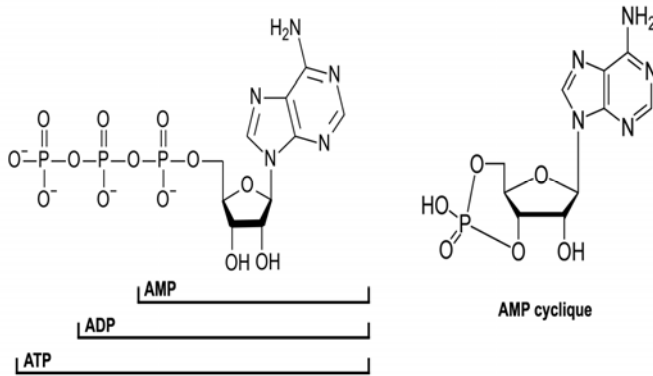


Ce cours a des références **chap.1 L'ADN**

Préparé par Dr Lakhal abdelhafid

Les nucléotides d'intérêt biologique
Les nucléosides monophosphates



La phosphorylation sur le carbone C5' est la plus courante. L'AMP est l'un des composés que l'on trouve dans de nombreuses réactions du métabolisme. Les nucléosides 5'-phosphates sont les éléments de bases de polymères tels que l'ADN et l'ARN que l'on trouve dans tous les organismes vivants.

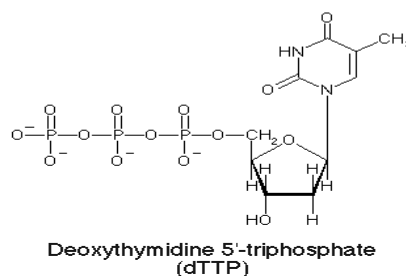
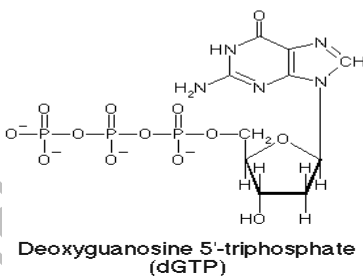
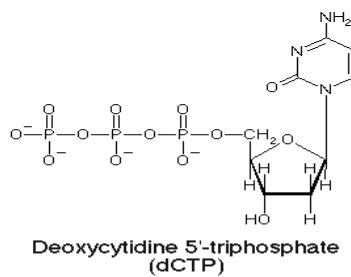
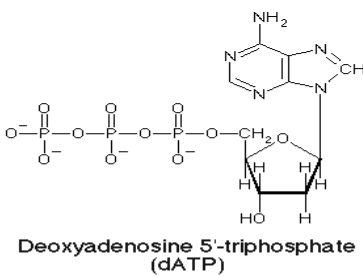
Les nucléosides diphosphates

Le PAPS (adénosine 3'-(mono)phosphate 5'-phosphosulfate) est impliqué dans des réactions de sulfatation des glycannes et des lipides.

L'ADP (et les autres nucléosides PP classiques) est un composé qui a de nombreuses différentes fonctions, citons parmi elles :

- molécule à haut potentiel énergétique (hydrolyse de la liaison anhydride d'acide)
- molécule intermédiaire dans la production d'ATP
- activateur d'enzyme allostérique comme la L-glutamate-déshydrogénase

Les nucléosides triphosphates



- L'une des molécules les plus "universelles" est l'ATP : ses deux liaisons anhydride d'acide (enthalpie libre d'hydrolyse d'une liaison de l'ordre de 30kJ.mol⁻¹) sont une source d'énergie utilisable :

- par des réactions de catalyse enzymatique impossibles sans couplage
- pour le transport trans membranaire actif
- pour la contraction musculaire etc...

D'autres nucléosides 5' triphosphates jouent un rôle identique à celui de l'ATP mais à un

degré beaucoup plus minoritaire.

Les nucléosides 5' triphosphates sont aussi des donneurs de phosphates.

Les nucléosides 5' triphosphates sont les précurseurs de base dans la biosynthèse des ac. nucléiques.

Des constituants de coenzymes

Citons :

- l'adénosine 3'-phosphate 5'-diphosphate est une partie de la molécule d'un coenzyme d'acétylation, le coenzyme A.
- l'adénosine 5'-diphosphate fait partie de la structure de deux coenzymes d'oxydo-réduction : le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et le flavine adénine dinucléotide (FAD)
- le PAPS est impliqué dans des réactions de sulfatation des glycannes et des lipides

Les seconds messagers

Un second messenger est une molécule qui assure le relais intracellulaire d'un signal extracellulaire. L'AMPc fut identifié comme le second messenger universel et dans quelques cas, ce fût le GMPc. Il est produit sur la face intracellulaire de la membrane plasmique après fixation externe d'une molécule signal.

