

CHAPITRE I : L'ADN (structure et propriétés)

L'information génétique désigne l'ensemble des informations qui permettent l'édification et le fonctionnement d'un organisme ; l'existence d'une grande variation de l'information génétiques selon l'espèce et une conservation de cette information génétique au sein de l'espèce ainsi sa transmission aux cours des générations d'une manière strict pour maintenir les caractères d'une espèce afin d'assurer sa longévité .; Ceci n'est pas le fait du hasard mais il suit un programme bien précis, ce qui fait pensé à l'existence d'un support moléculaire de cette information génétique.

1- L'ADN porteur de l'information génétique

1.1. Mise en évidence (de l'existence d'un support porteur de l'information génétique) : Expérience de GRIFFITH

Le premier phénomène qui a confirmé l'existence d'un support de l'information génétique et qui allait permettre de progresser dans l'identification de ce support de l'hérédité a été rapporté en 1928 par Fred Griffith en étudiant la transformation bactérienne

Griffith décrit deux souches de pneumocoques *Diplococcus pneumoniae* :

- La souche R (rough) : donnant un aspect rugueux de colonies en culture sur un milieu de culture artificiel
- La souche S (smooth) : donnant un aspect lisse de colonies en culture sur un milieu de culture artificiel grâce à la capacité de cette souche de synthétiser des polysaccharides autour d'elle et de les organiser pour former une capsule polysaccharidique. Ce caractère lui permet de s'échapper au système immunitaire donc la souche S est mortelle pour la souris lorsqu'elle lui est injectée.
- La souche R est incapable de synthétiser la capsule polysaccharidique suite à une mutation du gène codant l'enzyme responsable de la synthèse de la capsule, par conséquent, lorsqu'elle est injectée à une souris elle ne conduira pas à sa mort (elle n'est pas nocive)
- Griffith observe que l'injection des souches S traitées préalablement par la chaleur (tuées) n'est plus létale pour les souris

- Griffith a injecté conjointement des bactéries S chauffées (tuées par la chaleur) mélangées à des bactéries R vivantes. Cette fois, les souris meurent de septicémie. Les bactéries R, au contact des débris de bactéries virulentes tuées par la chaleur peuvent transformer en bactéries virulentes des bactéries initialement non pathogènes, les bactéries R ont donc acquis un caractère pathogène qu'elles ne le possédaient pas précédemment (la capsule). Ce phénomène a été appelé « transformation bactérienne »

Ceci suggère donc qu'il existe chez les cellules un « facteur transformant », probablement libéré par la chaleur, susceptible d'être intégré par d'autres bactéries, et qui leur confère de façon héréditaire de nouvelles propriétés génétiques

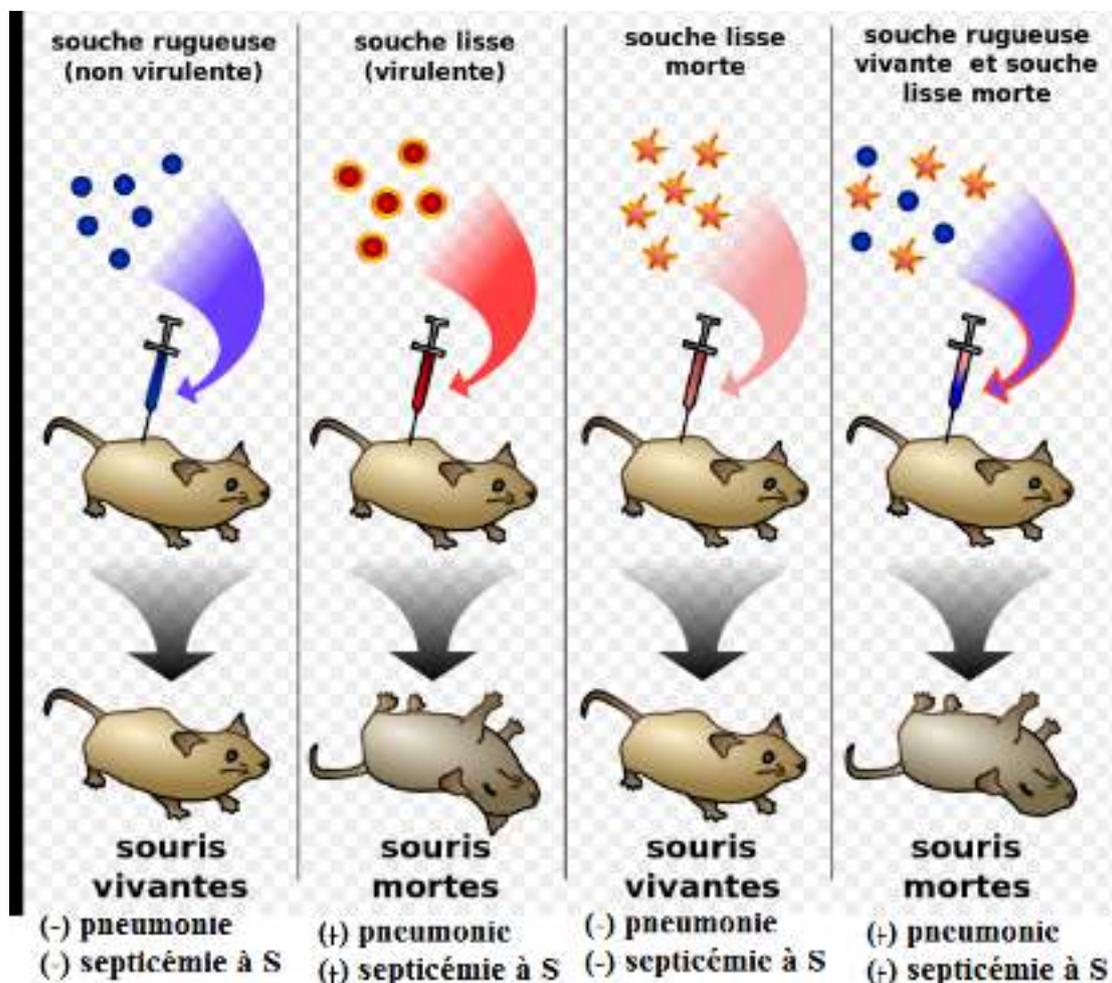


Figure 1 : Fred Griffith en 1928 a pu montrer l'existence d'un facteur porteur de l'information génétique (support de l'hérédité), où il a été nommé alors « **facteur transformant** » ou encore « **principe transformant** »

1.2. La transformation *in vitro* (Travaux de DAWSON et SIA, Travaux de ALLOWAY)

DAWSON et SIA (1931) ont rapporté dans leurs expériences qu'il est possible d'effectuer une transformation de type *in vitro*, leur méthode consiste à inoculer une petite quantité de souches R de pneumocoque qui dérivée la forme S d'un type dans du sang (bouillon) contenant un sérum anti R et une quantité de souches S (tuées) d'un autre type de pneumocoque

Quand des solutions de souches S lysées par congélation et décongélation et plus tard par chauffage à 60°C ont été substituées aux bactéries entières aucune transformation ne s'est produite.

