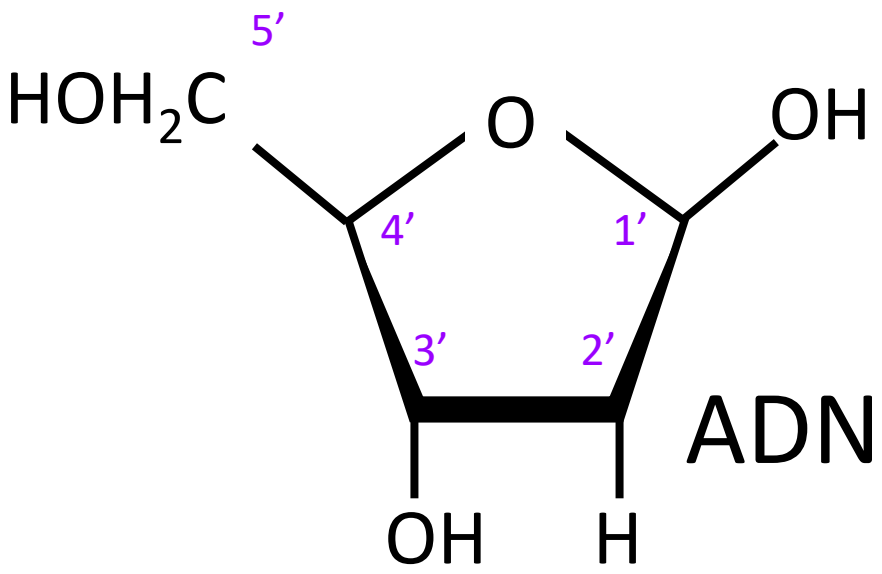
ACIDES NUCLEIQUES

2- Le Pentose = deux sortes de sucres

D-ribose



D-désoxyribose
(2'-désoxyribose)

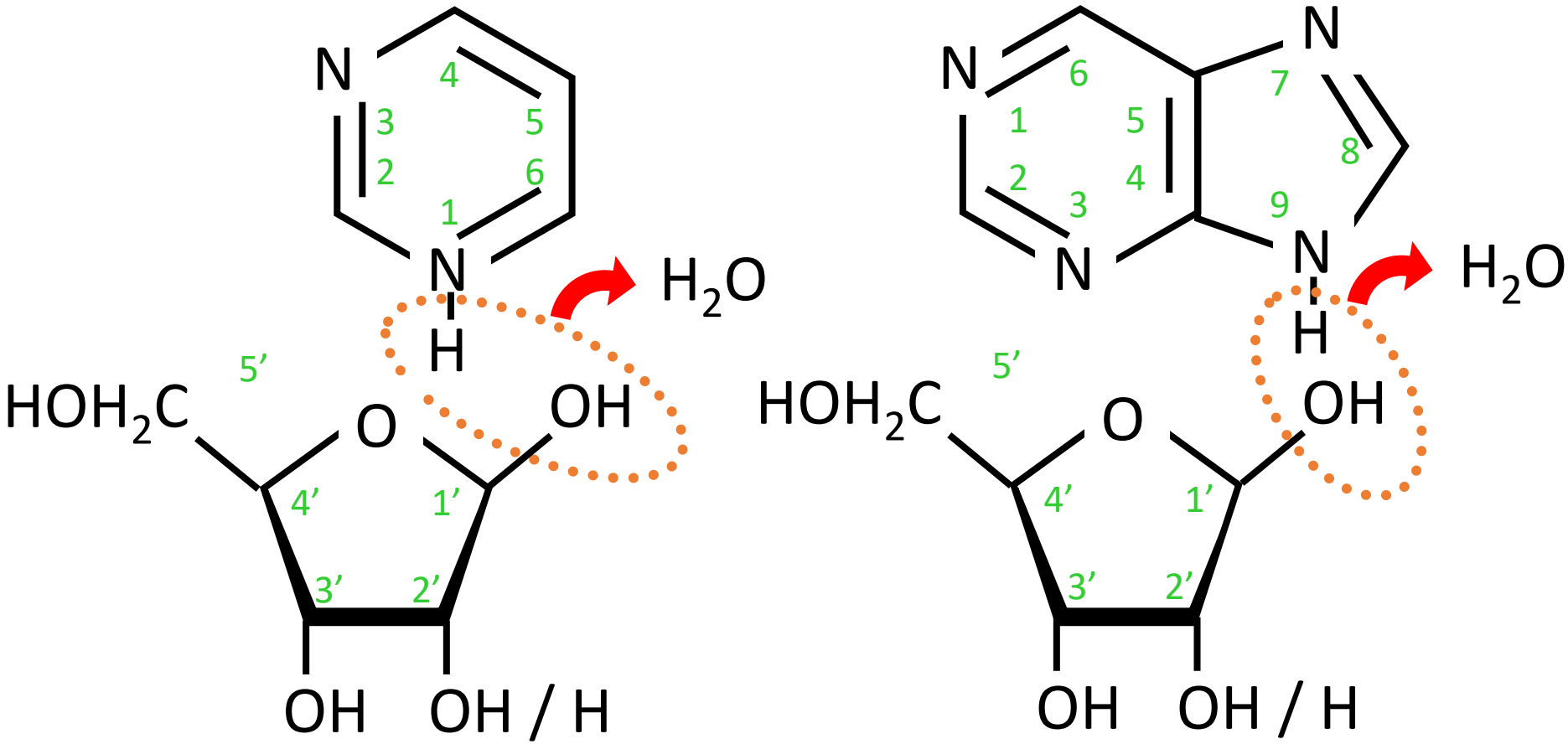


pentoses sous forme furanique (5 atomes dans le cycle)

Le désoxyribose, est dérivé du ribose par une réduction de la fonction alcool secondaire du carbone n°2 qui confère à l'Acide Nucléique une plus grande stabilité propre à sa fonction de conservation de l'information génétique.

ACIDES NUCLEIQUES

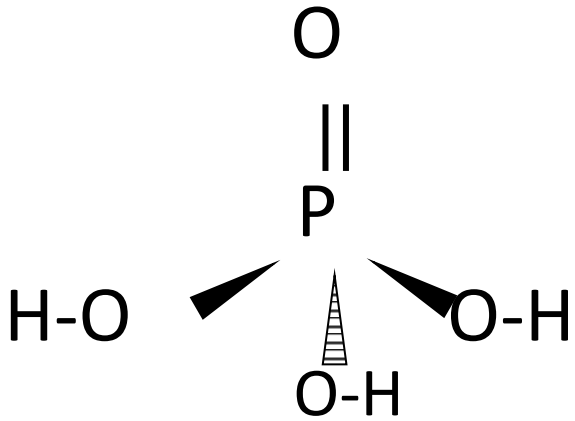
Liaison base-sucre → nucléoside



Les sucres (ribose ou désoxyribose) 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 (carbone réducteur ou fonction semi-acétalique). **Ce sont des liaisons N-osidiques.**

ACIDES NUCLEIQUES

3 - acide phosphorique : H_3PO_4



Les différentes fonctions acides ont des pK_a variables.

L'acide phosphorique (H_3PO_4) possède *trois fonctions acide*.

- **Deux de ces fonctions sont estérifiées dans les ADN et les ARN.**
- **La troisième fonction acide est libre.**

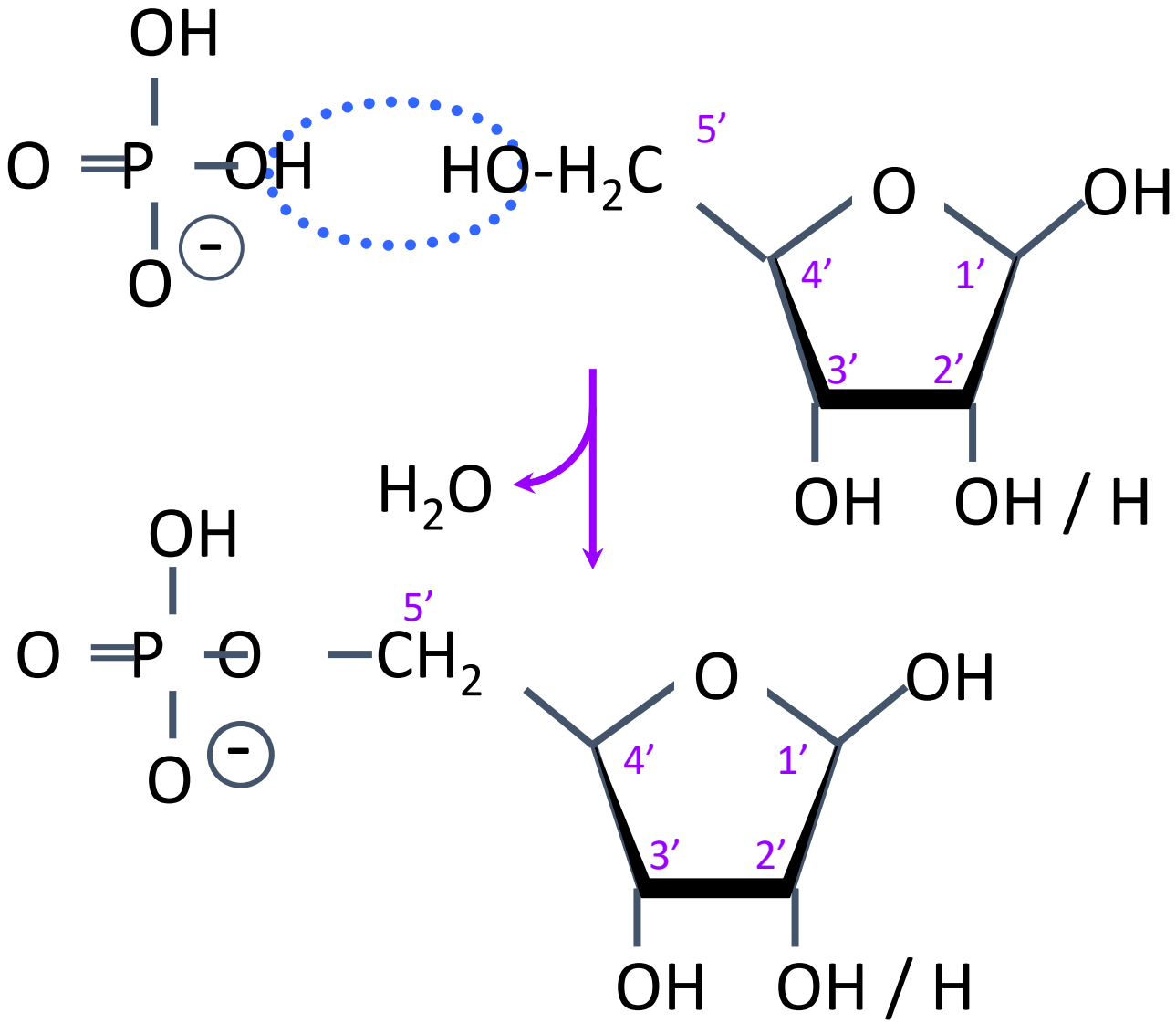
L'H3PO4 permet la solubilisation de l'ADN dans l'eau grâce à leurs charges (-)

Il est responsable de la fonction acides des acides nucléiques.

Les H3PO4 permettent la polymérisation des acides nucléiques (nucléotides).

ACIDES NUCLEIQUES

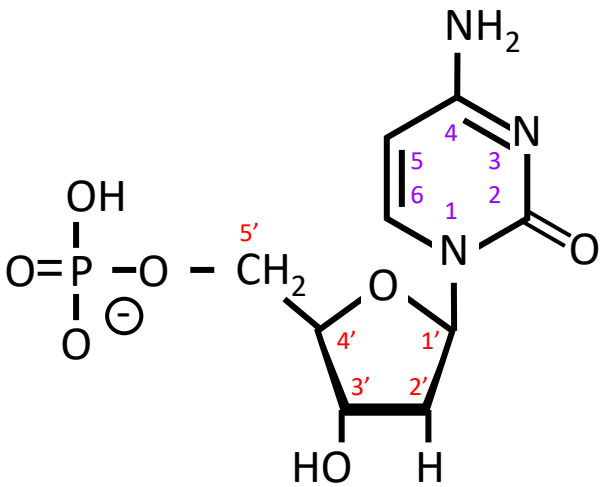
Liaison acide phosphorique-sucre= **Estérification**



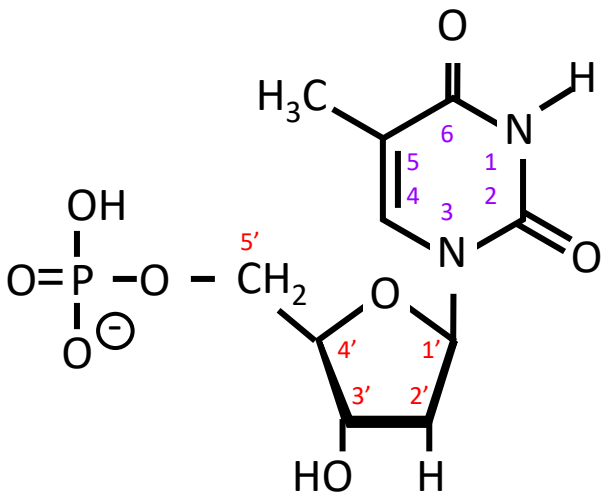
ACIDES NUCLEIQUES

Liaison base-sucre - acide phosphorique ⟶ nucléotide

nucléotides pyrimidiques



désoxycytosine-5'-monophosphate
(dCMP)



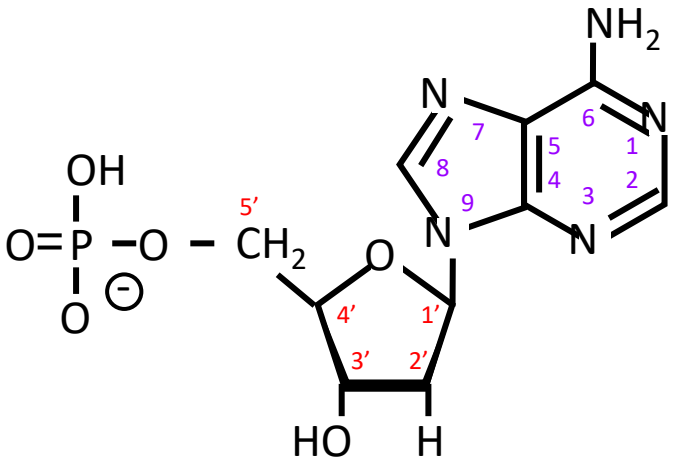
désoxythymidine-5'-monophosphate
(dTMP)

La liaison d'un nucléoside avec un phosphate se fait par une estérification de la fonction alcool laire (C 5') du sucre et une des 3 fonctions acides du phosphate.