La double hélice

Hypothèses du modèle (1953)

Enroulement de 2 soit à droite soit à gauche.
Bases à l'intérieur P et sucres à l'extérieur
Symétrie d'ordre 10 : 1 base / 36°
1 tour = 10 bases = 34 Å caractérisée par :
- son axe principal,
- le sens d'enroulement, Du fait de la

position de l'axe au centre de chaque paire de base complémentaire et de leur attachement dissymétrique sur le squelette ose-phosphate deux sillons d'ouverture et de profondeurs différentes vont alterner sur les flancs de la double hélice

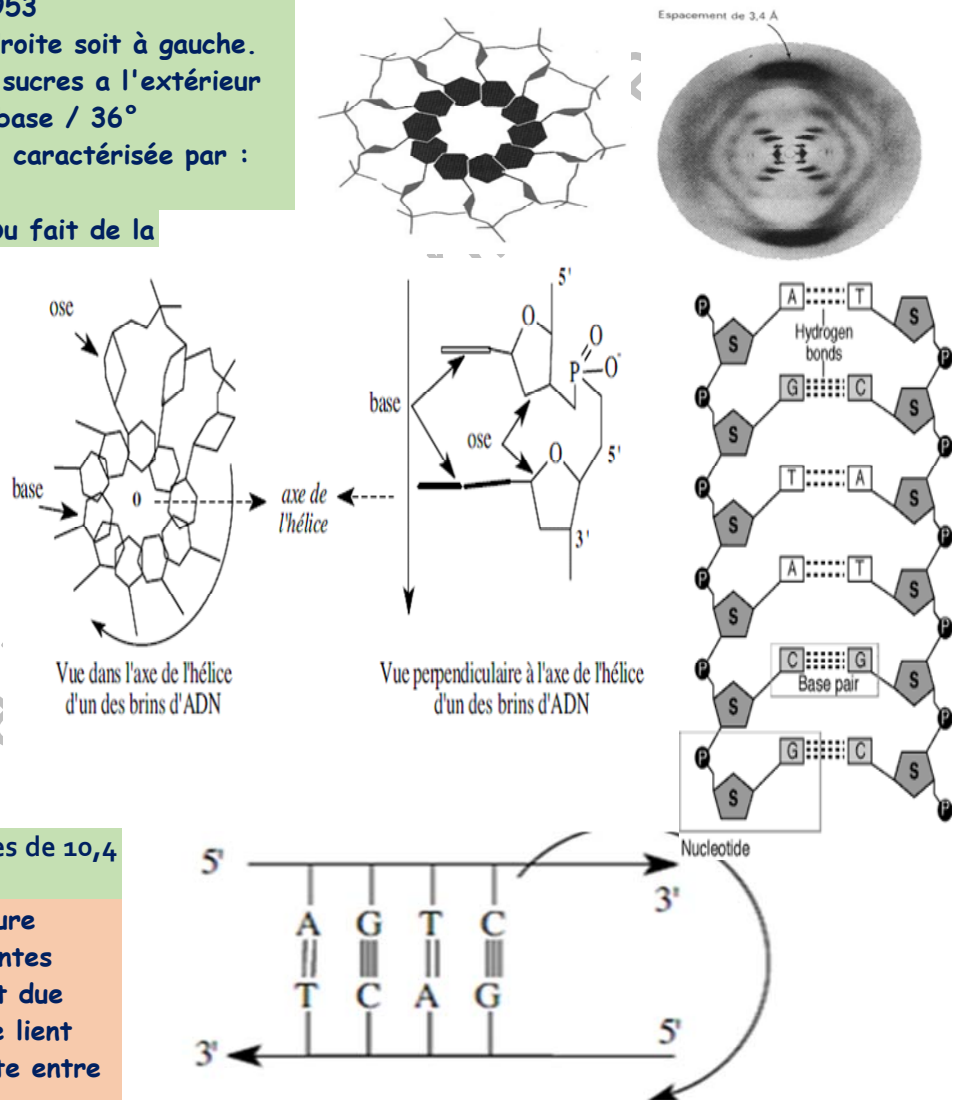
- le pas

Enroulement d'un seul brin

Les 2 chaînes sont distantes de 10,4 Å

La stabilité de la structure secondaire de ces différentes doubles hélices d'ADN est due aux : Les ponts phosphate lient les rampes sucre phosphate entre elles

- liaisons hydrogène entre les bases complémentaires de chacun des brins interactions hydrophobes et électrostatiques des bases successives empilées dans la structure de l'hélice, dont la distance des plans varie de 0,26 à 0,37 nm Cette stabilité n'entraîne pas une rigidité de la molécule d'ADN et celle-ci peut adopter des conformations différentes selon les régions. Plusieurs conformations correspondant à des sens d'enroulement différents ou des pas différents ont été trouvées, les principales étant:



Conformation B

Décrite par Watson et Crick et que l'on trouve comme la forme principale native dans les conditions physiologiques

Hélice droite de pas égal à 3,4 nm (10 pb par tour).

- L'inclinaison des bases par rapport à leur axe de rotation perpendiculaire à l'axe principal de l'hélice est de 1° .
- La distance entre deux plans de bases successifs est de 0,34 nm.

Conformation A

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

- hélice droite
- hélice plus compacte
- pas de 2,8 nm (11 pb par tour)
- distance entre les plans de bases successives de 0,26 nm
- les plans des bases sont tournés de 180° par rapport à la conformation B
- l'inclinaison des bases par rapport à leur axe de rotation perpendiculaire à l'axe principal de l'hélice est de 20° .