La transformation des pneumocoques d'un type spécifique dans ceux d'un autre type a été réalisée seulement en ajoutant aux cultures de R vivantes des pneumocoques S tuées par la chaleur

En essayant d'analyser la nature de ce phénomène, il a semblé souhaitable de déterminer si le principe actif responsable de la transformation pourrait être existait en forme soluble à partir des souches S

Travaux d'ALLOWAY

Les souches de pneumocoques avirulentes (R) dérivant des formes d'un type spécifique de souche S peuvent être cultivées sur un bouillon contenant le sérum anti-R

1.3. Analyse du facteur transformant : Travaux de AVERY, MC LEOD et MC CARTY (1944).

La nature biochimique du matériel génétique est élucidée en 1944 par les travaux de Oswald AVERY, MC LEOD et MC CARTY. Ils reprennent les expériences de Griffith sur la transformation bactérienne, et cherchent à purifier le facteur transformant du pneumocoque

En effet, l'ADN extrait d'une souche S suffit à lui seul pour transformer une souche non virulente en souche virulente

Les expériences réalisées ainsi que les résultats obtenus sont représentés dans le schéma ci-dessous

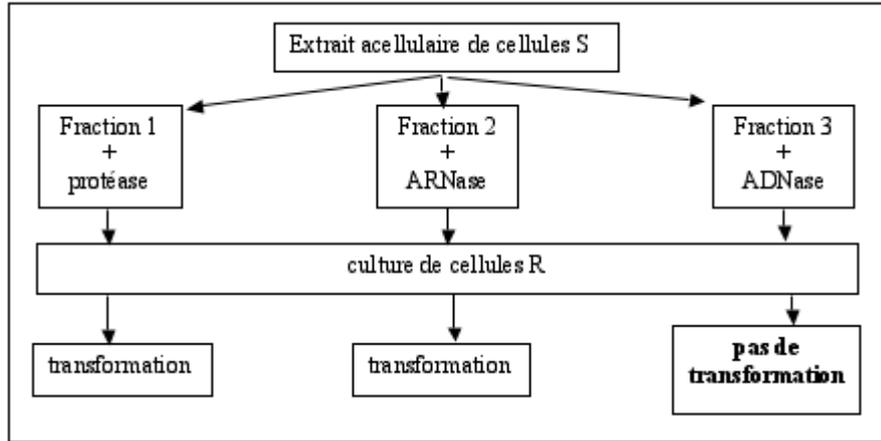


Figure 2 Expérience d'Avery, Mac Leod et Mac Carthy : La caractérisation du facteur transformant à montrer qu'il n'est autre que l'ADN

2- Structure et propriétés de l'ADN

L'ADN est un polymère, fait d'unités appelées nucléotides ; Le nucléotide est constitué d'un phosphate + un sucre + une base azotée.

Dans l'ADN, le nucléotide est un désoxyribonucléotide (dans l'ARN, le nucléotide est un ribonucléotide)

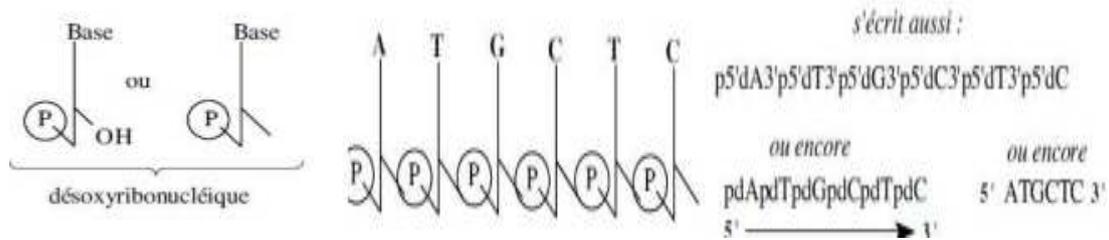
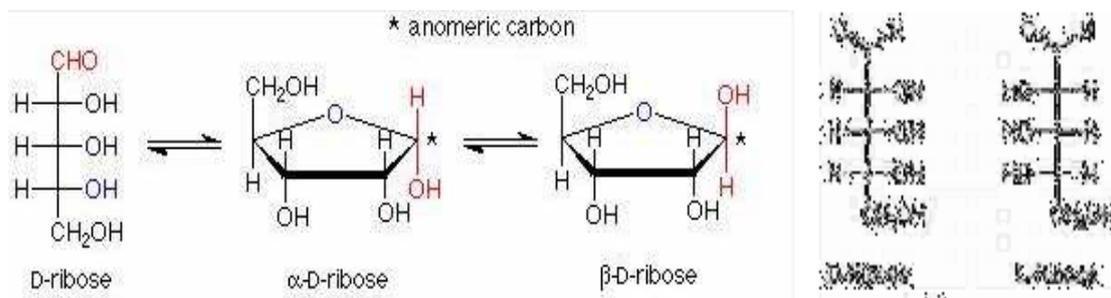
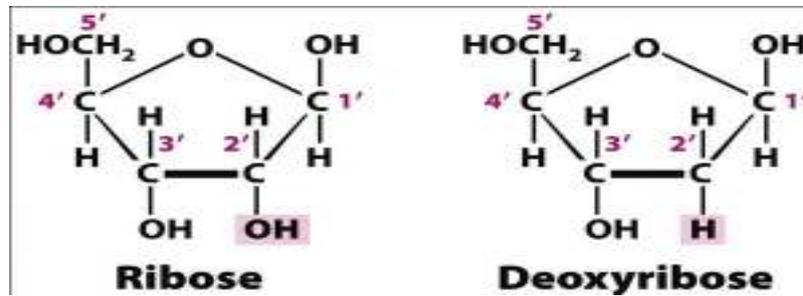


Figure : représentation simplifié d'un nucléotide et d'un polynucléotide

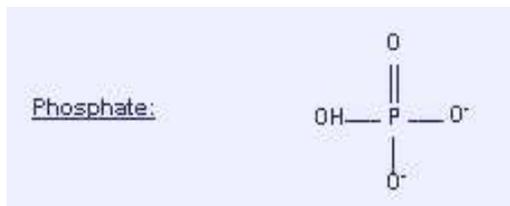
a) Sucre:

B D 2 désoxyribose, qui est un pentose (sucre à 5 carbones) cyclique (le sucre de l'ARN est un ribose).

Les carbones du sucre sont notés de 1' à 5'. Un atome d'azote de la base azotée se lie au C1' (liaison glycosidique), et le phosphate se lie au C5' (liaison ester) pour former le nucléotide. Le nucléotide est donc: phosphate - C5' sucre C1' - base.