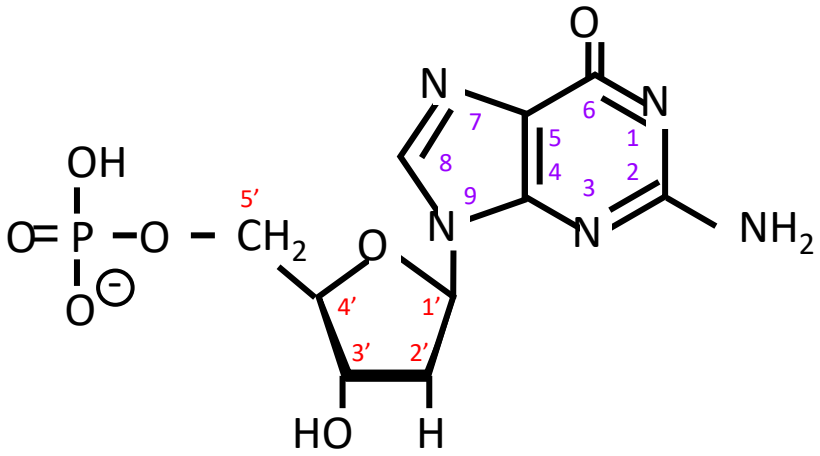
• L'ester obtenu est un nucléotide = formé d'une base azotée, liée par une liaison osidique avec un sucre, lui-même lié par une liaison ester avec un phosphate.

ACIDES NUCLEIQUES

nucléotides puriques



désoxyadénosine-5'-monophosphate
(dAMP)



désoxyguanosine-5'-monophosphate
(dGMP)

La liaison d'un nucléoside avec un phosphate se fait par une estérification de la fonction alcool 1aire (C 5') du sucre et une des 3 fonctions acides du phosphate.

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

ACIDES NUCLEIQUES

Dans les cellules les nucléotides sont retrouvés sous forme nuléosides mono, di- et triphosphates

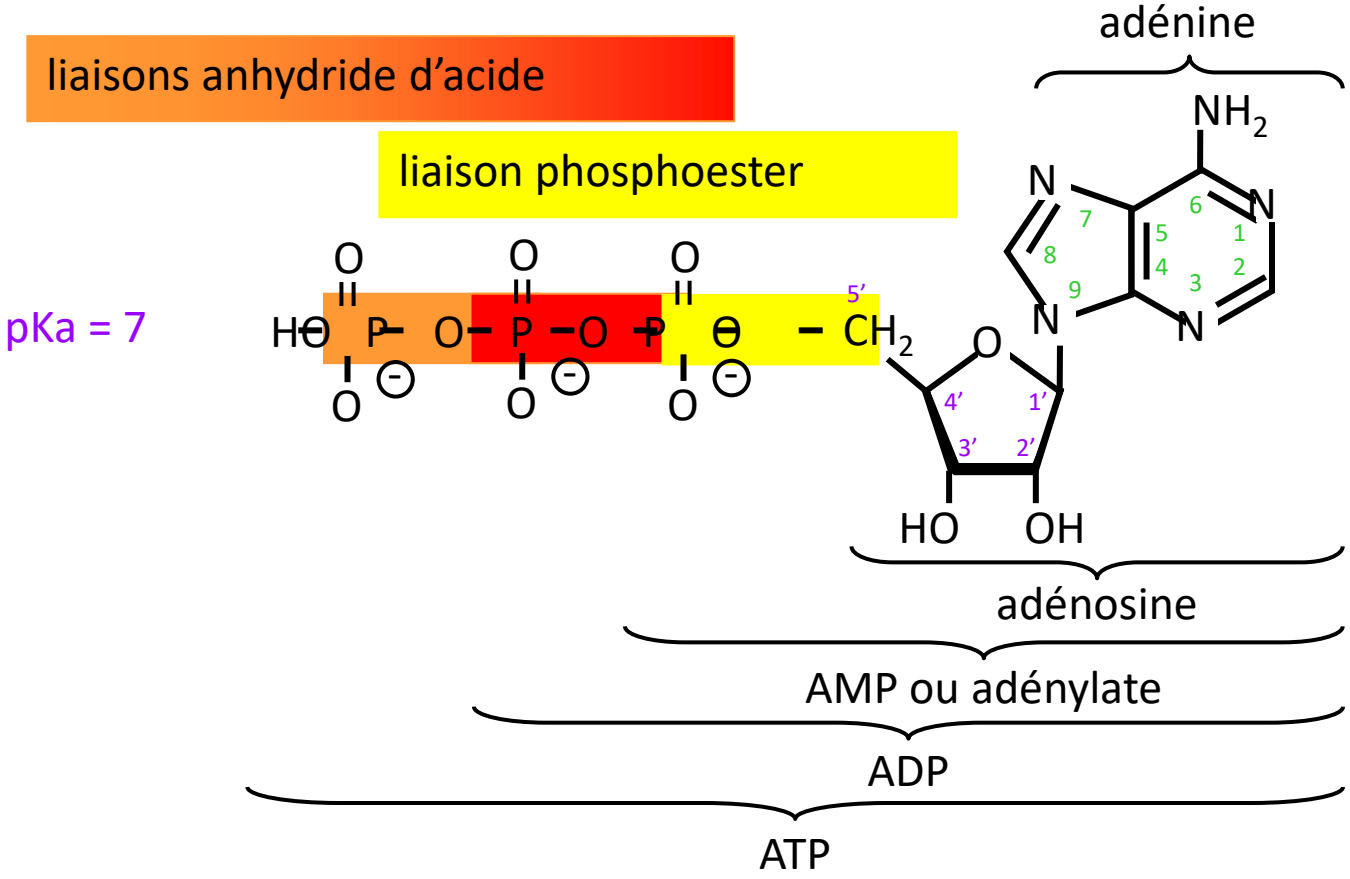


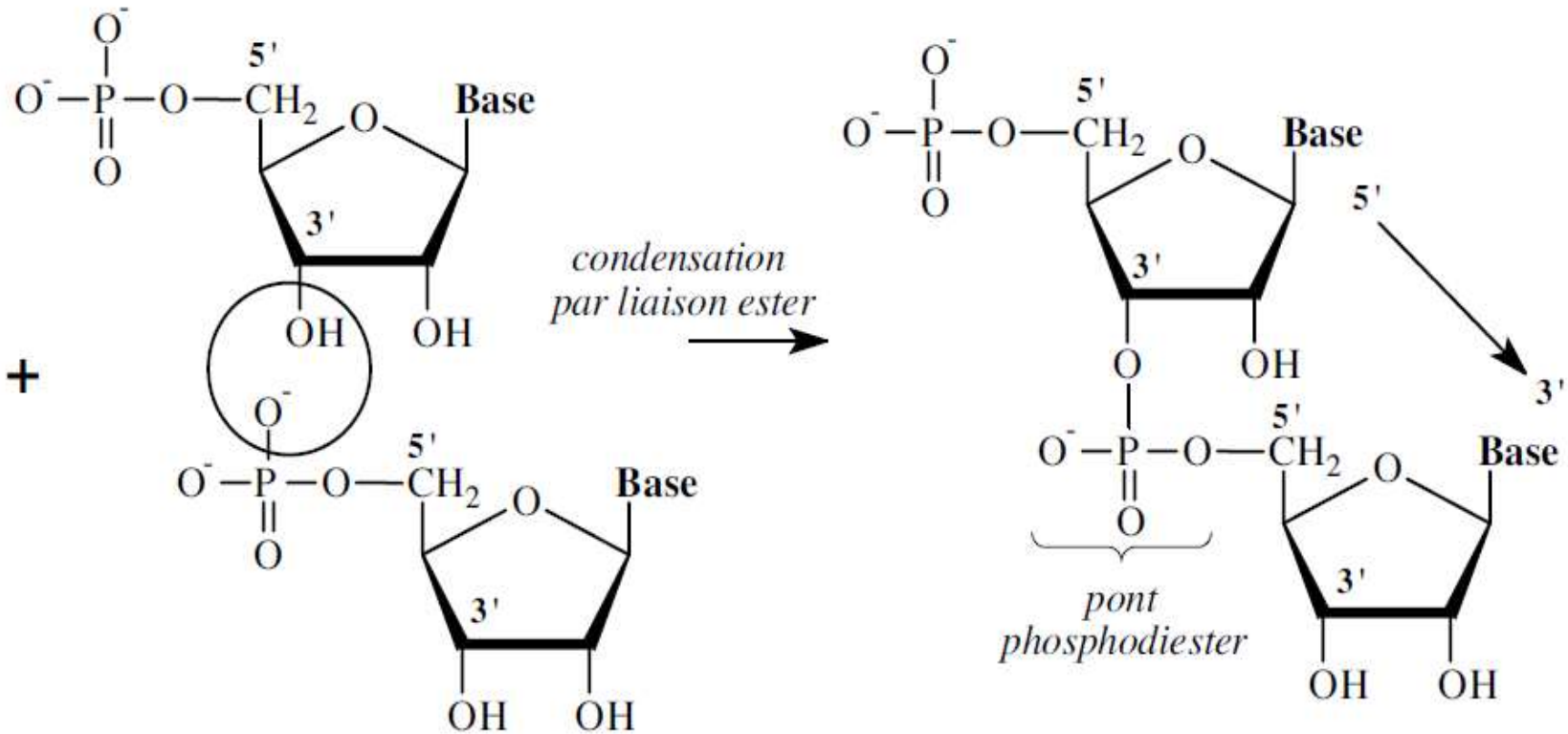
TABLEAU I. Nomenclature des principaux nucléotides.

BASE	NUCLEOSIDE	NUCLEOTIDE	ARN monophosphate	ADN monophosphate	CODE
adénine	adénosine	acide adénylique	AMP	dAMP	A
guanine	guanosine	acide guanylique	GMP	dGMP	G
cytosine	cytidine	acide cytidylique	CMP	dCMP	C
thymine	thymidine	acide thymidylique		dTMP	T
uracile	uridine	acide uridylique	UMP		U

- ***On désigne par nucléotides les nucléosides monophosphates : AMP ou acide adénylique, dTMP ou acide désoxythymidylique, etc...***
- ***Les nucléosides polyphosphates sont des diphosphates : ADP ou GDP... ou encore des triphosphates, les plus riches en énergie : ATP ou GTP ; etc...***
- ***Les acides nucléiques sont formés par une polycondensation de nucléotides AMP, CMP, GMP et UMP pour les acides ribonucléiques, dAMP, dCMP, dGMP et dTMP pour les acides désoxyribonucléiques***