Conformation est trouvée in vivo dans :

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

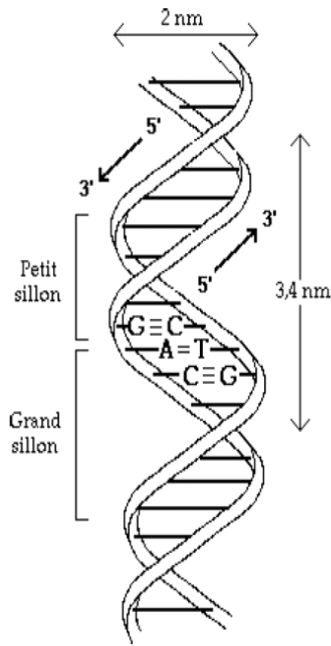
Conformation Z

Présente dans des régions courtes de l'ADN dans une conformation générale de type B (native). Ces régions spécifiques sont en général des segments in vivo de séquence alternée Pur/Pyr (G-C-G-C). Dont les bases sont souvent méthylées. La méthylation des cytosines, et certaines molécules présentes in vivo telle la spermine ou la spermidine stabilisent la conformation Z

Z a les spécificités suivantes :

- hélice gauche lévogyre conformation en zig-zag (moins lisse que l'ADN-B). Il y a un seul sillon, qui ressemble au petit sillon de l'ADN-B.
- pas de 4,5 nm (12 pb par tour) : la molécule est plus étirée
- distance entre les plans de bases successives de 0,37 nm
- l'inclinaison des bases par rapport à leur axe de rotation perpendiculaire à l'axe principal de l'hélice est de 9° .

Les paires de bases (qui forment dans l'ADN-B le grand sillon, proche de l'axe) sont ici rejetées à l'extérieur, en surface, loin de l'axe



Modèle de Watson et Crick

Conformation B :
c'est le modèle de Watson et Crick, le plus stable dans les conditions physiologiques.

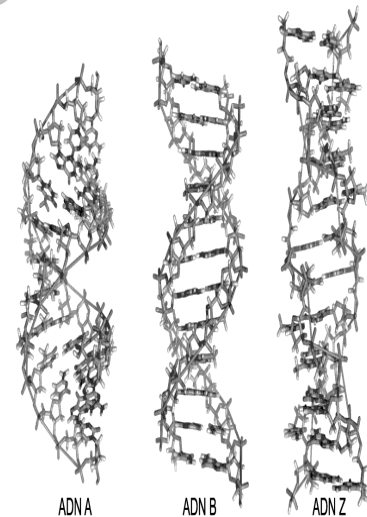
- enroulement droit
- pas : 3,4 nm
- 10 pb par tour
- rotation du plan des bases : 36°

Conformation A :

- enroulement droit
- pas : 2,8 nm
- 11 pb par tour
- rotation du plan des bases : 33°

Conformation Z :

- enroulement gauche
- pas : 4,5 nm
- 12 pb par tour
- rotation du plan des bases : -30°



. Les phosphates sont plus proches les uns des autres que dans l'ADN-B.

L'ADN-Z ne peut pas former de nucléosomes

- Les séquences ADN passent de la forme B à la forme Z et vice versa: l'ADN-Z : est forme transitoire in vivo.

- La transformation de l'ADN-B en ADN-Z se fait lors de la transcription des gènes, au site d'initiation de la transcription, près des promoteurs des gènes transcrits. L'ARN polymérase induit un super-enroulement négatif en amont et un super-enroulement positif en aval du site de transcription. Le super-enroulement négatif en amont favorise la formation d'ADN-Z; une fonction de l'ADN-Z serait d'absorber les contraintes du super-enroulement négatif. En fin de transcription, la topoisomérase relaxe l'ADN en conformation B.

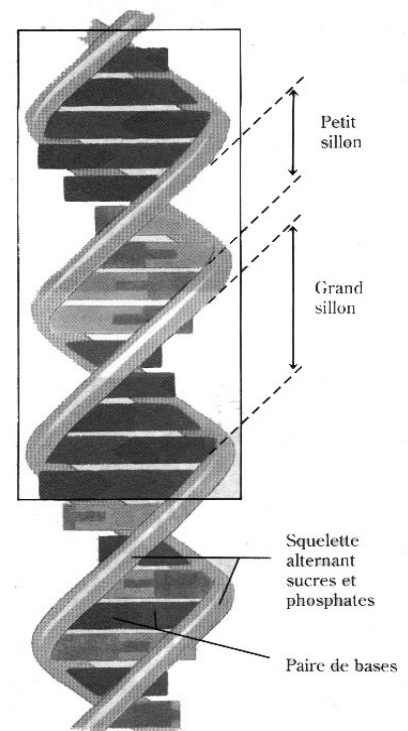
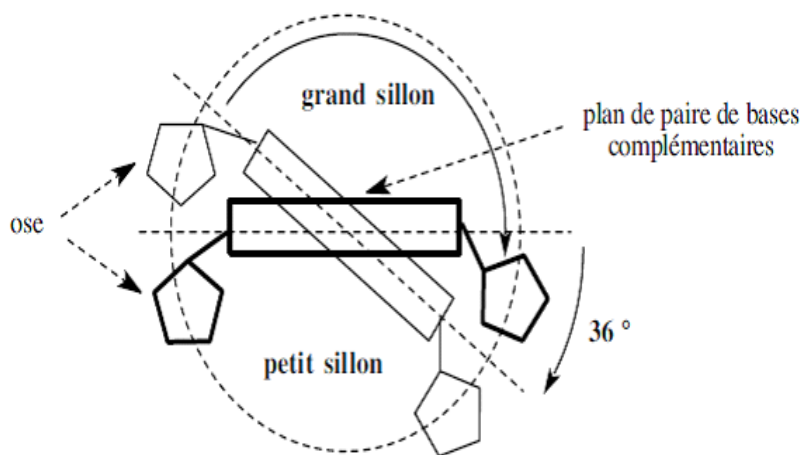
- Certaines protéines se lient à l'ADN-Z, en particulier l'ARN double brins adénosine désaminase (ADAR1), une enzyme qui convertit l'adénine en inosine dans l'ARN pré-messager. Les ribosomes interpréteront alors l'inosine en guanine, et la protéine codée à partir de cette modification épigénétique) sera différente.