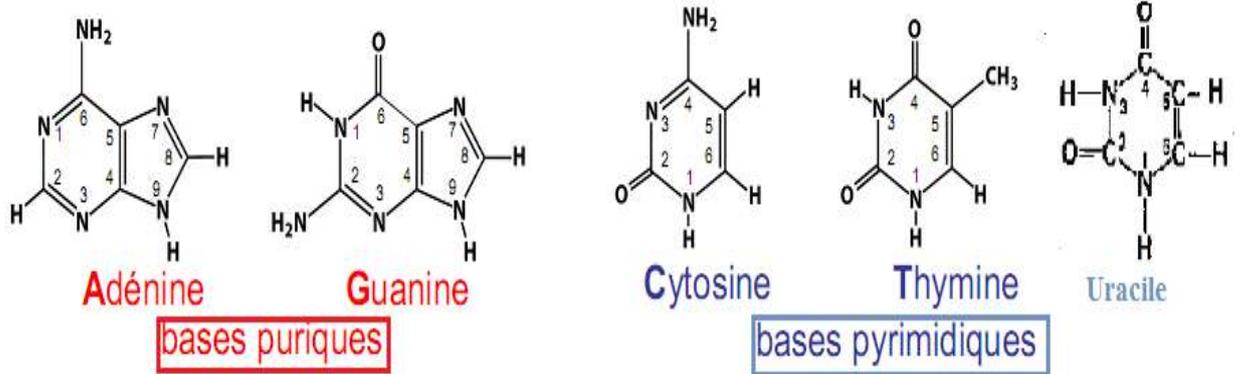
b) Acide phosphorique (acide ortho phosphorique): H₃PO₄



c) Les bases azotées.

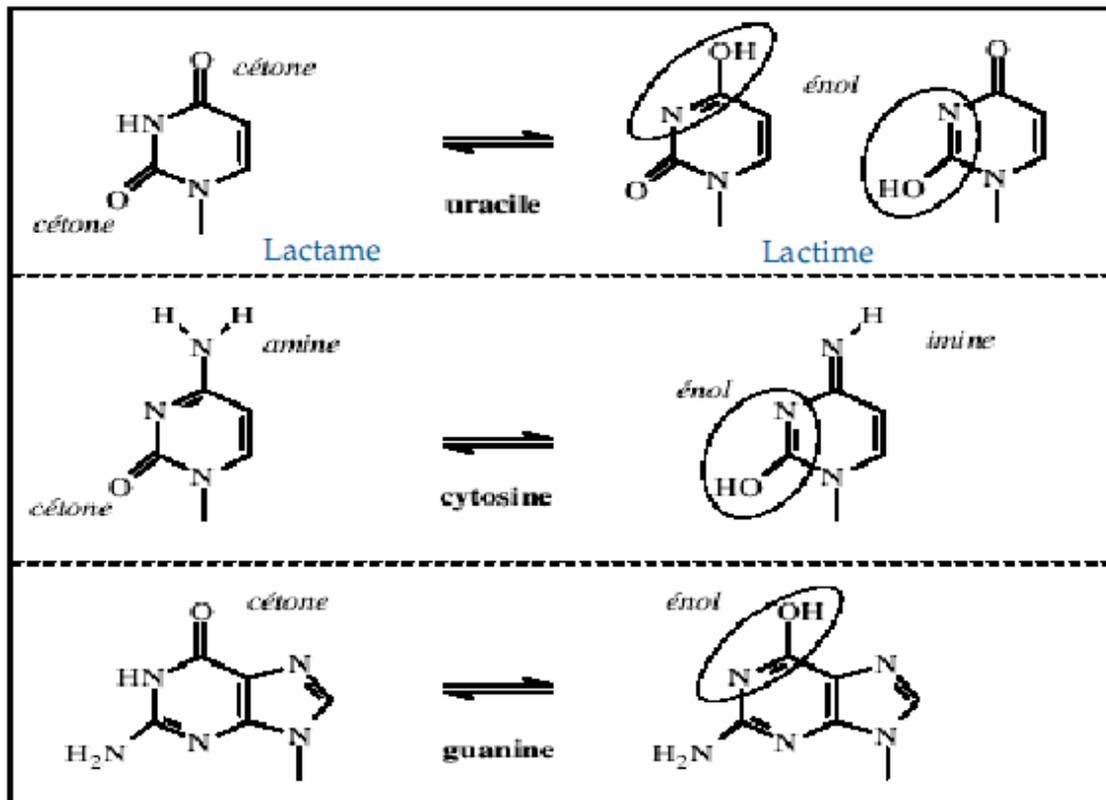
Hétérocycles aromatiques; ce sont des purines et des pyrimidines.

- Purines: adénine (A) et guanine (G).
- Pyrimidines: cytosine (C) et thymine (T) (la thymine est remplacée par l'uracyle (U) dans l'ARN).



2.1.2. Les bases modifiées dans l'ADN

Conjugaison des doubles liaisons : Les tautomères :



A PH 7 : les formes prépondérantes sont : lactame (cétone) et amino

Les bases modifiées

La modification peut avoir lieu sur des sites cycliques ou exocycliques

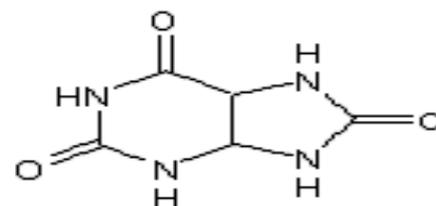
- Dérivés méthylés :

- La 5- méthylcytosine est trouvée dans l'ADN des plantes et des animaux sauf les insectes. Cette méthylation est un signal négatif de la régulation de l'expression des gènes. Le groupe méthyle favorisant une conformation de l'ADN qui ne peut fixer un facteur de transcription
- La N6-méthyladénine est présente dans les bactéries. Cette méthylation permet aux enzymes de restrictions de la bactérie de reconnaître son propre ADN vis-à-vis d'ADN étranger (virus)
- D'autres méthylation permettent le fonctionnement d'un système de correction des éventuelles erreurs de réplication de fonctionner
- Dérivés Hydrogénés, soufrés....etc.
- Les ARN et principalement les ARNt contiennent une variété étendue de dérivés : des dérivés hydrogènes (5,6 dihydrouracile) ou soufrés (thiouracile ou 2-oxy-4thiopyrimidine) des pyrimidines ou encores des formes altérées de la guanine, la xanthine (2,6-oxypurine) et l-hypoxanthine (6-oxypurine)

Des dérivés d'intérêt biologiques

- **Acide urique**

L'acide urique est issu de la dégradation des bases puriques : L'adénine et la guanine sont dégradées en acide inosinique puis en hypoxanthine. Par l'intermédiaire de la xanthine oxydase, l'hypoxanthine est transformée en xanthine et la xanthine en acide urique. La guanine peut directement donner de la xanthine grâce à une guanase. Il est quasiment insoluble dans l'eau



Noyau pyrimidique Noyau imidazole

Acide urique

L'élimination de l'acide urique est urinaire chez l'être humain et les primates supérieurs, qui ne possèdent plus l'enzyme conduisant à l'allantoïne présente chez la plupart des autres mammifères.