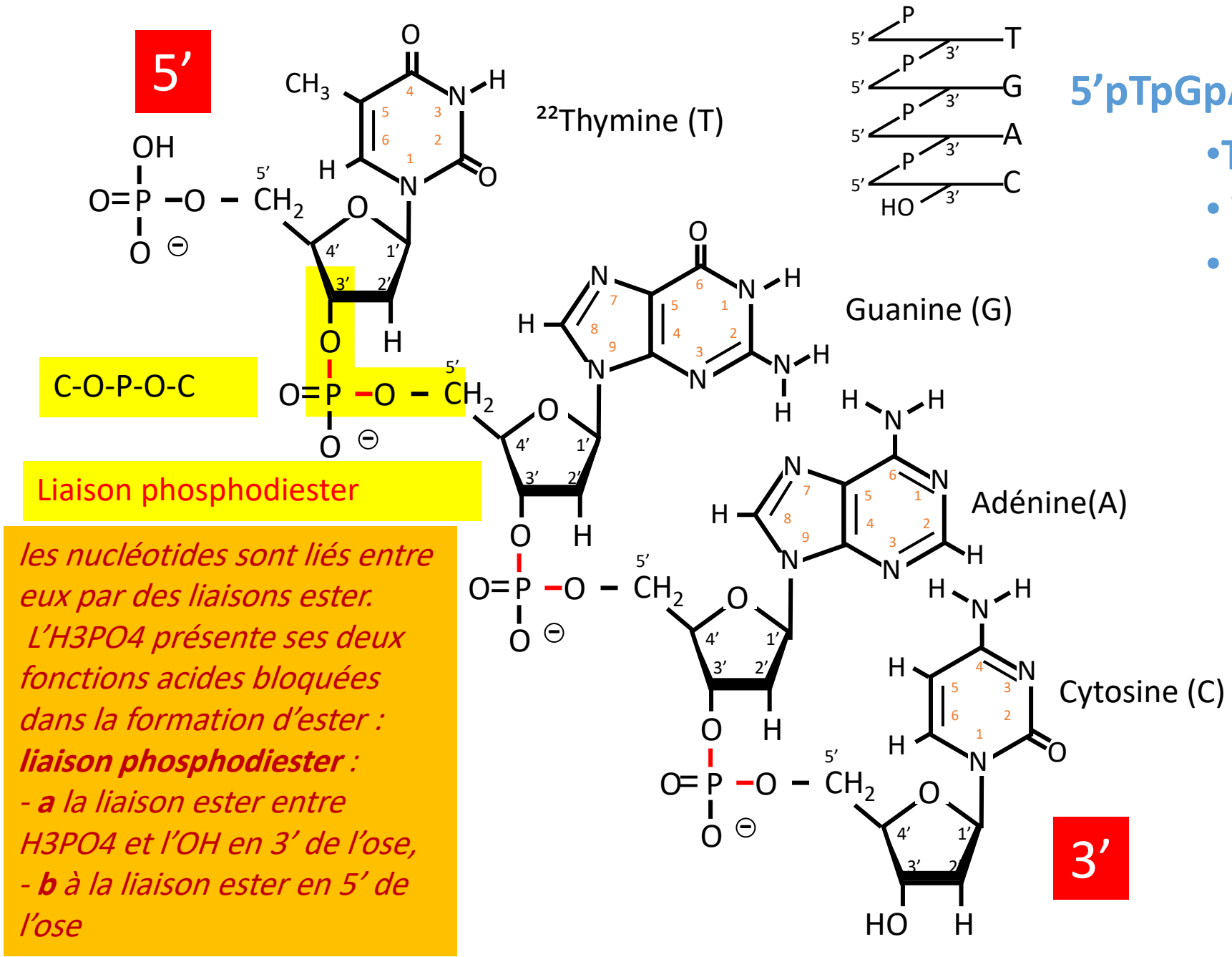
La liaison phosphodiester

Les acides nucléiques sont des enchaînements de nucléosides 5'-phosphate dont l'assemblage est réalisé par une liaison phosphodiester :



La chaîne est **vectorisée** : elle est écrite de gauche à droite et dans le sens, extrémité phosphate 5' → 3' . C'est le sens dans lequel les séquences d'acides nucléiques sont utilisées comme molécules informationnelles (transcription, traduction).

ACIDES NUCLEIQUES : *NOMENCLATURES*

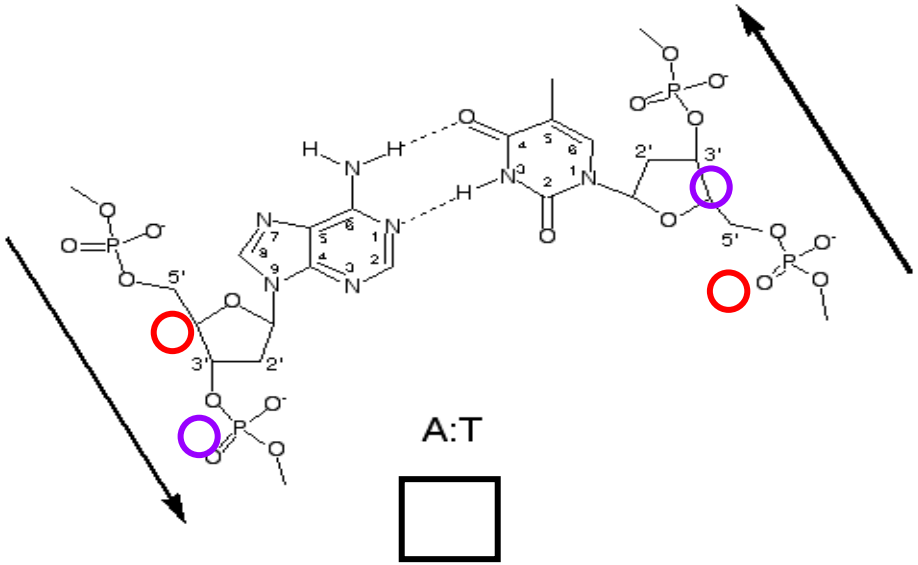


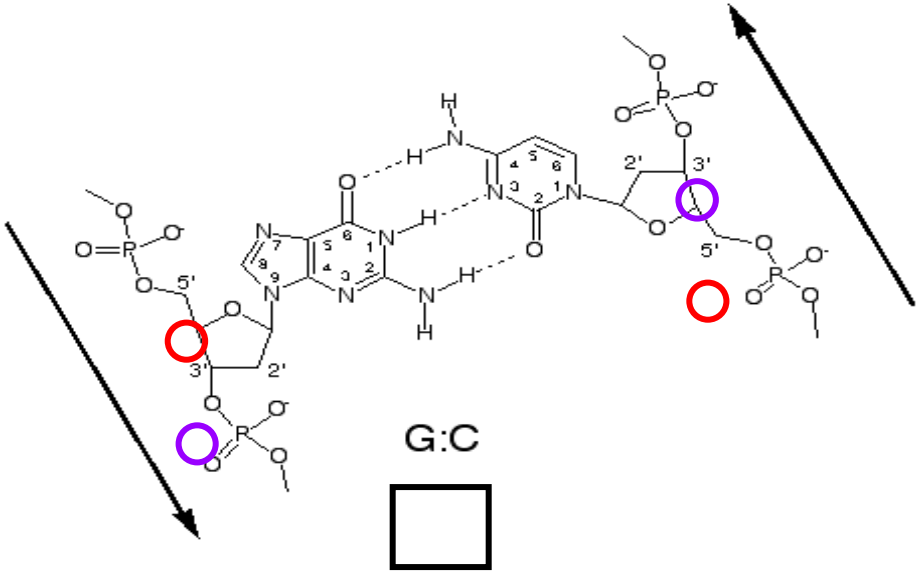
5’pTpGpApC 3’

- **TGAC**
- **TgAC**
- **tgac**

les nucléotides sont liés entre eux par des liaisons ester.
L’H3PO4 présente ses deux fonctions acides bloquées dans la formation d’ester :
***liaison phosphodiester** :*
*- **a** la liaison ester entre H3PO4 et l’OH en 3’ de l’ose,*
*- **b** à la liaison ester en 5’ de l’ose*

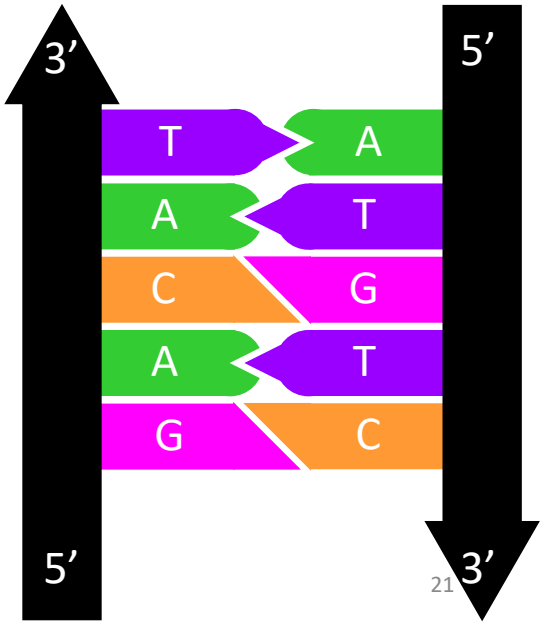
Sens de lecture d'un acide nucléique:





Par convention, on lit toujours un acide nucléique dans le sens de **l'extrémité 5'** comportant en règle un groupement phosphate) vers **l'extrémité 3'** qui possède un **OH libre**.

La séquence des bases d'un ADN par convention sera écrite soit dans le sens vertical ou dans le sens horizontal en précisant les extrémités 5' et 3' et on indique seulement les bases correspondantes (A, T, G ou C).



ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE

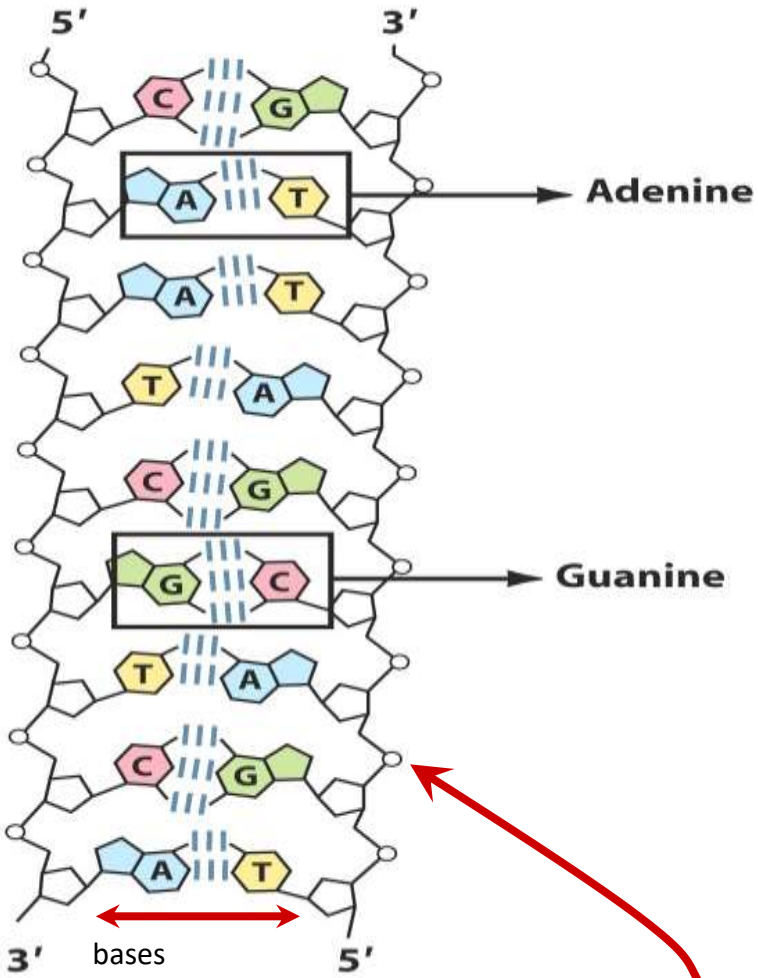
Les ADN présentent plusieurs caractéristiques propres et qui les opposent aux ARN:

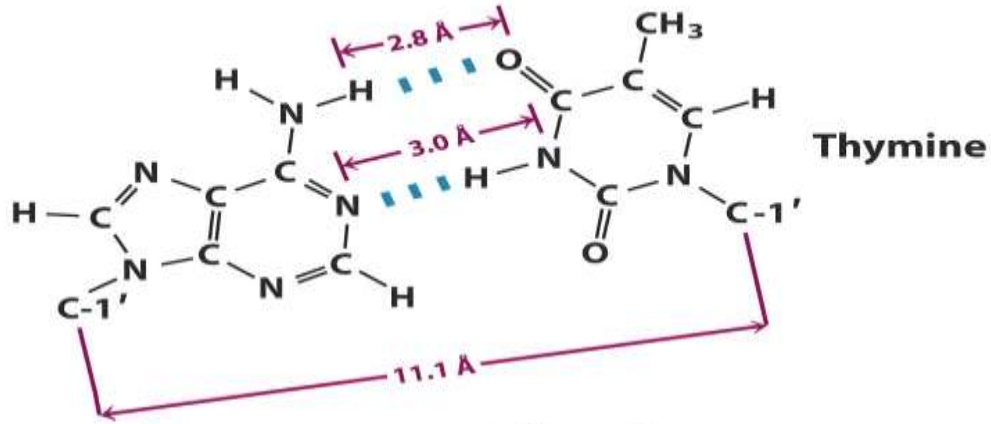
- *L'ose*: le 2'-désoxyribose (remplacé par le ribose dans les ARN).
- *Les bases*: **A, C, G et T**, soit 2 bases puriques A et G et 2 bases pyrimidiques :C et G. Dans les ARN, T est remplacé par U (uracile).
- *Les polymères de nucléotides*: La molécule d'ADN est constituée en règle de **deux chaînes** (ou brins) de nucléotides contrairement aux molécules d'ARN qui sont le plus souvent sous forme d'un seul brin.