Notes: -

Des anticorps anti ADN-Z sont retrouvés dans le lupus érythémateux et dans d'autres pathologies auto-immunes.

- L'ARN double brins (dsRNA) peut adopter une conformation Z

Grand sillon et petit sillon

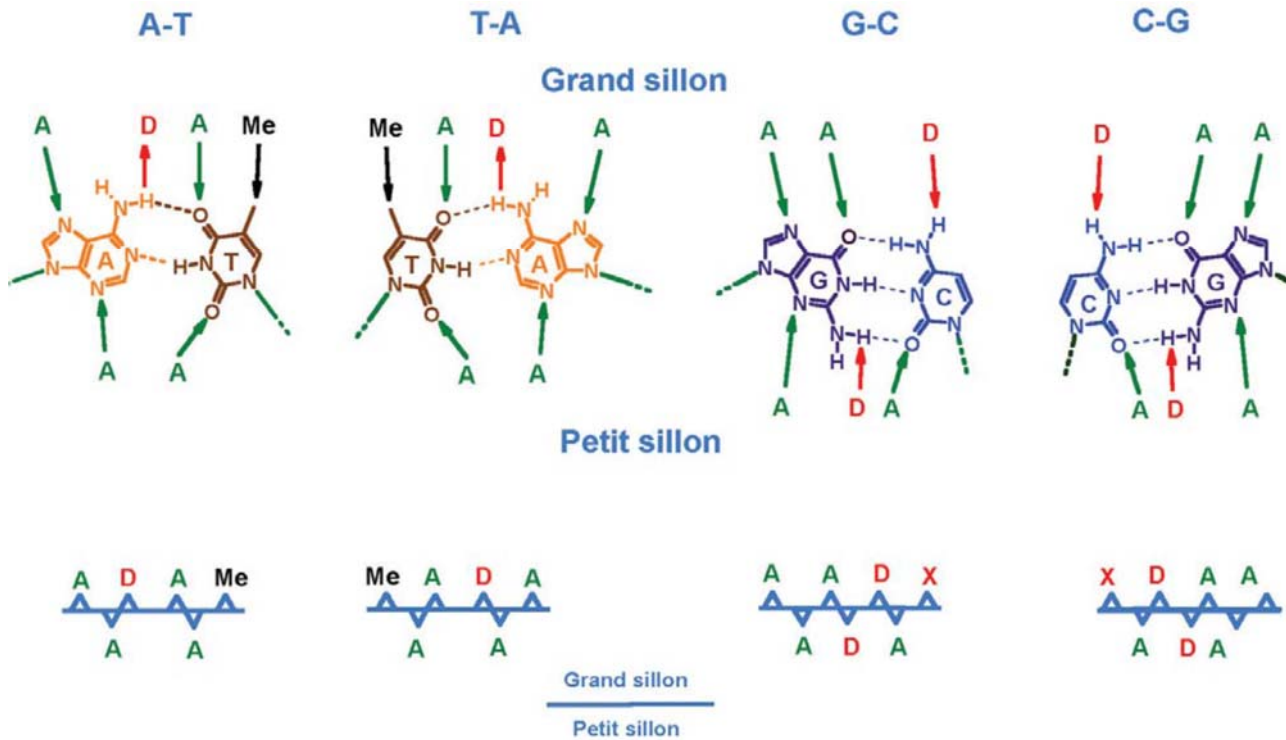


Vue dans l'axe de la double hélice : représentation d'un enchaînement

Elle présente un grand sillon (profond et large) et un petit sillon (étroit et peu profond). Les interactions ADN-protéine sont des processus essentiels de la vie cellulaire (activation ou répression de la transcription, réplication, réparation de l'ADN). Les protéines forment des liaisons avec l'ADN au fond des sillons, ces liaisons **sont**

spécifiques: liaisons hydrogène, et non spécifiques: interactions de van der Waals, interactions électrostatiques générales. Les protéines reconnaissent les **donneurs de liaison H**, les **accepteurs de liaison H**, les **groupes méthyl (hydrophobes)**, ces derniers étant uniquement dans le grand sillon.

Il y a 4 motifs différents possibles pour la reconnaissance et l'accrochage dans le grand sillon, et seulement 2 dans le petit sillon. Certaines protéines se lient à l'ADN dans son grand sillon, d'autres dans le petit sillon, d'autres enfin à la fois dans grand et petit sillon

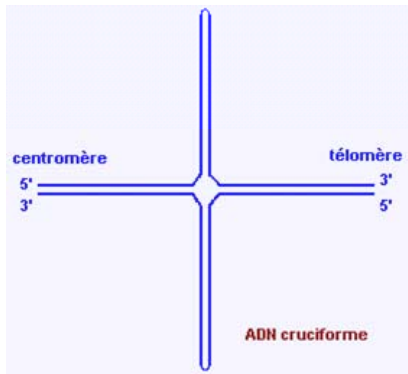


Notes:

- Les deux brins sont appelés "plus" et "moins" ou "direct" et "inverse" (ou "reverse": anglicisme). A un endroit donné où l' des brins est codant, il est rare (mais non exclu) que l'autre soit également codant. L'ADN est ionisé in vivo et il se comporte comme un polyanion

ADN non-B

L'ADN est une molécule qui bouge, fait des mouvements, ce qui favorise les cassures et les délétions fortement induites par ces cassures, les amplifications, la recombinaison, et les mutations.