Chez les oiseaux et les reptiles, l'acide urique est aussi le produit d'élimination des purines, mais son excrétion se fait dans les selles et non dans les urines comme chez l'homme (uricotélie)

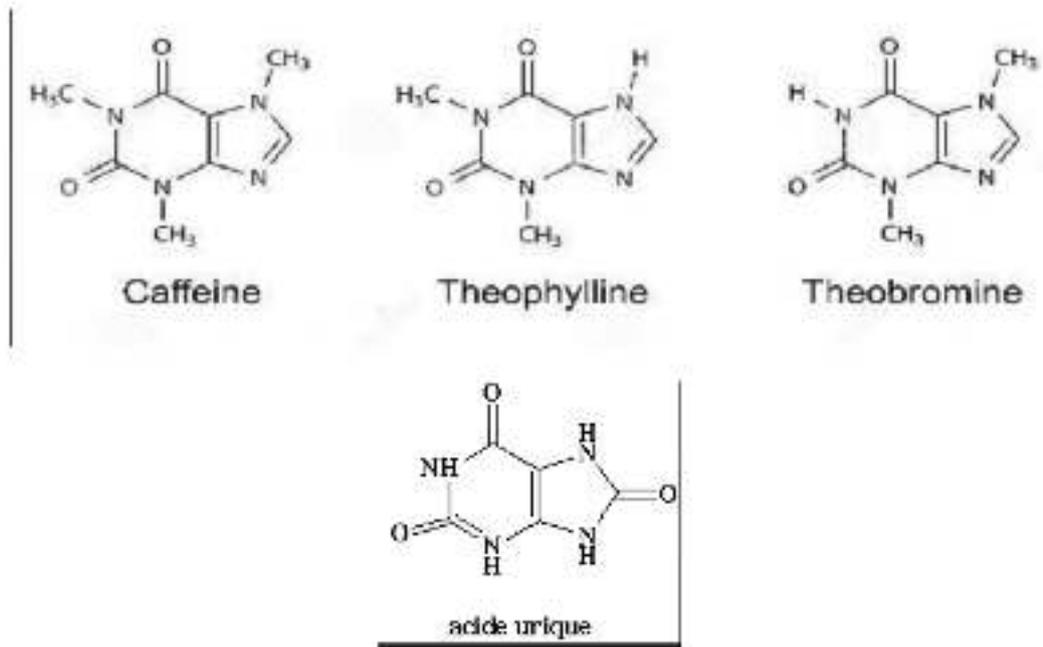
L'augmentation du taux sanguin en acide urique (hyperuricémie), peut être secondaire soit à une hyperproduction d'acide urique, soit à une diminution de son élimination rénale. L'hyperuricémie chronique est pratiquement constante dans la goutte.

La **goutte** est une forme particulière d'arthrite. Toutes les articulations sont susceptibles d'être touchées, mais le plus souvent, la maladie se déclare d'abord dans celle située à la base du **gros orteil**. L'articulation devient alors rouge violacé et enflée.

Lorsqu'il y a un excédent, l'acide urique se dépose graduellement dans l'organisme sous forme de **cristaux**, entre autres dans les articulations. Ces dépôts déclenchent des réactions inflammatoires.

- **Caféine, Théobromine et théophylline** : des produits de métabolisme des alcaloïdes végétaux : caféine (stimulant), Théobromine et théophylline (stimulants cardiaques, relaxants des muscles lisses et vasodilatateurs)

Des dérivés d'intérêt biologiques

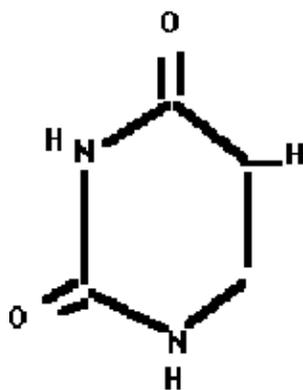


Des analogues de bases synthétiques

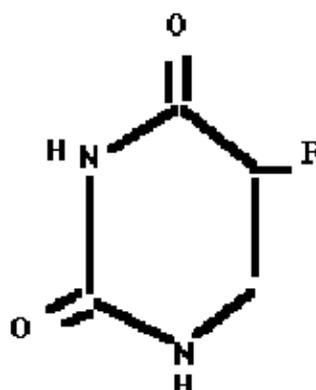
Des analogues de bases nucléiques sont utilisés :

- Comme molécules de marquage en biologie moléculaire : 5-bromouracile sur lequel peuvent être greffés des molécules marqueurs
- Comme agents thérapeutiques, agissant en compétition avec les bases naturelles, ils bloquent la multiplication des bactéries ou la mitose :
 - Antitumoraux : dérivés fluorés (5-fluorouracile), thiols (6-thiopurine) ou aza (N remplace un C : 8-azaguanine)

URACILE

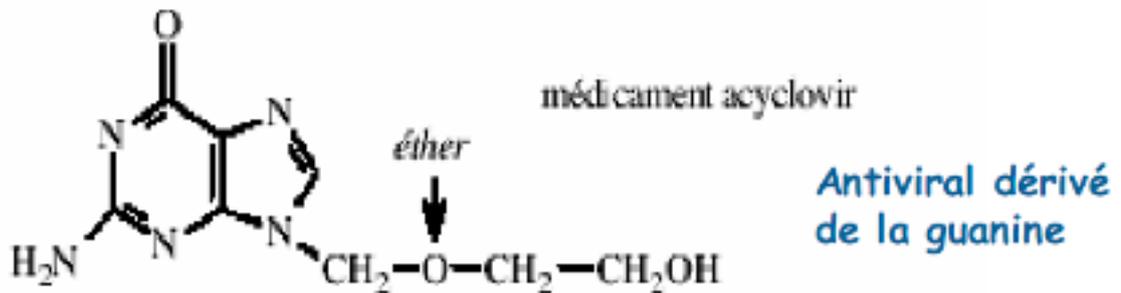


5 FLUORO-URACILE



Anticancéreux

- Antiviral classique (acyclovir) est un dérivé de la guanine : (2-hydroxyéthoxyl) 9-méthylguanine :



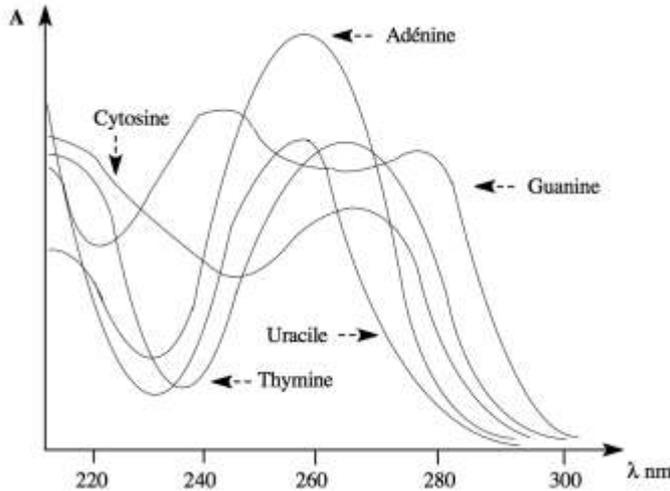
L'acyclovir est un antiviral. Il est lui-même un composé pharmaco-dynamiquement inactif.