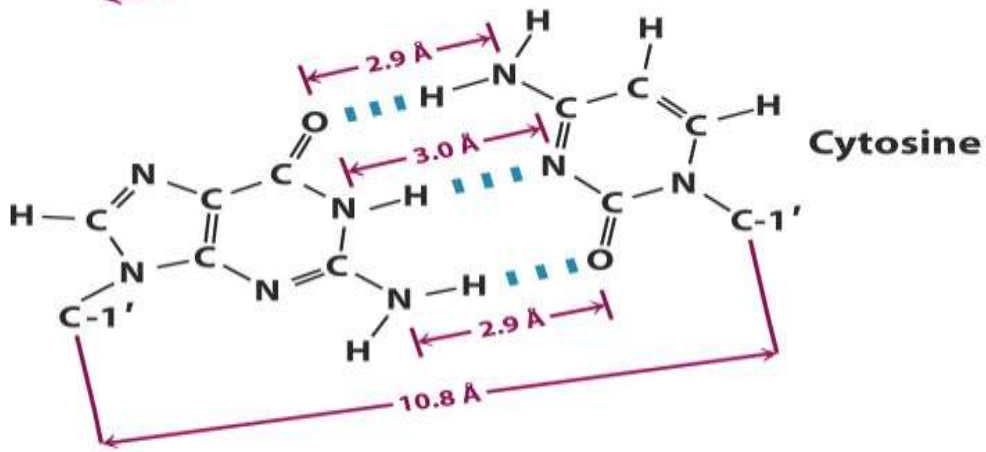
Structure de l'ADN

- L'ADN est formé de deux chaînes de polynucléotides ***antiparallèles*** (vont dans des directions opposées);
- Les bases sont presque **perpendiculaires** à l'axe (inclinaison de 6°);
- Les bases sont enfouies à l'intérieur de la structure, avec le squelette sucre-phosphate à l'extérieur;
- Les deux chaînes sont maintenues ensemble via la formation de ponts H entre bases azotées:
  - A forme 2 ponts H avec T (paire de base AT)
  - G forme 3 ponts H avec C (paire de base GC)
- Cette relation A:T et G:C dicte la ***complémentarité*** des deux chaînes:
  - La nature de la base sur un brin donne immédiatement la nature de la base sur le brin opposé;

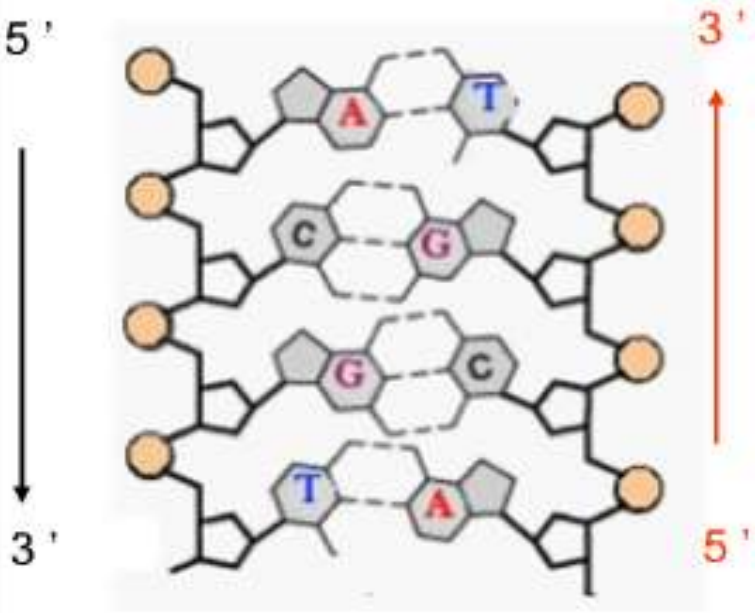
Structure de l'ADN

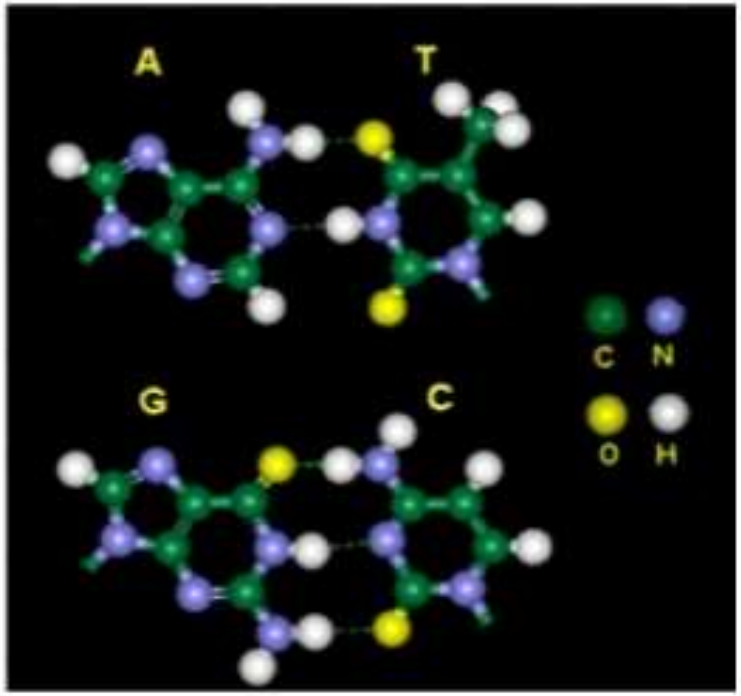






Squelette sucre-phosphate





- polarité 5 ' - 3 ' : séquence = 5 ' ACGT---
- 2 brins antiparallèles
- les bases sont complémentaires et forment des paires (pb) : A / T et G / C
- les bases sont associées par des liaisons hydrogène
- liaisons hydrophobes, Van der Waals, cations...
- A+T / G+C = constante d 'espèce

Species	A:T	G:C	A:G
Human being	1.00	1.00	1.56
Salmon	1.02	1.02	1.43
Wheat	1.00	0.97	1.22
Yeast	1.03	1.02	1.67
Escherichia coli	1.09	0.99	1.05

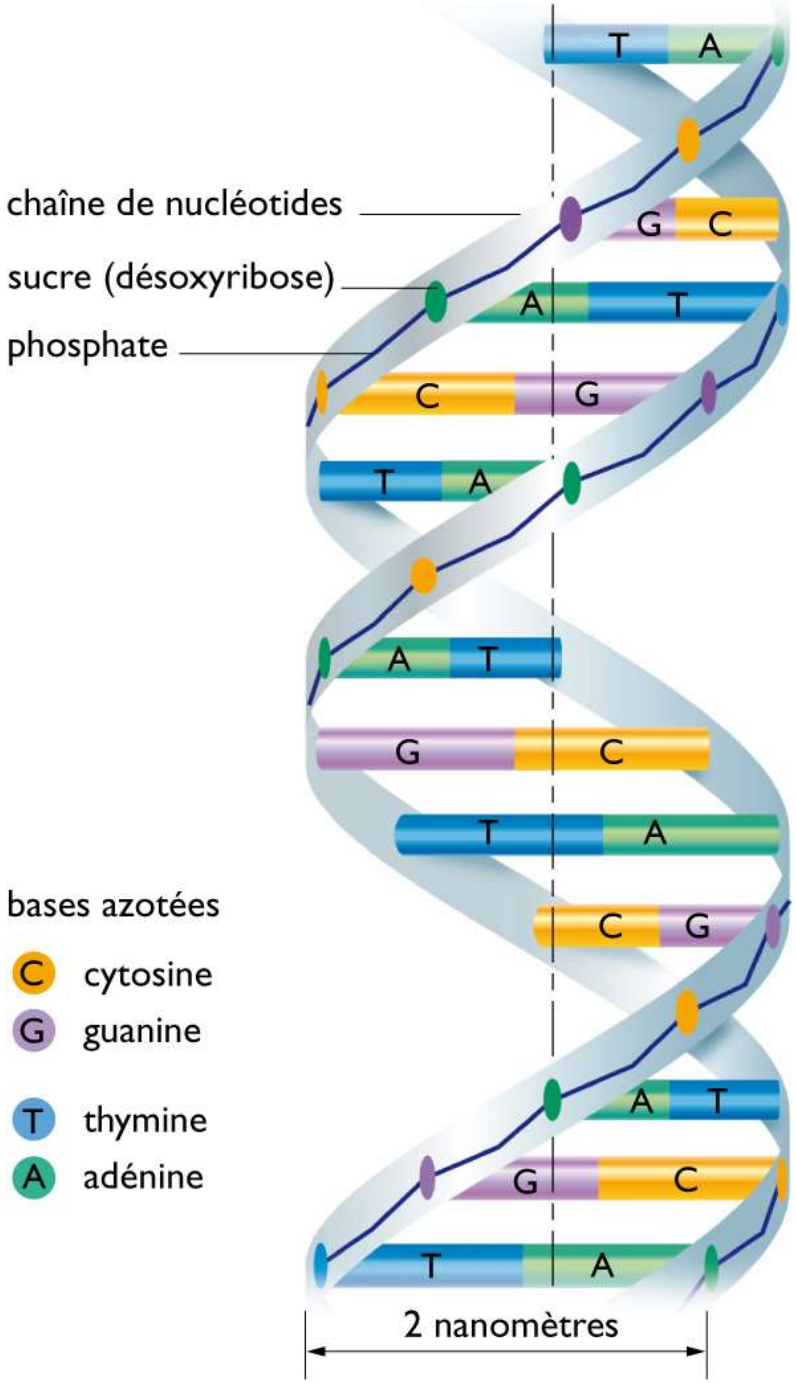
LE GENOME DU **VIRUS** DE L'**HEPATITE B**	LE GENOME DE **E. COLI**	LE GENOME D'UNE **CELLULE HUMAINE**
3182 PAIRES DE BASES	3 MILLIONS DE PAIRES DE BASES (3.10^6bp)	3 MILLIARDS DE PAIRES DE BASES (3.10^9bp)
1 page de 3000 caractères	une encyclopédie de 1000 pages (3000/page)	1000 encyclopédies de 5 cm d'épaisseur: 50 m de haut (20 étages) 1,40 m d'information génétique Dans un individu: une fois la distance terre-lune

La structure secondaire:

L'ADN est formé de deux chaînes antiparallèles, complémentaires et hélicoïdales.

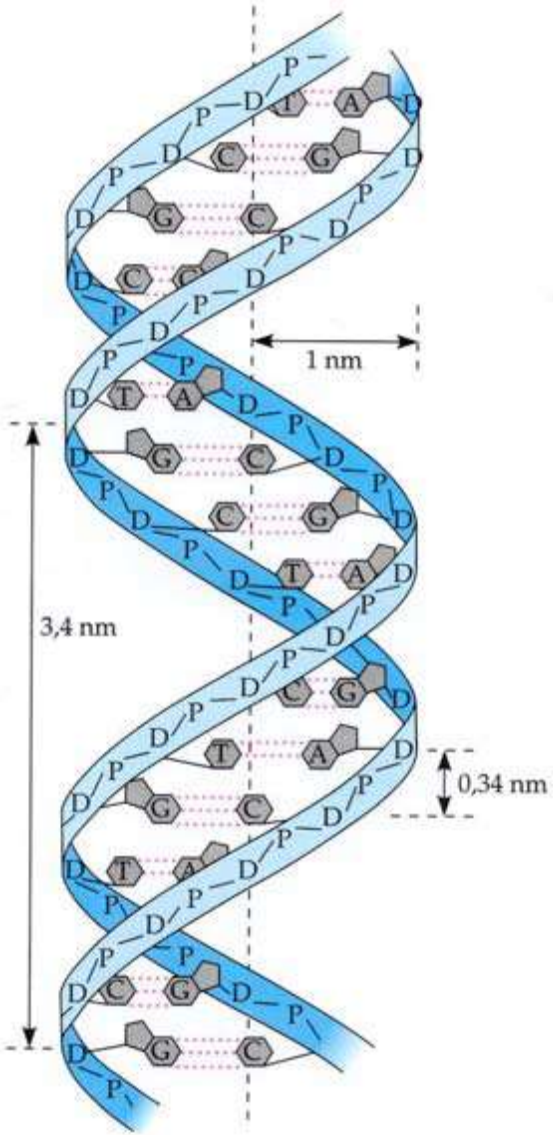
L'ADN est bicaténaire: c'est un original, il faut une sauvegarde.

Chaque brin est le back up de l'autre.