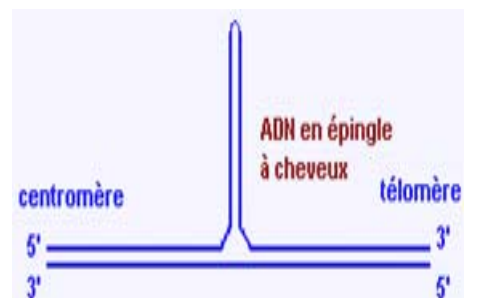
ADN cruciforme et ADN en épingle à cheveux

- Les jonctions de Holliday (formées lors de la recombinaison) sont des structures cruciformes. Des répétitions inversées (en miroir) de segments ADN polypurine/polypyrimidine peuvent également produire des structures cruciformes ou en épingle à cheveux, par appariement intra-brin. - Des répétitions palindromiques riches en AT se retrouvent aux points de cassure, la seule translocation réciproque constitutionnelle récurrente connue. - Les nucléases se lient à -et coupent- les jonctions

de Holliday après recombinaison. Des protéines très connues, telles les protéines HMG et telle MLL peuvent se lier à l'ADN cruciforme

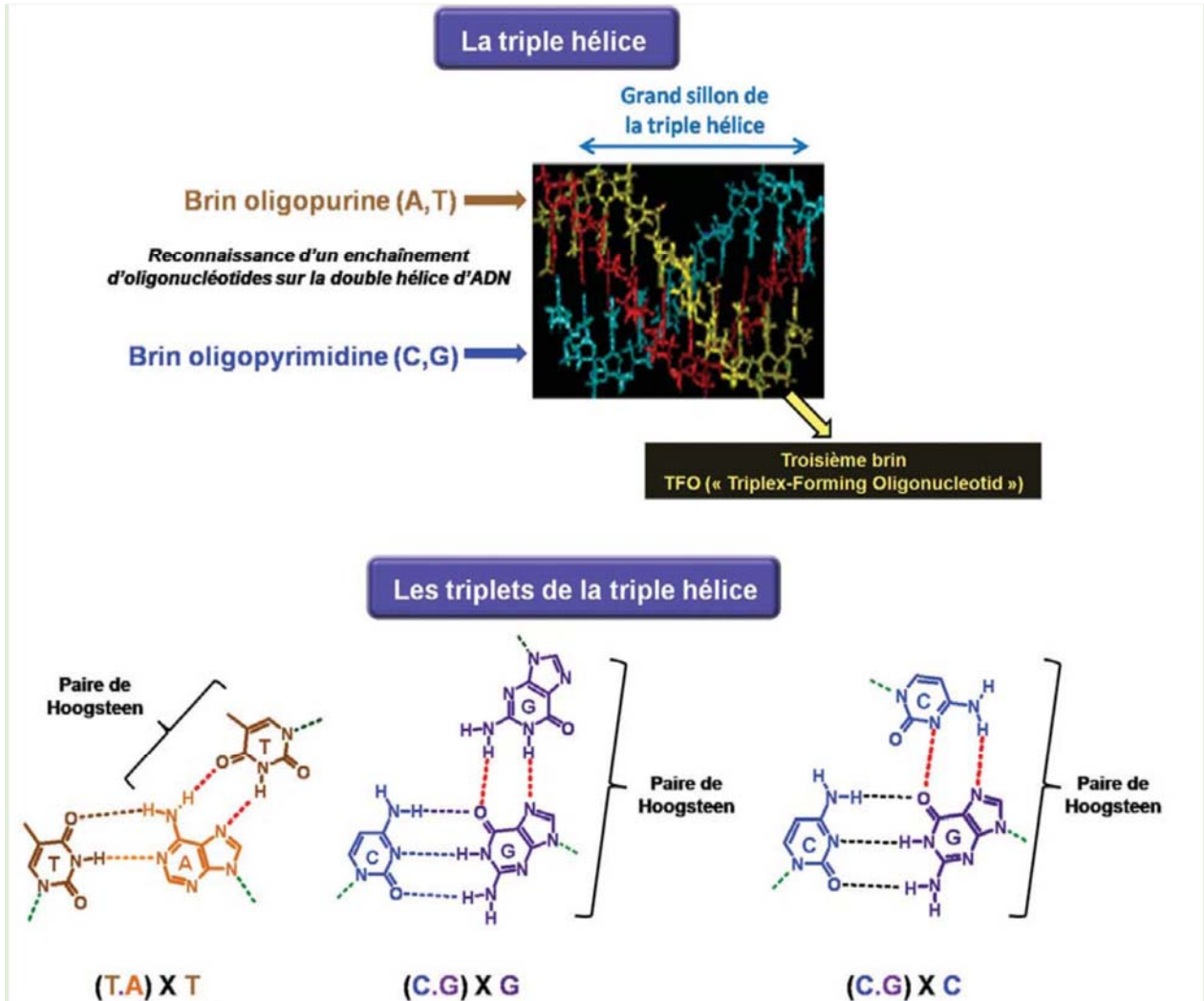
ADN-H ou ADN triplex

- Des répétitions inversées (palindromes) de segments ADN polypurine/polypyrimidine peuvent former des structures triplex (triple hélice). On obtient alors un ADN triple brins plus un simple brin. - L'ADN-H pourrait avoir un rôle dans la régulation fonctionnelle de l'expression des gènes ainsi que sur les ARN (e.g. répression de la transcription).