L'acyclovir est un inhibiteur spécifique des *herpes virus*, avec une activité *in vitro* sur les virus Herpes simplex (HSV), et varicelle-zona (VZV). Après avoir été phosphorylé en acyclovir triphosphate, il inhibe la synthèse de l'ADN (acide désoxyribonucléique) viral. La première étape de la phosphorylation est assurée uniquement par une enzyme virale spécifique. Pour les virus HSV et VZV, il s'agit d'une thymidine kinase virale qui est présente uniquement dans les cellules infectées par le virus. La phosphorylation de l'acyclovir monophosphate en di- et triphosphate est assurée par des kinases cellulaires. L'acyclovir triphosphate est un inhibiteur compétitif sélectif de l'ADN polymérase virale, et l'incorporation de cet analogue nucléosidique stoppe l'élongation de la chaîne d'ADN, interrompant ainsi la synthèse d'ADN viral. La réplication virale est donc bloquée.

2.1.3. Les propriétés importantes des bases azotées

a- propriétés optiques

Les bases azotées possèdent un cycle aromatique où les électrons se délocalisent. Ainsi les bases azotées absorbent dans l'ultra-violet et le pic d'absorption maximal se situe autour de 260 nm



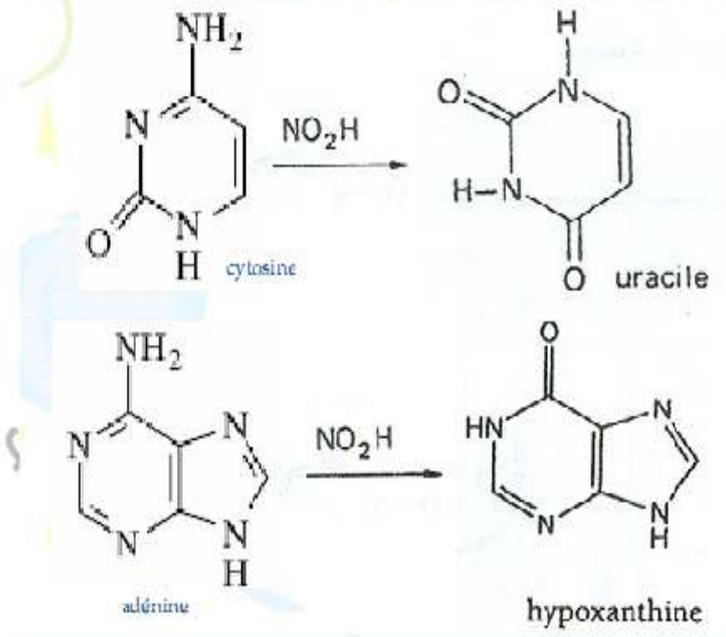
Les bases A, T, G, C, U ont une absorption maximale à ≈ 260 nm

La transformation chimique des bases azotées

1) la lente désamination est spontanée dans les cellules (100 fois moins importante pour les purines par rapport aux pyrimidines) :



Désamination lente par l'acide nitreux



2) les radiations altèrent les bases :

- l'irradiation dans l'ultraviolet ouvre les liaisons de deux bases superposées et les pontes par des liaisons covalentes
- les radiations ionisantes (rayons X ou gamma) ouvrent les cycles et les cassent.

3) de nombreux agents chimiques réagissent avec les bases :

- l'acide nitreux (HNO2) et l'hydrogénosulfite de sodium HNO-3 ont une action désaminante. Ils font partie des conservateurs dans l'industrie alimentaire.
- les espèces réactives de l'oxygène (peroxydes, radicaux libres) font subir des dommages oxydatifs

2.1.5. Les nucléosides.

Un nucléoside résulte de la condensation d'une base purique ou pyrimidique avec un pentose par une liaison covalente (liaison N-osidique).

Nomenclature : on rajoutant un suffixe «idine » aux bases pyrimidique et un suffixe « osine » aux bases puriques

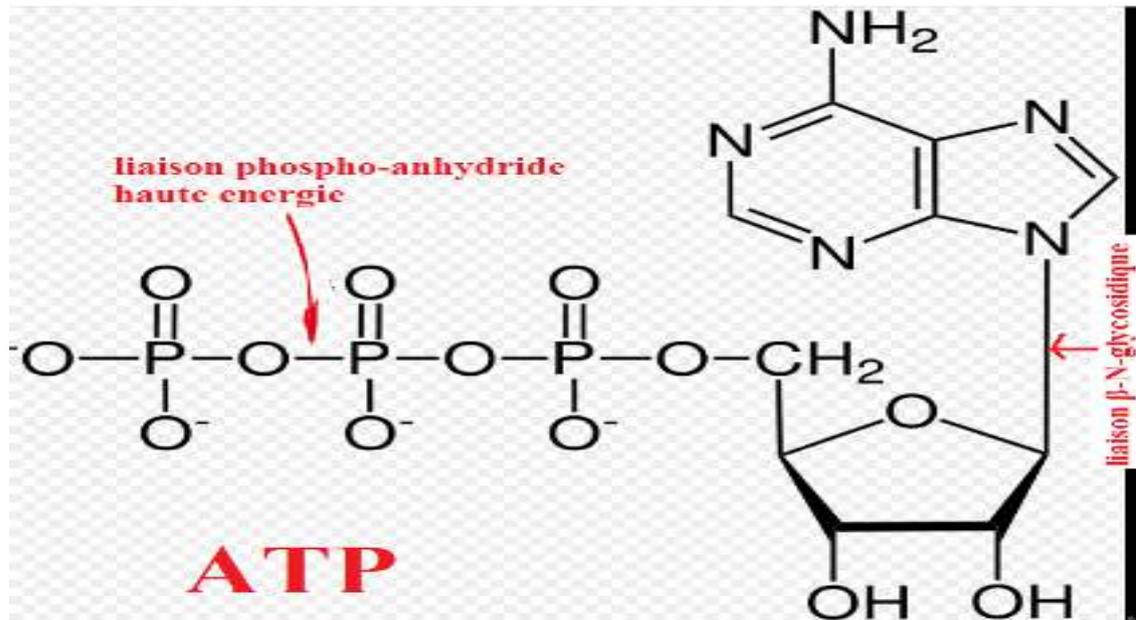
BASE	RIBONUCLEOSIDE	DÉSOXYRIBONUCLEOSIDE
Adénine	Adénosine	Désoxyadénosine
Guanine	Guanosine	Désoxyguanosine
Uracile	Uridine	Désoxyuridine
Cytosine	Cytidine	Désoxycytidine
Thymine	Thymine ribonucléoside (rare)	Désoxythymidine ou thymidine
	C'est le Ribonucléoside Thymine ou encore Ribo thymidine	C'est la Thymidine

2.1.6. Composition chimique d'un nucléotide.

Les travaux de Kornberg révélèrent que les précurseurs de l'ADN étaient des désoxynucléotides riches en énergie == désoxyNucléosides Tri phosphate (dATP, dCTP, dTTP, dGTP).