Structure de l'ADN

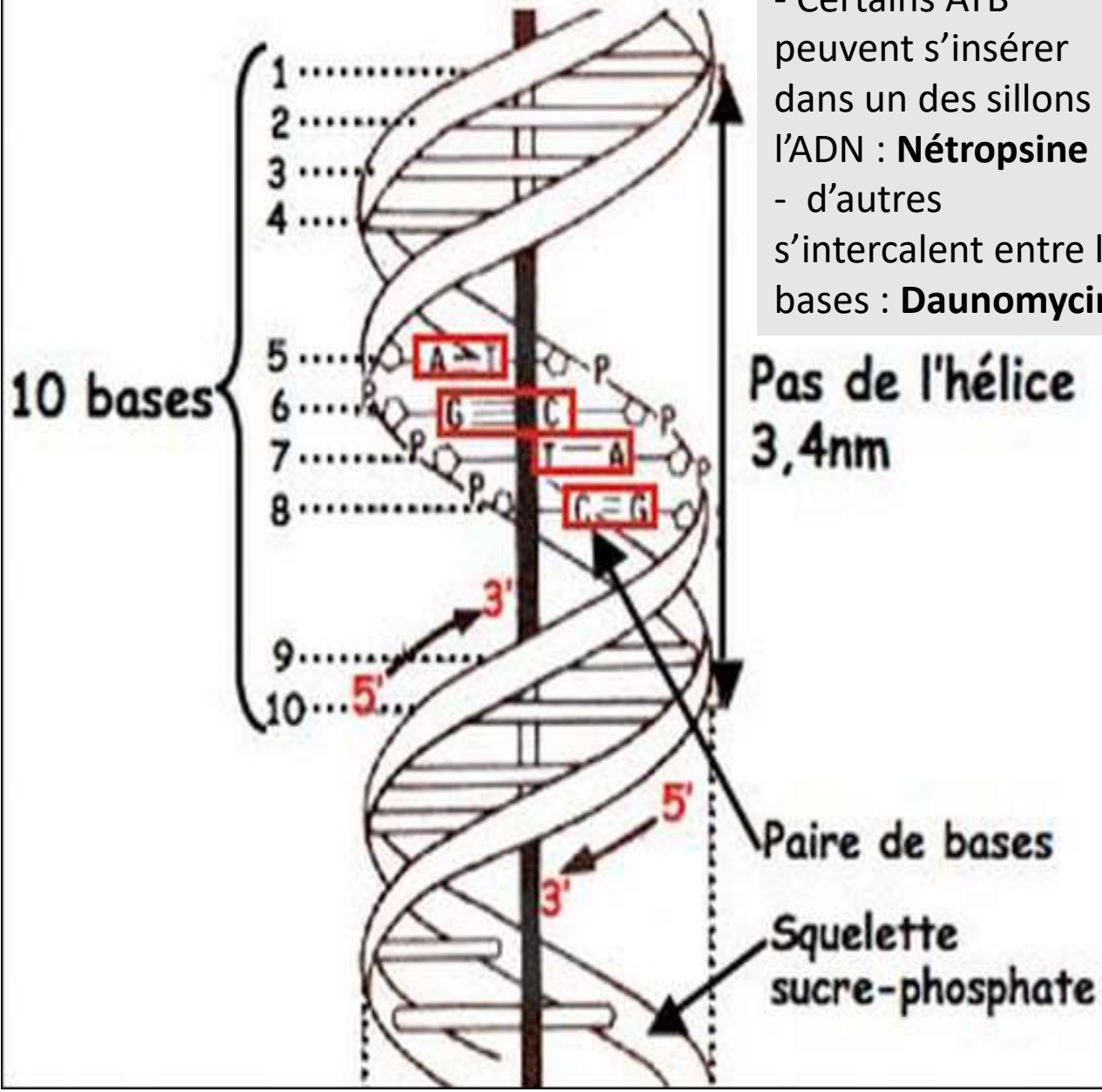
- Les deux chaînes polynucléotidiques forment une hélice droite:
  - Environ 10 paires de bases par tour d'hélice;
  - 3.4 Å entre 2 bases
  - 34 Å par tour
  - 20 Å de diamètre
- Présence de deux crevasses sillons à la surface de l'hélice:
  - Petit sillon faible distance entre les deux chaînes;
  - Grand sillon: plus grand espace entre les deux chaînes;



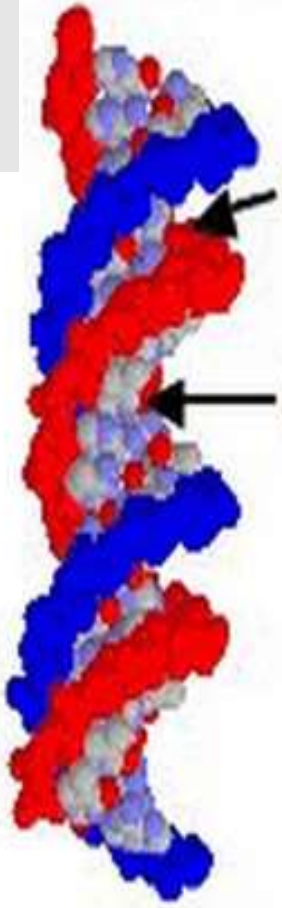
1 Å (Ångstrom) = 0.1 nm = 1 x 10^{-10} m

CONFIGURATION SPATIALE DE L'ADN

- Certains ATB peuvent s'insérer dans un des sillons de l'ADN : **Nétropsine**
- d'autres s'intercalent entre les bases : **Daunomycine**



Forme B
rotation droite

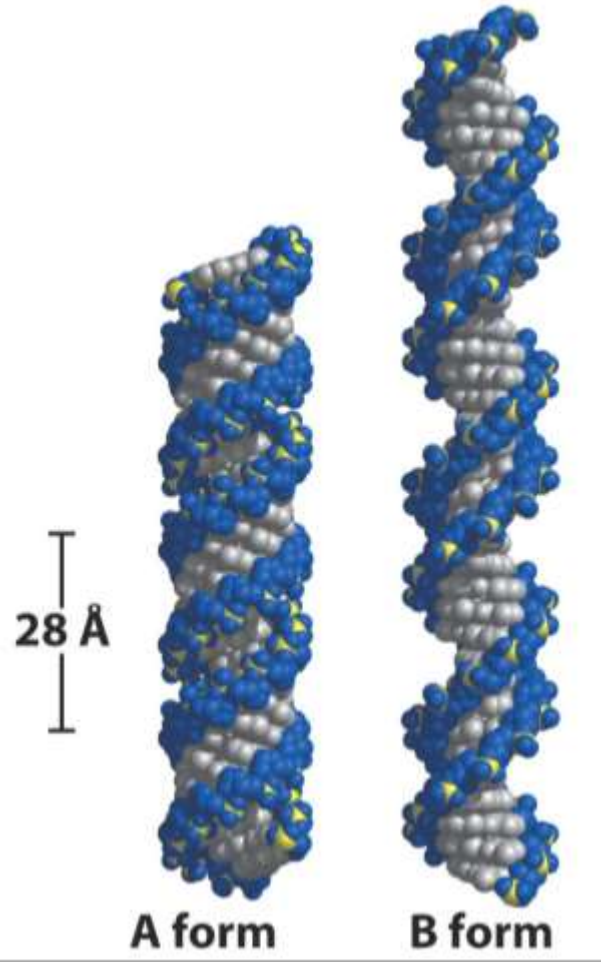


Les formes de l'ADN

La forme B de l'ADN est la forme biologique la plus importante.

- décrite en 1953 par Crick et Watson.
- Les caractéristiques de l'hélice régulière sur les suivantes:
  - **10** paires de bases par tour de spire
  - le pas de l'hélice est de 3,4 nm
  - et le diamètre de l'hélice est de 2 -2,4 nm.
- Dans les cellules, la forme de l'hélice est un peu plus compacte et comporte environ **10,5** paires de bases par tour de spire.
- Une caractéristique importante de la forme B de l'ADN est la présence de deux types de sillons appelés sillon majeur (1,2 nm de large) et sillon mineur (0,6 nm de large).

Hélice A= Duplex ARN/ARN et ADN/ARN



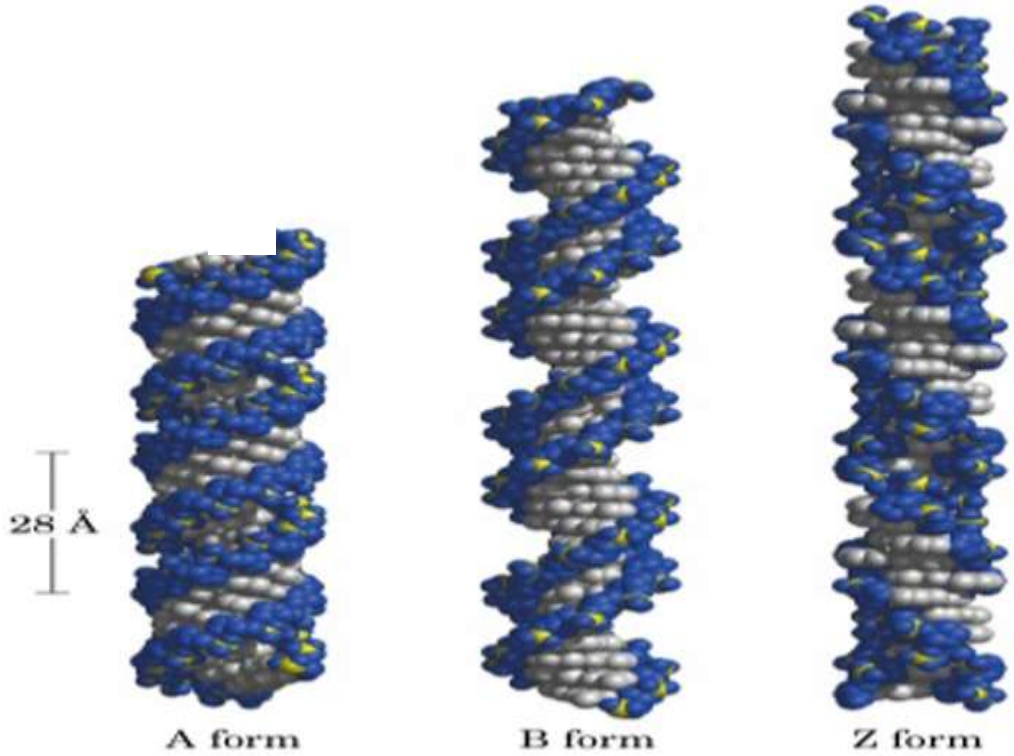
- Plus large: 26 Å
- Plus courte: 11 bp/turn
- Distance par paire de base: 2,6 Å
- Les bases sont plus inclinées (20°)

- **Rôle :**
  - structure secondaire du RNA; complexes RNA/RNA ; hybrides RNA/DNA (réplication et transcription).
- Comme pour l'ADN : les molécules hybrides ADN/ARN et les duplexes d'ARN/ARN suivent les mêmes règles de complémentarité et d'antiparallélisme. Cependant, le **2'OH** de l'ARN affecte la structure de l'hélice.

La forme Z de l'ADN

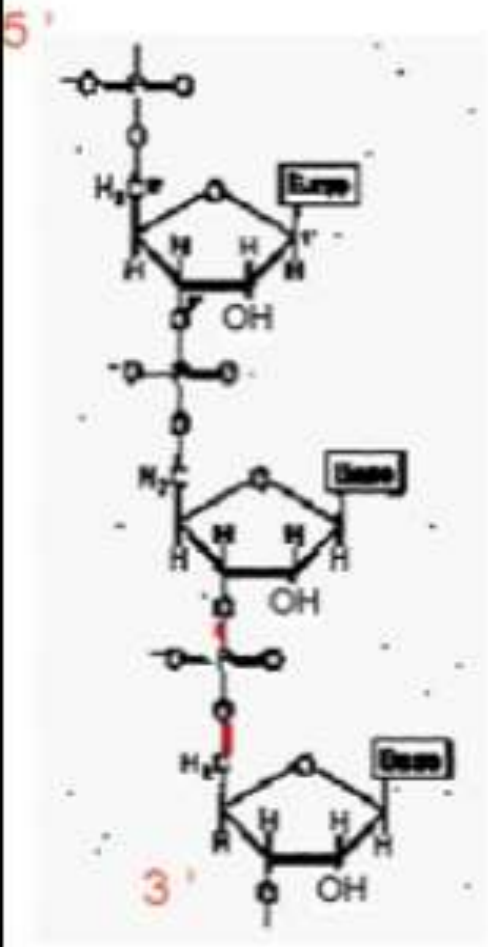
- Initialement : réaction de laboratoire (Rich, 1979) avec l'oligonucléotide artificiel d(CGCGCG).
- Le Z-ADN forme une double hélice à rotation gauche avec **12** paires de bases par tour d'hélice.
- le pas d'hélice est plus important (**4,5**nm)
- le diamètre de l'hélice est plus petit **1,8**
- contient seulement un sillon.
- **Localiation des Helices de type Z:**
  - séquence alternée de Pu et Pyr:séquences riches en **(GC)n** dans le génome : îlots **GC**.

	Hélice A	Hélice B	Hélice Z
Sens de l'hélice	droit	droit	gauche
Diamètre	≈ 2,6 nm	≈ 2,0 nm	≈ 1,8 nm
Résidus par tour	11	10	12 (6 dimères)
Ecart entre 2 pb	0,26 nm	0,34 nm	0,37 nm
Pas de l'hélice	2,8 nm	3,4 nm	4,5 nm

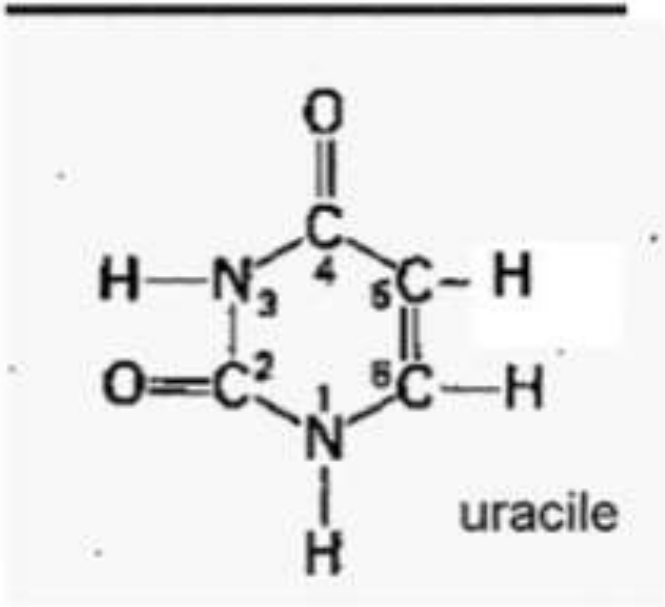


ARNs

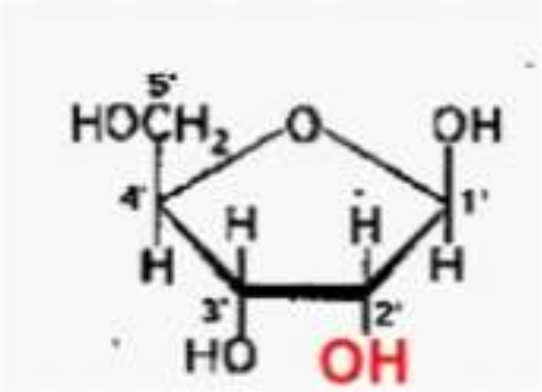
. Structure : polymère linéaire de ribonucléotides liés par des liaisons phosphodiesters



bases = A, G, C, U



sucre = ribose

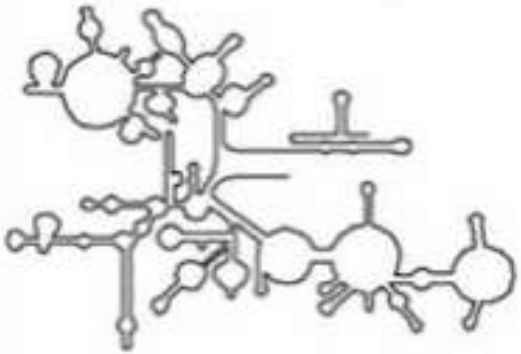


Propriétés

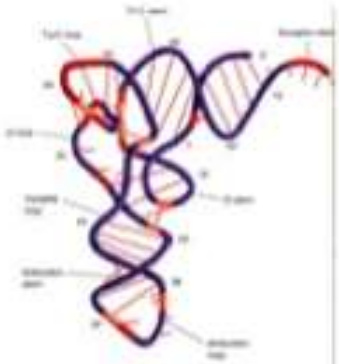
1 seul brin

Formation de structures II et III :