LE MIRACLE DE LA TRIPLE HÉLICE

Comment une triple hélice peut-elle se former ? Dans le grand sillon de l'ADN, il est en fait possible de fixer un troisième brin qui va interagir avec l'un des deux brins de la double hélice. Il va reconnaître une purine (adénine ou guanine) de la double hélice, laquelle est déjà engagée dans une paire, et va former deux liaisons hydrogène avec cette purine. De la même manière, l'adénine d'une paire adénine/thymine est reconnue par une thymine, et la guanine de la paire guanine/cytosine peut être reconnue soit par une cytosine soit par une guanine. On forme donc des triplets de bases et le troisième brin va ainsi s'enrouler autour de la double hélice



Formation de la triple hélice : le troisième brin (oligopurine ou oligopyrimidine) va reconnaître l'un des deux brins de l'ADN et s'enrouler avec la double hélice.

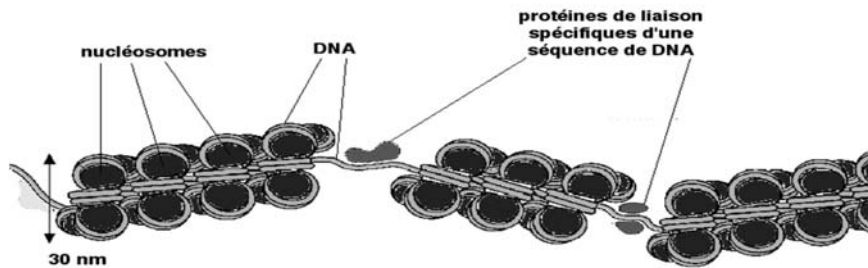
ADN-G4

- ADN-G4 ou ADN quadruplex: repliement de séquences double brin riches en GC sur elles même, formant des appariements de bases de type Hoogsteen entre 4 guanines ("G4"), une structure stable. présente près des promoteurs des gènes et au niveau des télomères
- Rôle dans la méiose et dans la recombinaison; pourraient être des éléments de régulation.
- Les hélicases de la famille RecQ sont capables de relaxer l'ADN-G4 (exemple, le gène BLM, le gène du syndrome de Bloom).

Structure quaternaire de la molécule - Chromatine

L'ADN est associé à des protéines (histones et non histones) pour former la chromatine. L'ADN dans son ensemble est acide (chargé négativement) et se lie à des protéines

basiques (chargées positivement) appelées histones. Il y a 3×10^9 paires de nucléotides dans le génome humain haploïde, représentant environ 30 000 gènes répartis sur 23 chromosomes par lot haploïde.



Fibre de chromatine

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

On décrit aussi cette structure comme un solénoïde.

- Le diamètre de cette hélice est de 30 nm et forme une grande partie de la chromatine dite « compactée » où le DNA n'est pas accessible.
- Toutefois, des séquences reconnues spécifiquement par des protéines de liaison au DNA interrompent de place en place cette structure compacte.

.1 ADN et mitochondrie

- une petite quantité d'ADN est présente dans la mitochondrie.
 - Leur code génétique est différent du code dit "universel" (UGA, AUA, AGA, AGG: respectivement STOP, Ile, Arg, Arg dans le code universel, et Trp, Met, STOP, STOP dans la mitochondrie des cellules de mammifères, et d'autres significations encore dans les mitochondries d'autres espèces).
 - Le nombre de copies d'ADN dans 1 mitochondrie est variable.
 - L'ADN mitochondrial est circulaire, comporte une chaîne (un brin) lourde et une chaîne légère, n'a pas d'intron, ni aucune autre séquence non codante.
 - Les gènes de la mitochondrie codent pour des protéines impliquées dans le transport d'électrons, les ARN ribosomiques (ARN-r), et les ARN de transfert (ARN-t).
- Note: la mitochondrie utilise aussi des protéines importées du cytoplasme de la cellule (et donc codées par le noyau cellulaire); les protéines fabriquées par la mitochondrie ne sont pas exportées dans le cytoplasme, sauf lors de l'apoptose.

2 Dénaturation de l'ADN:

La double hélice est dénaturée in vitro en 2 brins séparés (fusion) par la chaleur, les pH extrêmes, et autres méthodes (urée, ...). Le "point de fusion" peut être calculé; il est caractéristique de la proportion A/T versus G/C de l'échantillon étudié, cela est dû au fait qu'il y a seulement 2 liaisons hydrogène pour A/T, et 3 pour G/C, une liaison plus stable. Lors de la dénaturation, les propriétés physiques de l'ADN changent; ex: l'effet hyper chromique: l'absorption de la lumière à 260 nm est plus forte avec de l'ADN dénaturé qu'avec de l'ADN double brin. L'absorption de la lumière varie aussi selon la proportion A/T vs G/C: Elle est plus forte dans les spécimens riches en A/T que dans ceux riches en G/C. La dénaturation de l'ADN est un phénomène à connaître car:

1-cela permet de mesurer le rapport A/T vs G/C;

2- il est à la base des techniques d'hybridation avec des sondes marquées

L'hydrolyse des acides nucléiques

La dégradation d'un polynucléotide peut être chimique ou enzymatique, elle concerne :

- l'enchaînement phosphodiester
- les unités nucléotidiques : composants et liaison osidique

L'hydrolyse chimique

Le traitement acide affecte de la même façon les ADN et les ARN

- la dégradation du squelette phosphodiester est obtenue dans des conditions drastiques (acide concentré et chauffage) auxquelles ne résistent pas les autres liaisons, cette dégradation conduit à la libération d'un mélange de phosphates, oses et bases. Dans des conditions douces (pH 4), seules les liaisons N-osidique avec les purines sont hydrolysées.