Chaque désoxynucléotide est composé de : base azotée (A, T, C, G), un pentose (2'-désoxy-β-D-Ribose) et d'acide phosphoriques (3 résidus P par désoxynucléotide libre),

La liaison formée entre deux phosphates donne un anhydride (liaison phospho-anhydride) qui est une liaison très riche en énergie. La liaison entre le groupement acide du phosphate et l'hydroxyle du sucre donne une liaison ester ou encore : liaison phospho-ester (liaison entre l'acide ortho phosphorique H₃PO₄ et l'ose β -D-desoxyribose). La liaison formée entre le sucre et la base est une liaison osidique de type β-N-glycosidique (β-N-osidique)



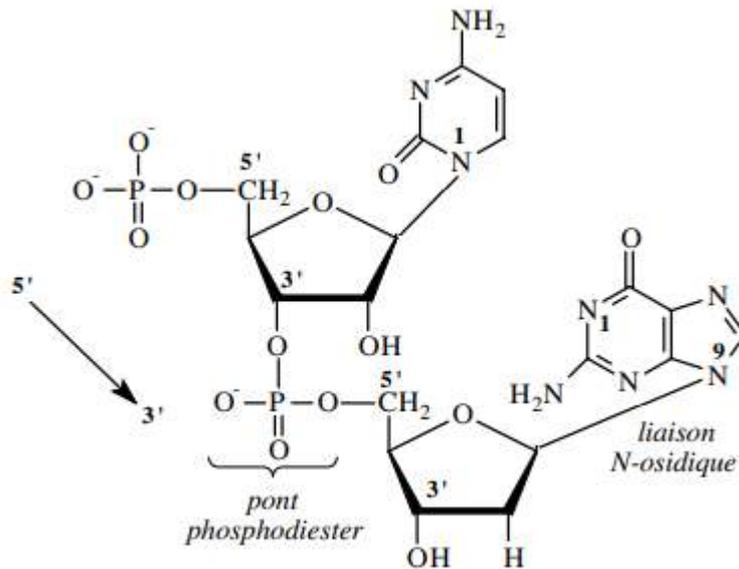
Nomenclature		
BASES	Ribonucléoside-5'-monophosphate	Désoxyribonucléoside-5'-monophosphate
Adénine	Adénosine-5'-monophosphate = AMP	Désoxyadénosine-5'-monophosphate = dAMP
Guanine	Guanosine-5'-monophosphate = GMP	Désoxyguanosine-5'-monophosphate = dGMP
Uracile	Uridine-5'-monophosphate = UMP	Désoxyuridine-5'-monophosphate = dUMP
Cytosine	Cytidine-5'-monophosphate = CMP	Désoxycytidine-5'-monophosphate = dCMP
Thymine	Thymine riboside-5'-monophosphate (rare)	Désoxythymidine-5'-monophosphate = dTMP

Si notre nucléotide est 02 fois phosphorylé on met le nom de nucléoside suivi par l'expression « diphosphate » : NDP (Nucléoside di phosphate). Alors quand t'il est 03 fois phosphorylé on met le nom de nucléoside suivi par l'expression « Triphosphate » : NTP (Nucléoside Tri phosphate)

2.1.7. La liaison entre nucléotides (= Structure primaire de l'ADN)

La liaison entre nucléotides est assurés par des ponts phosphodiesters, ce sont des liaisons covalentes fortes permettant l'établissement de la structure primaire de l'ADN qui correspond au Squelette pentose phosphate=squelette ribose phosphate=ADN monobrin=ADN monocaténaire

Les polynucléotides sont faits de l'addition successive de monomères dans une configuration 5' -> 3' générale. Le squelette de la molécule est fait de la succession de phosphate-sucre (nucléotide n) - phosphate-sucre (nucléotide n+1), et ainsi de suite, liée de manière covalente, les bases étant à l'extérieur.



2.2. Structure spatiale de l'ADN.

2.2.1. Structure secondaire de l'ADN

La structure secondaire de l'ADN est assurée par des liaisons d'Hydrogènes, ce sont des liaisons faibles non covalentes donnant naissance à un ADN Bicaténaire antiparallèle ou ADN double brin antiparallèle

Les liaisons hydrogène entre les bases d'un brin et les bases de l'autre brin maintiennent les 2 brins unis

Une purine sur un brin se lie obligatoirement à une pyrimidine sur l'autre brin. En corollaire, le nombre de résidus purine est égal au nombre de résidus pyrimidine.

Appariement des bases : A se lie à T (par 2 liaisons hydrogène). G se lie à C (par 3 liaisons hydrogène: liaison plus stable)

Les liaisons hydrogène utilisées pour l'appariement des bases sont, respectivement, entre les résidus numéro : 1, 2, 6 de G avec les résidus numéro 2, 3, 4 de C

d'une part et entre les résidus numéro : 1, 6 de A avec les résidus numéro 3, 4 de T d'autre part (selon le modèle de Watson et Crick). Ces liaisons sont parfois différentes de celles définies dans le modèle de Watson et Crick décrit ci dessus; ainsi l' atome N7 de la purine est utilisé au lieu du N1 dans le modèle de Hoogsteen..

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

2.2.2. La double hélice.=Structure tertiaire de l'ADN

La double hélice représente la structure tertiaire de la molécule d'ADN double brin antiparallèle. La stabilisation de la double hélice s'effectue par des liaisons chimiques faible et non covalentes à la fois internes et externes:

- Liaisons hydrogène entre les bases
- Interactions hydrophobes et électroniques entre les bases
- Interactions des groupements sucre et phosphate avec le milieu aqueux (interactions hydrophiles).
- Interactions de Vander Waals

2.2.3. Les isoformes de la double hélice d'ADN (forme A, B, et Z)

Les différentes formes de l'ADN se distinguent par:

- Nombre de paires de bases dans chaque tour d'hélice.
- Pas de l'hélice (longueur)
- Diamètre hélicoïdal de la molécule
- Sens de la double hélice (droit, gauche).

A) ADN-B : La structure révélée par la diffraction aux rayons X (Travaux de Watson et Crick)

La forme B de l'ADN est la forme biologique la plus importante, elle correspond à la forme décrite par Watson et Crick en 1953. C'est une molécule très rigide et visqueuse d'une longueur immense et d'un diamètre très petit. 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 donc 4 motifs différents possibles pour la reconnaissance et l'accrochage dans le grand sillon, et seulement 2 dans le petit sillon.

B) ADN-A :

La forme "A" ressemble à l'ADN-B, mais elle est moins hydratée; elle n'existe pas in vivo.

C) ADN-Z

La forme Z est une double hélice lévogyre (à rotation gauche), dont le squelette présente une 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. 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. Les phosphates sont plus proches les uns des autres que dans l'ADN-B. L'ADN-Z ne peut pas former de nucléosomes.

- Une proportion importante de bases G-C favorise la conformation Z. La méthylation des cytosines, et certaines molécules présentes in vivo telle la spermine ou la spermidine stabilisent la conformation Z.

- Les séquences ADN passent de la forme B à la forme Z et vice versa: l'ADN-Z est une forme transitoire et réversible 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 (ou la réplication), près des promoteurs des gènes activement transcrits. Pendant la transcription, l'ARN polymérase (l'ADN polymérase pour la réplication) 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.
- 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.