Hybrides ADN/ARN



ARNr



ARNt

Présence de bases modifiées : dihydrouracile, pseudouridine…

OH en 2 ' → pas de duplex de type hélice B
→ réactivité chimique
→ sensibilité au traitement alcalin

Sensibilité aux nucléases : Rnase A, H

Durée de vie variable des ARNm : quelques minutes à quelques heures…

LES ARNs

Acides ribonucléiques

- **rRNA = Acides ribonucléiques ribosomiques (82 %)**
  - RNA 28 S : 4718 nt RNA 5,8 S : 160 nt
  - RNA 18 S : 1874 nt RNA 5 S : 120 nt
- **tRNA = Acides ribonucléiques de transfert (16%)**
  - tRNA-Phe : 76 nt, au moins un par acide aminé ≥ 20
- **snRNA (<1%)** **Small nuclear)**
  - riches en Uracile, participent à l'excision-épissage des introns
- **RNA 7 S (<1%)**
  - dans la particule de reconnaissance du signal-peptide
- **mRNA = Acides ribonucléiques messagers (2%)**
  - produits de la transcription, modèles pour diriger la traduction

- **gRNA : ARN génomique (qui constitue le génome de certains virus)**
- **RNA antisens : petit ARN complémentaire d'une portion d'un autre ARN et inhibant sa fonction (peuvent être naturels ou obtenus par génie génétique)**

Plusieurs types d'ARN sont produits par la cellule

Type d'ARN	Fonctions
ARN messager (ARNm)	codent les protéines
ARN ribosomal (ARNr)	forment la structure de base des ribosomes et participe à la synthèse des protéines
ARN de transfert (ARNt)	adaptateurs spécifiques des acides aminés agissant au niveau des ARNm
Small nuclear ARN (ARNsn)	impliqués dans plusieurs événements nucléaires, dont l'épissage des introns
Small nucleolar ARN (ARNsno)	modifient les ARNr
microARN (miRNA)	Contrôle de l'expression des gènes par blocage de la traduction
Petits ARN interférant (siRNA)	Contrôle de l'expression des gènes par dégradation d'ARNm et par établissement d'une structure chromatinienne compacte
autres ARNs non codant	impliqués dans différents processus: inactivation du chromosome X, synthèse des télomères, transport des protéines dans le Réticulum Endoplasmique

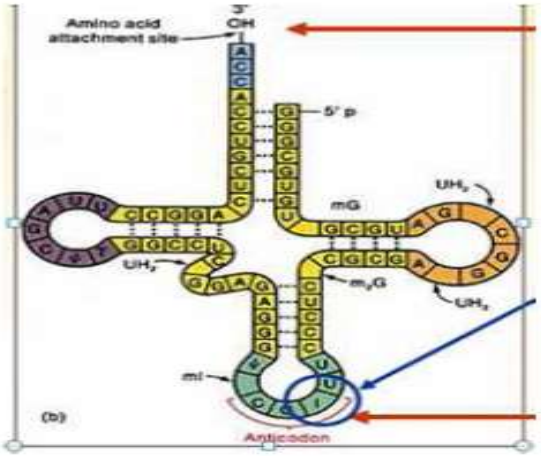
ARNt:

ARNs de petites tailles: 60-95 nucléotides

Ils jouent un rôle dans la synthèse des protéines, en interprétant les séquences codantes des ARN messagers et en apportant les amino-acides au niveau de la chaine protéique en cours d'élongation

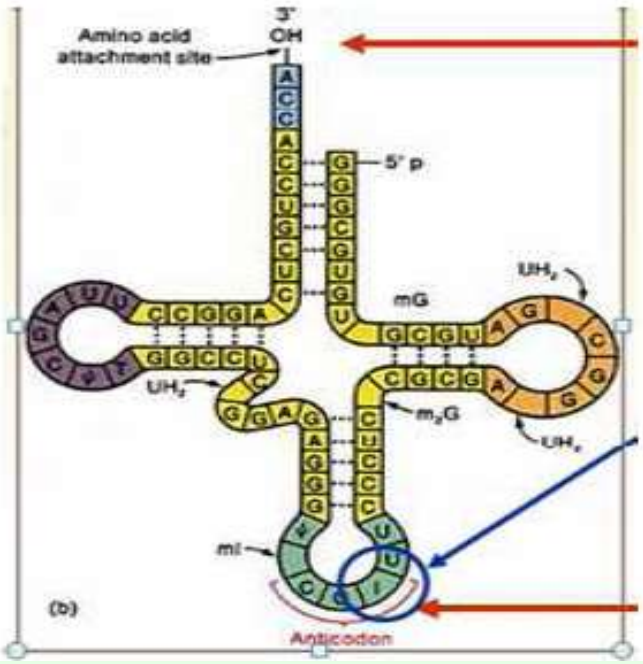
Structure caractéristique, en „feuille de trèfle"

Caractéristiques des tRNA.



- **<u>Tige ou bras accepteur</u>**
- :Le trinucléotide terminal en 3' est toujours $^{5'}CCA^{3'}$
- Fixe l'AA par le OH en 2' ou 3' du ribose de l'adénine de l'extrémité 3' au groupement COOH de l'AA
- L'extrémité 5' est toujours phosphorylée
- La tige est en double hélice par appariement de 7 pb
- **<u>Boucle et tige anticodon</u>** :
- Anticodon = 3 bases de l'ARNt complémentaires du codon de l'ARNm correspondant à l'AA porté par l'ARNt

Caractéristiques des tRNA.



- **Boucle et tige D :**
  "D"= dihydrouridine
- **Bras TYC :**
  Contient séquence : thymine-pseudouridine-cytosine
- **Boucle variable :**
  Contient plus ou moins de nucléotides pour compenser le fait que les ARNt n'ont pas tous le même nombre de nucléotides mais ont la même structure (basée sur 76 nt).

4. ARN fonctionnels (ARNf)

- snRNA : petits ARN nucléaires, 100 à 200 bases, rôles dans la maturation des ARNm (épissage) et des ARNr
- snoRNA : petits ARN nucléolaires, ≈100 bases, impliqués dans la maturation des ARNr
- siRNA, miRNA : petits ARN (≈ 20 bases) capables pouvant interférer avec les ARNm et moduler l'expression des gènes
  - miRNA : micro ARN intervenant dans la régulation post transcriptionnelle
  - siRNA : petits ARN interférants (small interfering RNA) produits après exposition à un ARN étranger, complémentaires à 100% des ARNm cibles

Les ARN longs non codants (long ncRNAs, lncRNA)

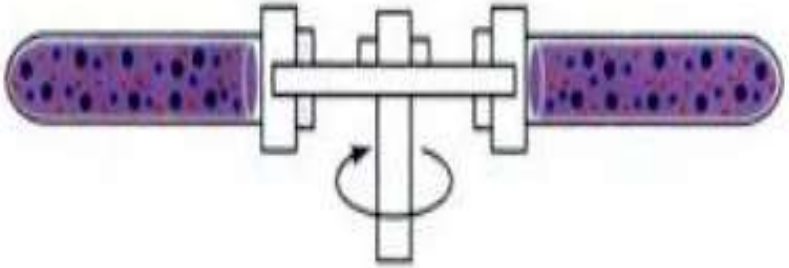
sont un type d' ARN , défini comme étant des transcrits avec des longueurs dépassant 200 nucléotides qui ne sont pas traduits en protéine. Cette limite quelque peu arbitraire distingue les ARNc longs des petits ARN non codants tels que les microARN (miARN), les petits ARN interférents (siARN), les ARN interagissant avec le Pi ou (piARN), les petits ARN nucléolaires (snoARN) et les autres ARN courts. Les ARN non codants intermédiaires/intergéniques (lincRNA) sont des séquences d'ARNnc qui ne chevauchent pas les gènes codant pour les protéines.

Propriétés physico-chimiques de l'ADN

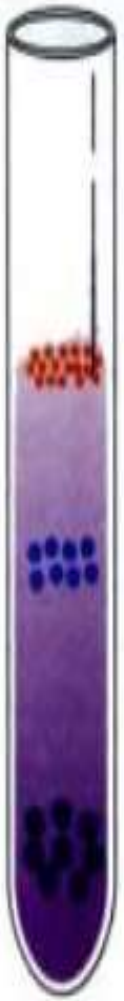
1. Densité

- On exploite la densité par centrifugation dans un gradient de chlorure de césium (CsCl).
- Au cours de la centrifugation il se forme un gradient de chlorure de césium, l'ADN se concentre en une bande à l'endroit où la densité de la solution de CsCl est égale à la sienne.
- Si on centrifuge des protéines, de l'ADN et de l'ARN on remarquera la répartition de l'ARN au fond du tube (plus dense), l'ADN au milieu et les protéines en haut (moins dense). Ceci est du à leur différence de densité

Densité des acides nucléiques



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



Protéines d=1.4

ADN d = 1.7

ARN d = 2

1. Mélange homogène de l'échantillon et de la substance qui va former le gradient
2. Centrifugation
3. Le gradient s'est formé et les molécules sont rassemblées à leurs positions isopycniques

Poids moléculaire

- Le poids moléculaire de l'ADN est très élevé.
- Il est déterminé par:
  - Diffusion de la lumière,
  - Mesures de constante de sédimentation et de viscosité intrinsèque,
  - Microscopie électronique.
- L'ADN humain fait en moyenne un PM de 6×10^{10} par chromosome. Ce paramètre est mis à profit lors de méthodes comme la chromatographie et l'électrophorèse.

Solubilité et viscosité

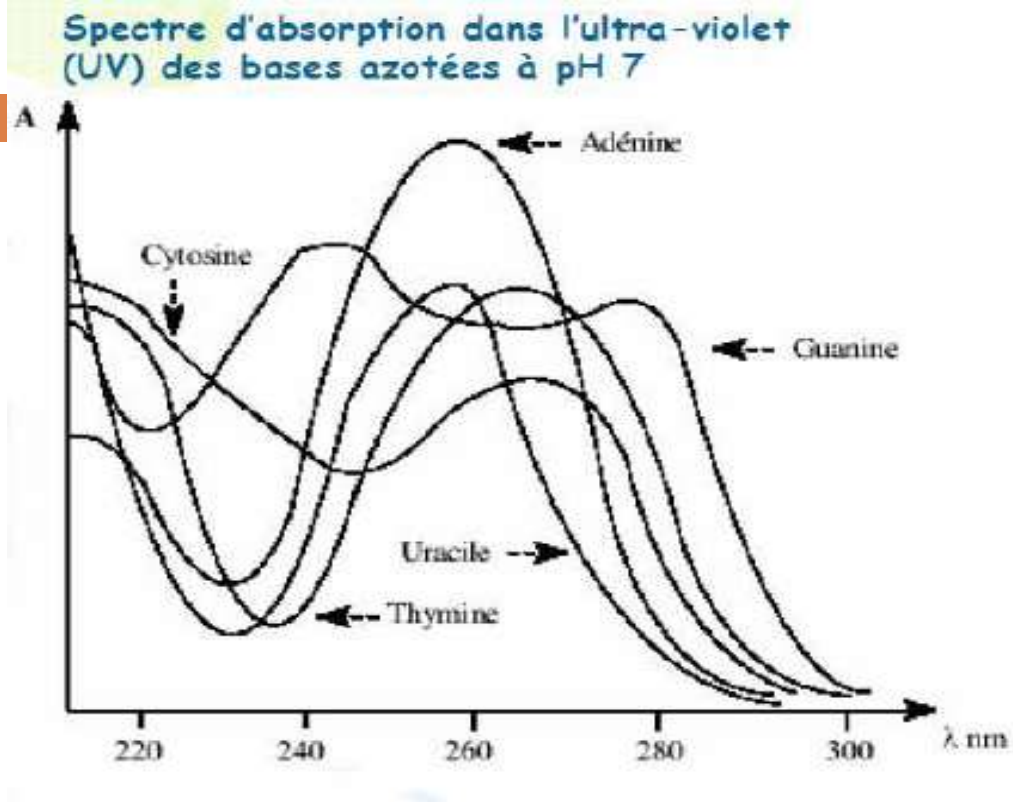
- La présence de groupements phosphates (OH ionisés) donne un caractère acide aux acides nucléiques.
- A pH physiologique les acides nucléiques portent une charge négative, qui est uniquement due aux groupements phosphates car à ce pH les bases ne portent aucune charge. De ce fait, les acides nucléiques sont solubles dans l'eau.