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

- les ADN résistent aux pH basiques : par exemple, à pH 13 et à 37°C on a une dizaine de coupures de ponts phosphodiester par million de ponts
- les ARN sont totalement hydrolysés en leurs ribonucléotides en quelques minutes à 37°C et à pH 11. 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.

L'hydrolyse enzymatique

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

Les nucléases

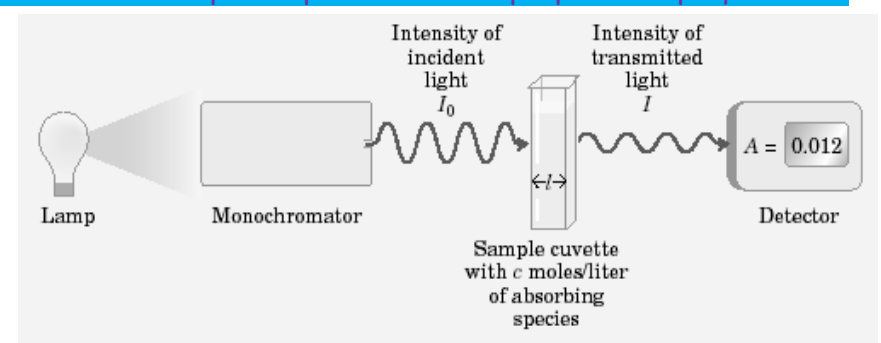
Elles présentent des niveaux de spécificité et sont classées par :

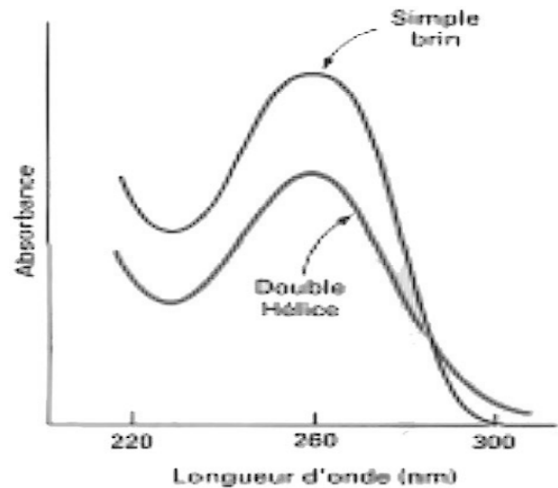
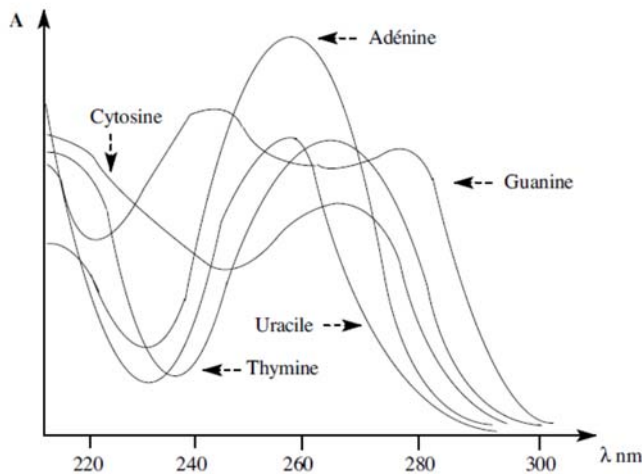
- leur mode d'attaque de la chaîne : extrémité (exo) ou intérieur (endo)
- leurs spécificité vis-à-vis du substrat : ADN, ARN ou les deux et de la structure, simple ou double brin
- leur spécificité de reconnaissance des sites : bases ou leur enchaînement
- le type de coupure de la liaison phosphodiester

Absorbance et Structure de l'ADN

Les propriétés spectrales

Les hétérocycles des différentes bases ainsi que leurs nucléosides ou dérivés, nucléotides, présentent des spectres d'absorption caractéristiques dans l'ultraviolet, Spectres dépendant du pH. L'aire de ces spectres dans cette région est plus élevée pour les purines (à deux cycles) : leurs absorptions sont donc plus importantes. Ces propriétés optiques sont communément utilisées pour la détection, le dosage et le contrôle de pureté d'acides nucléiques. La fluorescence de ces bases est par contre inutilisable : l'émission se situe dans la région UV300-320 nm et elle est très faible (400 fois plus faible que celle du tryptophane pour les purines et 2500 fois plus faible pour les pyrimidines)





Spectre d'absorption

$Abs = f(\text{longueur d'onde})$, Max d'absorbance à 260 nm \neq Tryp (280 nm)