Comparaison entre les trois isoformes (A, B, Z) de l'ADN

Paramètre	ADN A	ADN B	ADN Z
Sens de l'hélice	droite	droite	gauche
Motif répété	1 bp	1 bp	2 bp
Paire de bases par tour d'hélice	11	10	12
Pas de l'hélice par tour	2,82 nm	3,4 nm	4,56 nm
Diamètre	2,6 nm	2,0 nm	1,8 nm
Orientation des bases sur les résidus osidiques	anti	anti	Pyrimidine : anti, Purine : syn

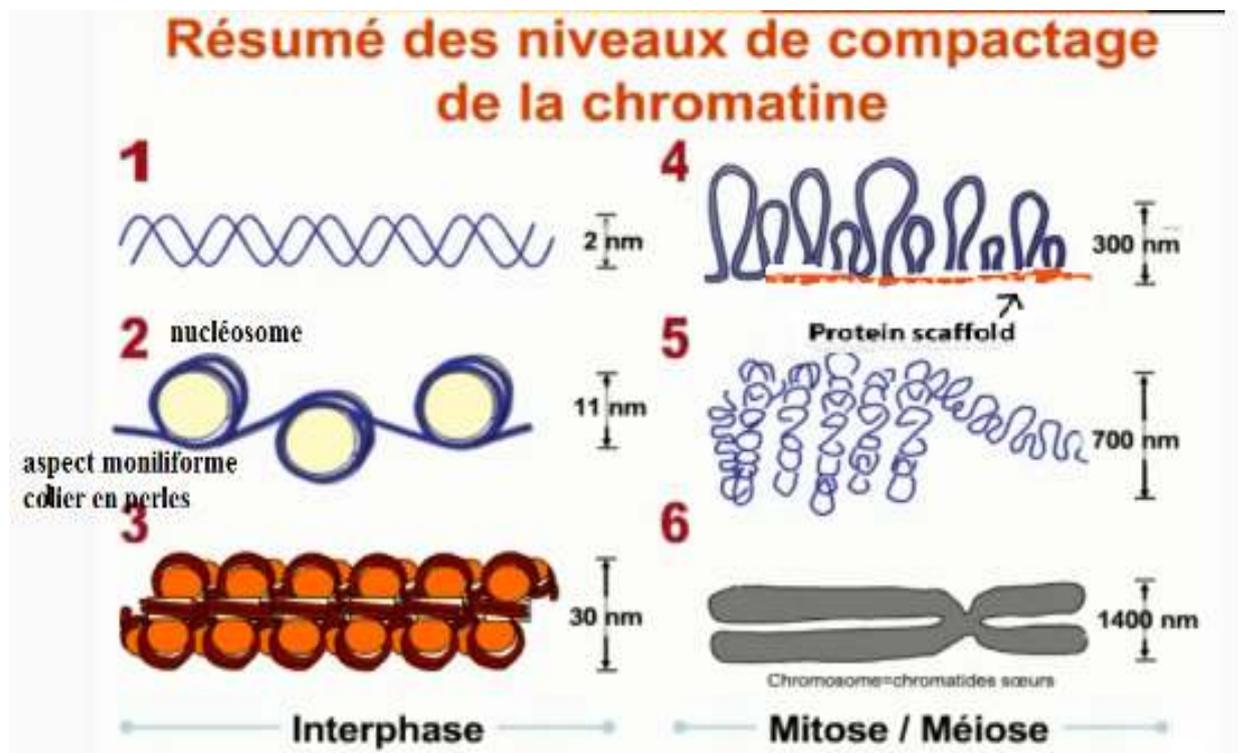
2.2.4. Structure quaternaire

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.

L'assemblage de l'ADN en chromatine comprend plusieurs étapes qui commencent par la formation de son unité fondamentale, le nucléosome, et finissent par des niveaux d'organisation supérieurs dont le chromosome métaphasique correspond à l'état maximal de condensation

La particule cœur, de l'histone, est composée de d'un octamère protéique comprenant deux exemplaires de chacune des histones H3, H4, H2A et H2B, autour duquel 146 pb d'ADN (chromatosome) enroulées selon environ 1,7 en 02 tour. L'ensemble sera stabilisé par les histones H1 en extérieur

D'autres facteurs interagissent avec les histones, par l'acétylation de leurs résidus lysine. L'état d'acétylation résulte d'un équilibre entre deux activités antagonistes : l'activité histone-acétyltransférase (HAT) et l'activité histone-désacétylase (HDAC) (ex:HAT A, présentant une activité histone-acétyltransférase assurant le relâchement de la chromatine, et HDAC1, histone-désacétylase favorisant la condensation de la chromatine.



2.3. Quelques propriétés de l'ADN

2.3.1. Taille et masse : caractéristiques spécifiques de l'espèce, fonction de la quantité des nucléotides

$1 \text{ pb} = 660 \text{ Da}$; $2 \cdot 10^6 \text{ Da} \approx 3000 \text{ pb} \approx 1 \mu\text{m}$ (sachant que la longueur de 10 pb dans une séquence d'ADN-B est égal à 3,4nm)

La viscosité :

La viscosité est due à la longueur importante et la rigidité relative de la double hélice. Plus la température augmente, plus la viscosité diminue (dénaturation thermique). L'ARN est moins visqueux que l'ADN car il est monocaténaire

Par conséquent : le nucléoplasme est plus visqueux que le cytosol

2.3.2. Densité : fonction de la nature des nucléotides

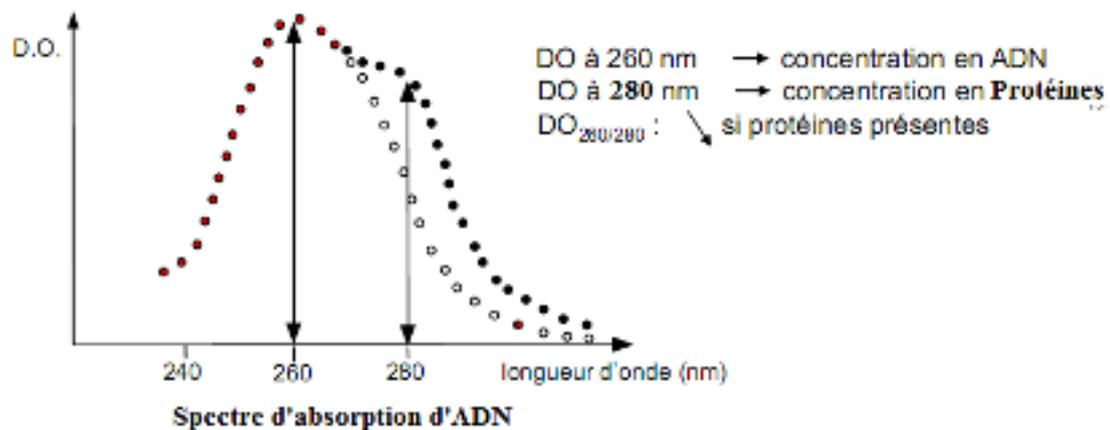
Et: $D_{ARN} > D_{ADN} > D_{Protéines}$

2.3.3. Absorption :

Les acides nucléiques (ADN et ARN) présentent un maximum d'absorption à 260nm

Les nucléotides libres absorbent plus qu'un polynucléotide d'ADN. Les polynucléotides monocaténaires (ARN et ADNs_b : simple brin) absorbent plus que les polynucléotides bicaténaires (ADN double brin)