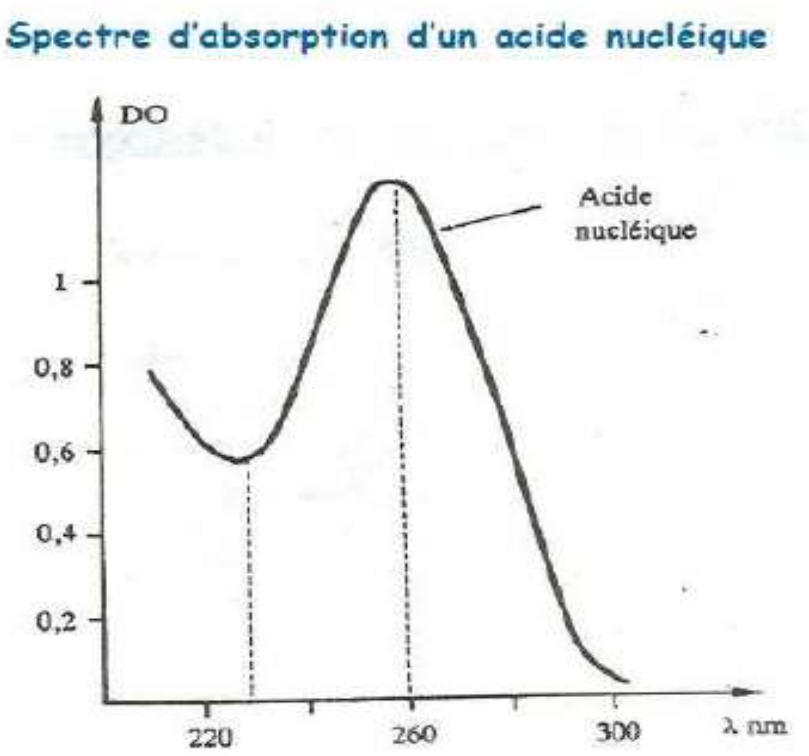
- L'ADN se dissout facilement dans les solutions salines diluées et entraine une augmentation importante de la viscosité de la solution.

- A forte concentration en sels l'ADN et l'ARN précipitent et peuvent être récupérés après centrifugation.

- Les alcools, comme l'éthanol, précipitent également les molécules d'ADN sous forme d'agglomérat en longues fibres.
- Les solutions d'ADN ont une très grande viscosité résultant de la structure longue et rigide de la double hélice.
- Un ADN double brin possède une viscosité supérieure à celle d'ADN simple brin.

Propriétés spectrales Absorption dans l'UV





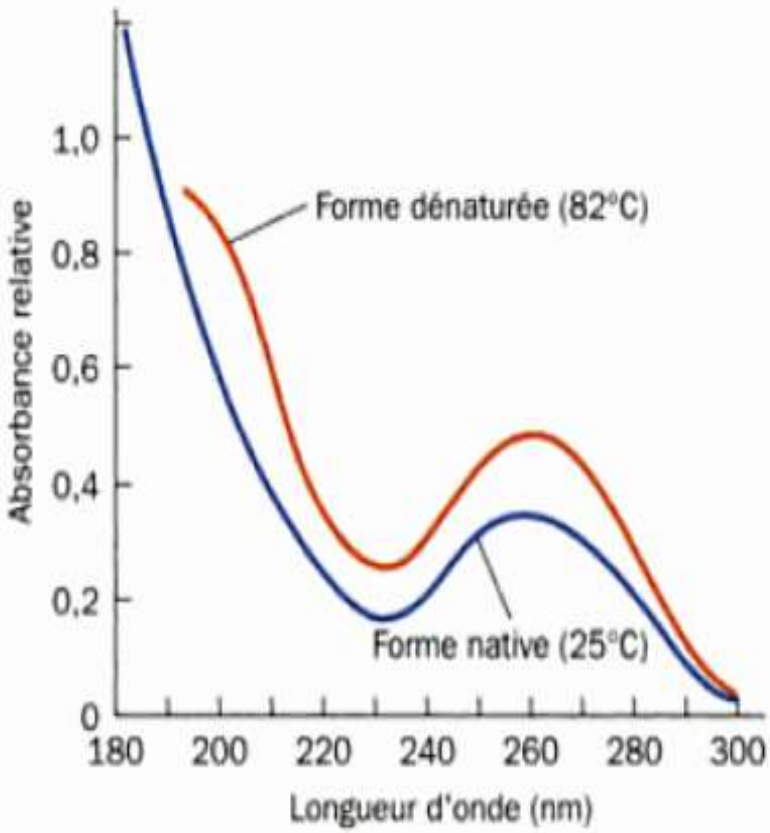
Bases azotées absorbent toutes dans l'UV à 260 nm environ.

Absorption de la molécule d'ADN est **nettement inférieure** à celle que l'on obtiendrait avec un mélange des mêmes bases libres aux mêmes concentrations

car le coefficient d'extinction molaire ε des bases libres est bien supérieur à celui des bases appariées (si ε diminue pour une même concentration (c), A diminue aussi)

Donc cette différence d'absorption (environ 30%) entre ADN et mêmes bases libres est due à l'appariement des bases par liaison H. Ce phénomène est appelé effet **hypochrome.**

Propriétés spectrales



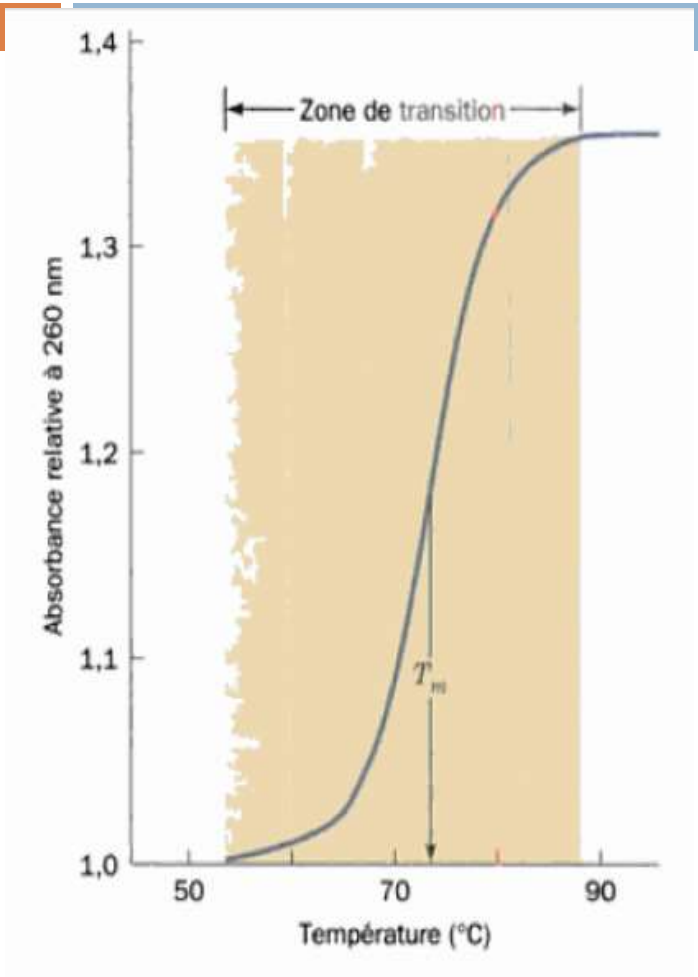
Autre phénomène: hyperchromie

Les solutions d'ADN présentent le maximum d'absorption à la longueur d'onde de 260 nm.

MAIS pour une longueur d'onde donnée, **l'ADN monocaténaire absorbe plus que l'ADN bicaténaire.**

Dans l'ADN double brin, les bases sont masquées ou se chevauchent, alors que dans l'ADN simple brin il n'y a pas de structure qui cache les bases, donc l'absorbance est plus importante.

Si on chauffe une solution d'ADN bicaténaire à différentes températures et qu'on suit l'absorbance de cette solution pour chacune de ces T° : on peut construire une courbe A=f (T°C de traitement) = **courbe de dénaturation thermique de l'ADN**.



Observation : l'absorbance de l'ADN augmente avec la température.

L'ADN monocaténaire présente une absorption plus importante qu'un ADN bicaténaire.

La courbe a une allure sigmoïde.

Le point d'inflexion de cette courbe correspond, sur l'axe des abscisses, au Tm (Melting temperature).

Tm = température de fusion de l'ADN

= température moyenne pour laquelle la moitié de cet ADN est dénaturé.

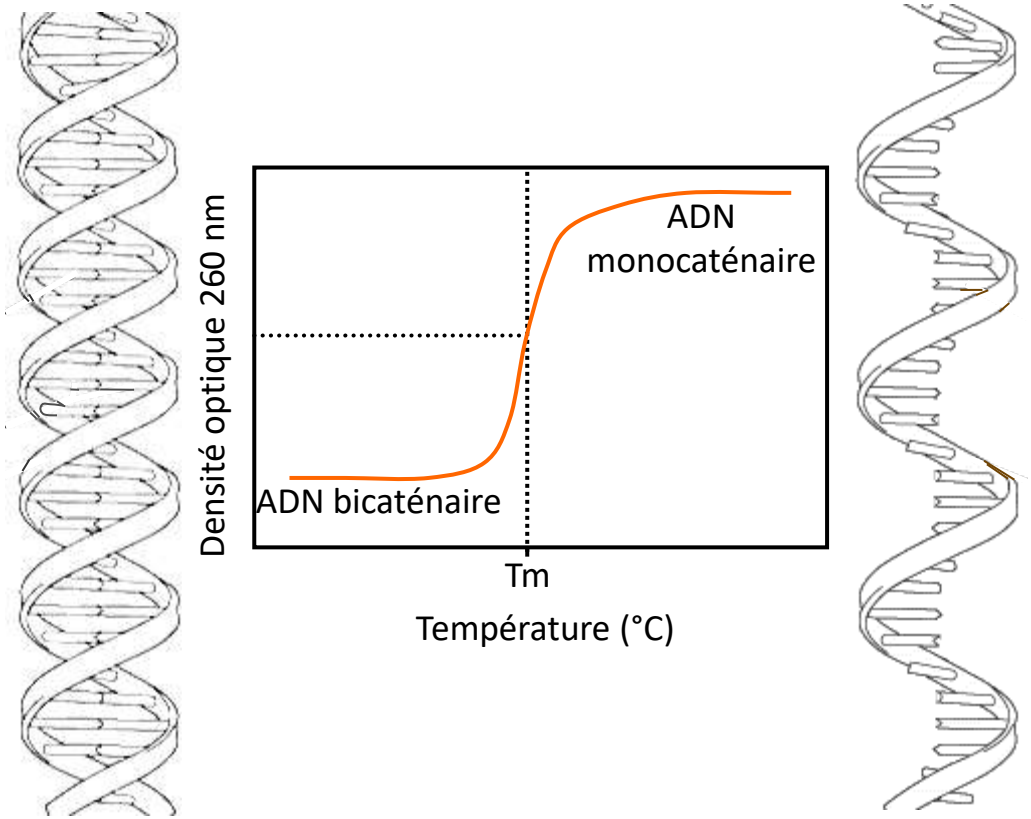
Dénaturation ⟶ diminution de la viscosité de la solution

⟶ augmentation de la densité de l'ADN.

ACIDES NUCLEIQUES

Dénaturation de l'ADN

La dénaturation de l'ADN :
–augmentation de l'absorption dans l'ultra-violet
–diminution de la viscosité
– et augmentation de la densité.



ε_{260nm} < $\varepsilon_{260\ nm}$

ADN double brin < ADN simple brin

ADN: Absorbance

Les acides nucléiques absorbent à ~260 nm (à cause des bases puriques/pyrimidiques);

Les préparations d'acides nucléiques pures donnent un **rapport $A_{260}/_{A280}$ d'environ1.8**;

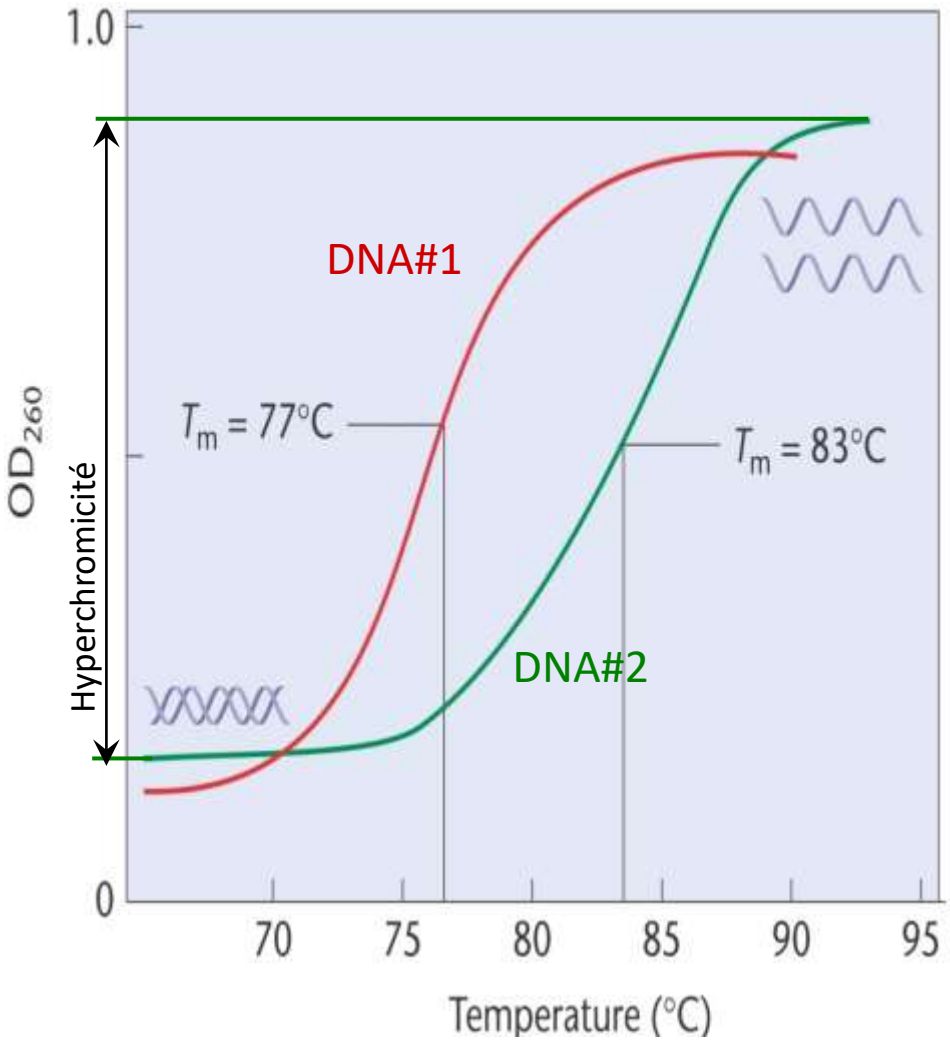
Des valeurs de $A_{260}/_{A280}$ inférieures à 1.8 sont généralement indicatives **de la contamination** des acides nucléiques par des *protéines*.