$Abs = \epsilon l [C]$ (loi de Beer-Lambert). $\epsilon_{\text{simple brin}} > \epsilon_{\text{double brin}} (+ 25\%)$

Brins d'ADN peuvent se dissocier \Rightarrow rupture des liaisons H ; Augmentation de température ou pH extrême

Température de fusion (T_m) : 50% de l'ADN est dénaturé

Fusion de l'ADN

La température de fusion **augmente** avec la teneur en GC% de l'ADN

E. coli : GC% = 50 $T_m = 72^\circ\text{C}$

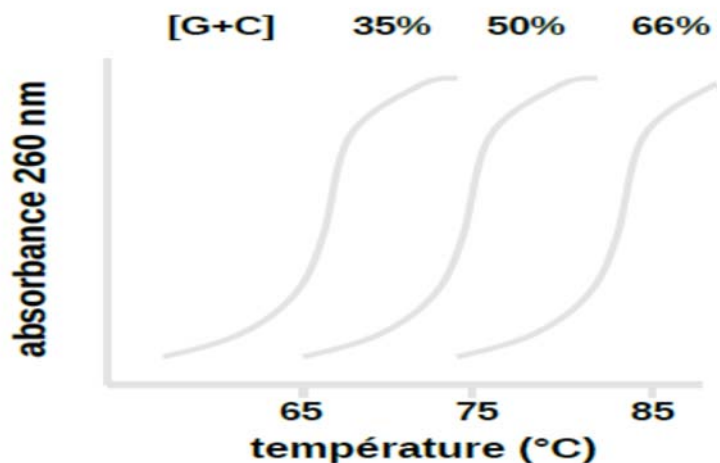
P. aeruginosa : GC% = 66 $T_m = 79^\circ\text{C}$

Régions riches en AT : premières à fondre (fusion)

- Réassociation spontanée quand T diminue (hybridation)

- Molécules longues, donc fragiles - se fragmente facilement hors de la cellule

- Dans la cellule, l'ADN est super-enroulé (enzymes topoisomérases)



- Le spectre d'absorption de l'ADN natif n'est pas identique à celui du même ADN dénaturé 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**.

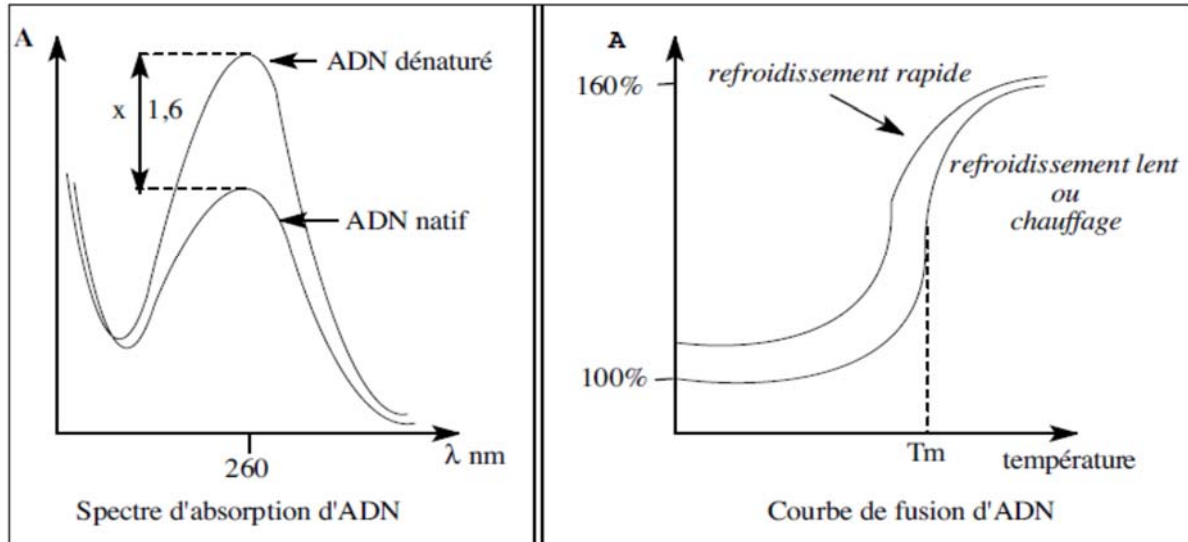
- L'absorption de l'ADN natif, à 260 nm, en fonction de la température (courbe de fusion), présente l'allure d'une sigmoïde : le point d'inflexion de cette courbe, qui correspond à la Demi-variation d'absorbance, est la température de fusion de la molécule, notée **T_m** .

- Lors d'un refroidissement lent, l'absorption suit la courbe de fusion en sens inverse. Lors d'un refroidissement rapide, l'absorption ne suit pas la courbe de fusion en sens inverse mais une autre courbe qui n'aboutit à la même valeur originale de l'absorption, mais à une valeur plus élevée : c'est le phénomène **d'hystérésis**.

- Il faut noter que la température de fusion T_m est dépendante de la force ionique du milieu et qu'elle diminue lorsque cette dernière augmente (dans des milieux où $[NaCl] > 1M$).
- La valeur de la température de fusion T_m est d'autant plus élevée que le pourcentage de bases G + C est grand :

- 65 °C pour l'ADN d'*E. Coli* où G+C est égal à 50%,

- 76 °C pour l'ADN de *P. aeruginosa* où G+C est égal à 68%



fondements de la bio. mol. cours

Lakhal