Calcul de la Tm

- Oligonucléotide inférieur à 20 nt
  - (A+T)x2 + (G+C)x4 = Tm en °C
- Oligonucléotide supérieur à 20 nt
  - [(A+T)x2 + (G+C)x4] x (1+[(N-20)/20]) = Tm en °C

Dénaturation de l'ADN

- La température à laquelle 50% de l'acide nucléique db s'est dénaturé est appelée la température de fusion (Tm)
- Le Tm est affecté par plusieurs facteurs:
  - **Concentration en sels.**
  - **Longueur des molécules: Tm augmente avec la longueur (pour ADN < 150 pb)**
  - **Contenu en G+C: Plus le contenu en GC est élevé, plus le Tm sera aussi élevé.**



Dénaturation/Renaturation

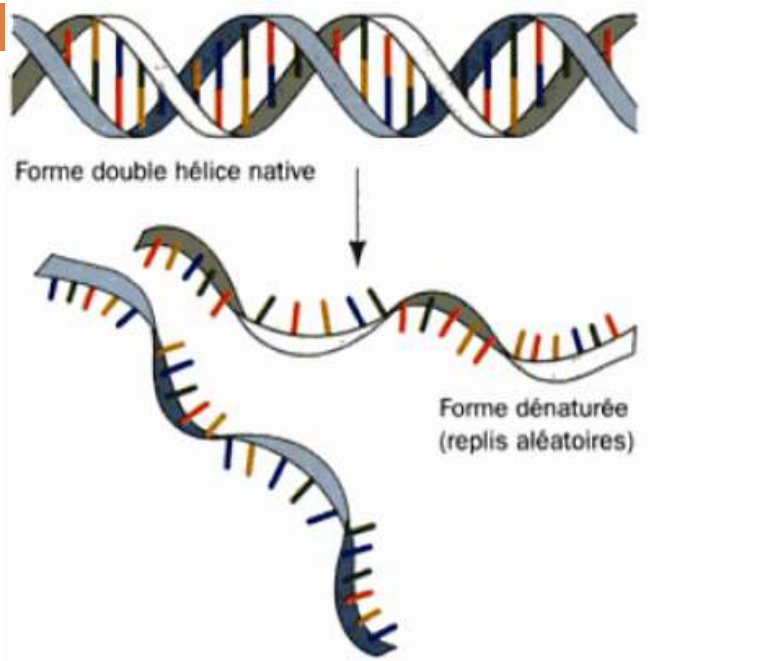


FIGURE 5-14 Représentation schématique de la séparation des brins de l'ADN duplex lors de sa dénaturation par la chaleur.

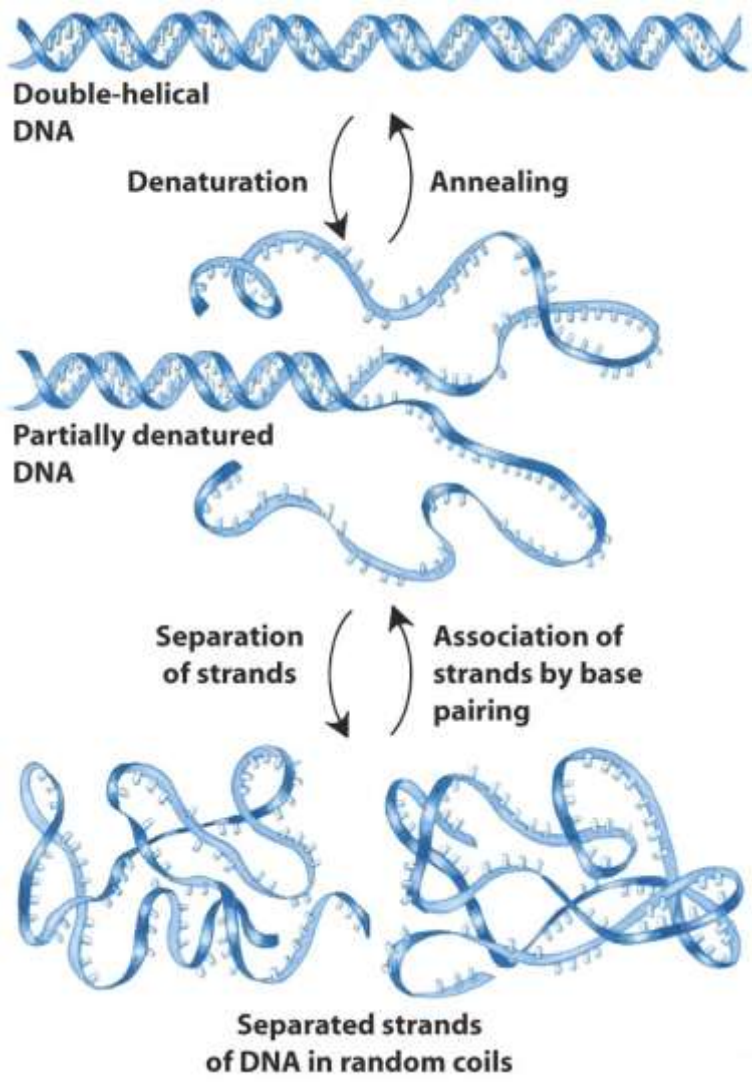
Dénaturation d'une molécule = perte de sa structure tridimensionnelle sans altération de la structure primaire.

Pour une molécule d'ADN double brins = rupture des liaisons hydrogène entre les bases : on obtient de l'ADN monocaténaire.

Phénomène coopératif

On peut obtenir une dénaturation de l'ADN par des moyens physiques (température, pH extrême, diminution de la concentration en sel) et des moyens chimiques (utilisation de l'urée, de soude, de formaldéhyde).

Dénaturation de l'ADN



Les acides nucléiques double brins (db) (ds) peuvent être convertis en acides nucléiques simple brins (sb) (***dénaturés***) de plusieurs façons:

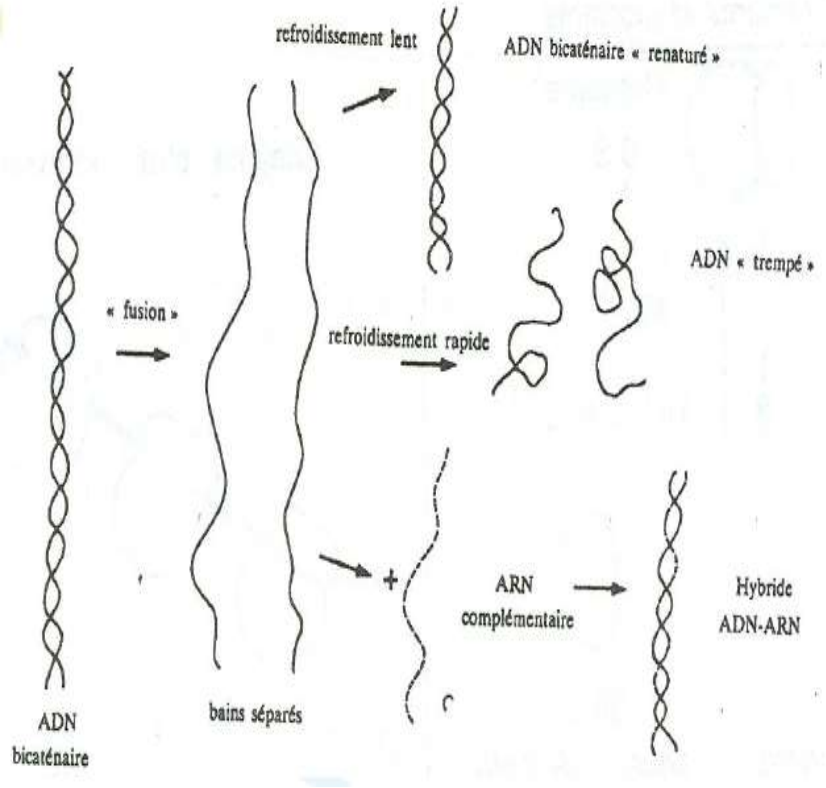
- **Augmentation de la température**
- **Diminution de la concentration de sel**
- **Produits chimiques**: NaOH/formamide/formaldéhyde (brisent les ponts H)

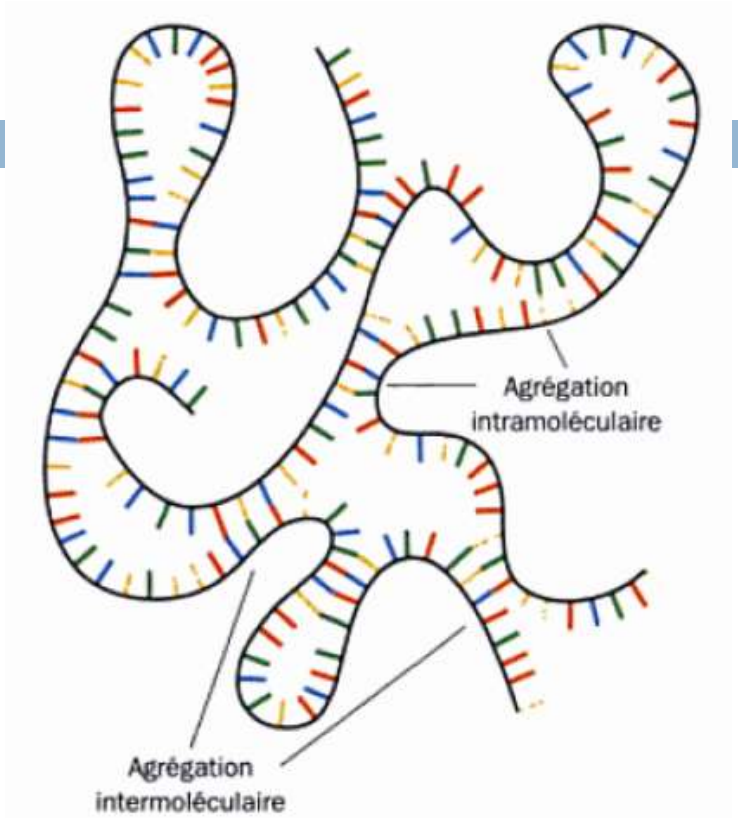
- Inversement, l'ADN sb ou SS peut être ***renaturé*** de la façon suivante: :
  - **Diminution de la température**
  - **Augmentation de la concentration en sel**
- Ce phénomène **Denaturation-Renaturation** peut être suivi par spectrophotométrie:
  - Les acides nucléiques sb absorbent davantage à 260 nm que les acides nucléiques db: ***hyperchromicité***;
  - **Renaturation = Hypochromicitté**

Paramètres influençant la dénaturation

Si le paramètre(ci-dessous) augmente	il augmente :	il stabilise l'ADN et augmente la Tm ?
le coeff de Chargaff %GC	le nombre de liaisons hydrogène	oui
le pH qui ionise les phosphates	la force de répulsion électrostatique	non → dénaturant
la concentration en cation, force ionique	neutralise les charges	oui → effet stabilisant
la concentration en urée, formamide	compétiteur des liaisons hydrogène entre bases	non → dénaturant
la concentration en ADN, Activité de l'eau	affecte la constante diélectrique	oui → effet stabilisant
la longueur de la molécule d'ADN	le nombre de zones riches en GC	oui → effet stabilisant

Température et Renaturation de l'ADN





- Si une solution d'ADN dénaturé est refroidie rapidement bien en dessous de sa Tm, l'ADN résultant ne sera que très partiellement apparié car les brins complémentaire n'ont pas le temps de se réassocier convenablement.
- Cependant si on refroidit lentement la solution d'ADN dénaturé, l'ADN se renature complètement.
- De la même façon, des brins complémentaires d'ADN et d'ARN peuvent s'hybrider pour former une double hélice.