Les protéines absorbent à 280 nm du fait de la présence d'acides aminés aromatiques : tyrosine, phénylalanine, tryptophane



La déviation de la courbe donnant un deuxième pic à 280 nm reflète l'existence de protéines donc l'ADN est impure

Le rapport DO_{260}/DO_{280} d'un extrait d'ADN indique le degré de pureté d'un échantillon donné. Plus ce rapport est proche de 2, moins il y a une contamination par les protéines. Un ADN pur doit avoir généralement un rapport DO_{260}/DO_{280} compris entre 1,7 (ou 1,8) et 2

Un rapport $DO_{260}/DO_{280} < 1,8$: reflète la Présence de contaminants (protéines surtout)

2.3.4. Dénaturation – renaturation

La **dénaturation de l'ADN**, également connu sous le nom **fusion de l'ADN** (F = fusion), est le processus par lequel le 'acide désoxyribonucléique double brin (*ADN_{db}*) se déroule et se sépare en deux brins simples (*ADN_{sb}*) de rupture des liaisons hydrogène entre les bases appariées par : la chaleur, les PH extrêmes, et autres méthodes chimiques (alcool ; urée...)

La dénaturation de l'ADN est un phénomène à connaître car :

- Cela permet de mesurer le rapport A/T vs G/C
- Il est à la base des techniques d'hybridation avec des sondes marquées

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 .

Température de fusion

La Température de fusion (T_m) pour Melting temperature, correspond à la température pour laquelle la moitié (50%) de l'ADN est sous forme dénaturée

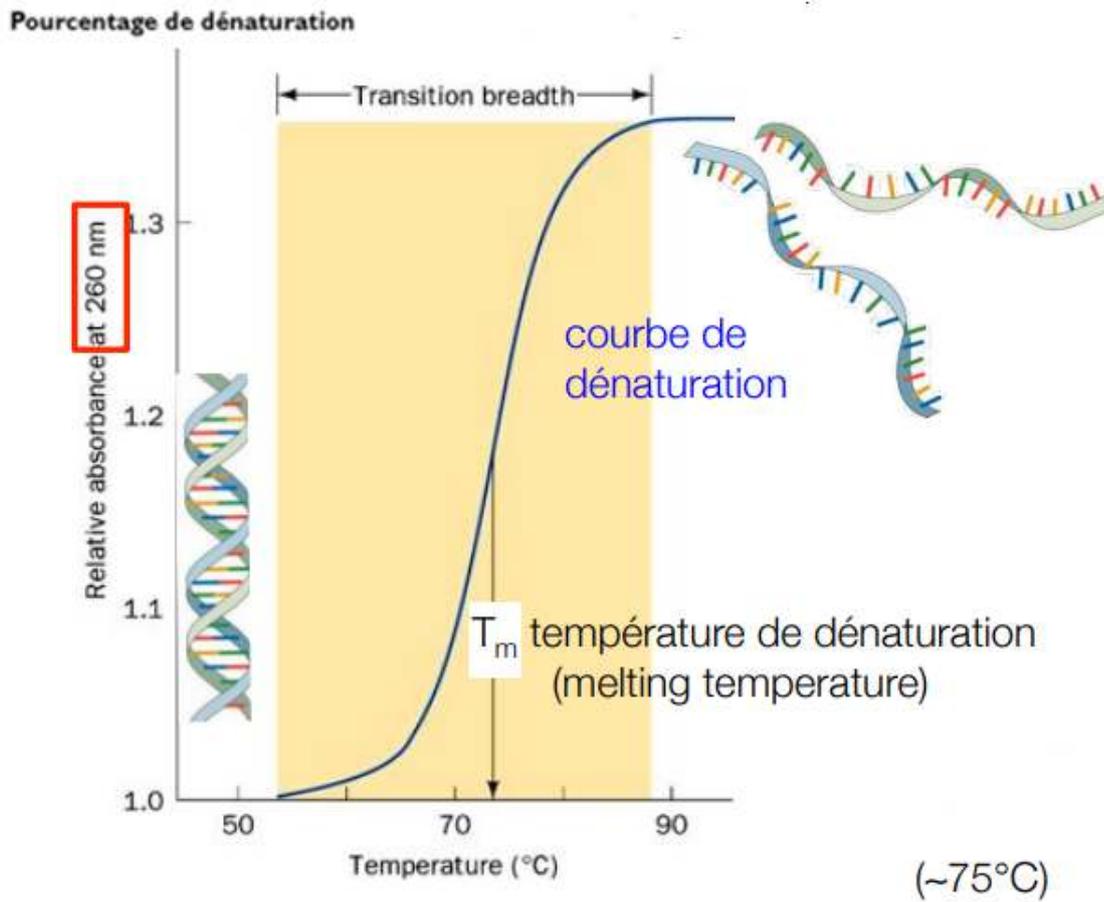


Figure 2: courbe de fusion

Calcul de la T_m

- Oligonucléotide inférieur à 20 nt

- $(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4 = T_m \text{ en } ^\circ\text{C}$

- Oligonucléotide supérieur à 20 nt

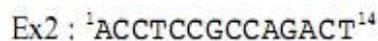
- $[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] \times (1 + [(N-20)/20]) = T_m \text{ en } ^\circ\text{C}$

La température de fusion peut être estimée par le calcul pour des oligonucléotides de moins de 20 nucléotides :

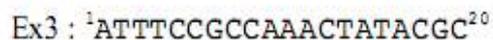
$$T_m = (A + T) \times 2 + (G + C) \times 4$$



$$T_m = (4 + 4) \times 2 + (1 + 5) \times 4 = 16 + 24 = 40^\circ\text{C}$$



$$T_m = (3 + 2) \times 2 + (7 + 2) \times 4 = 10 + 36 = 46^\circ\text{C}$$



$$T_m = (6 + 5) \times 2 + (7 + 2) \times 4 = 22 + 36 = 58^\circ\text{C}$$

Elle dépend du %GC, du pH et de la force ionique.

Plus le %GC augmente, plus la température de fusion augmente.

Plus la force ionique augmente (concentration en NaCl supérieure à 1 M), plus la température de fusion diminue.

- Il est possible de mesurer directement la température de fusion d'un ADN double brin en mesurant l'augmentation de l'absorbance de la solution à 260 nm en fonction de la température.
- Toutefois, on se contente la plupart du temps d'une estimation à partir de la composition de l'oligonucléotide. Si celui-ci a une longueur égale ou inférieure à 20 nt on compte 2°C par couple A:T et 4°C par couple G:C. A partir de N = 20, on corrige d'un multiplicateur proportionnel à la longueur au delà de ce chiffre : $1 + [(N-20)/20]$.

- Pour être plus précis il faut tenir compte aussi de la concentration en sodium du tampon d'hybridation. Lorsque cette concentration n'excède pas 1M, on utilise la formule :

$$T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41[(\text{G}+\text{C})/\text{N}] - (600/\text{N})$$

- Lorsqu'il existe des misappariements (mismatches) il faut soustraire de la T_m calculée autant de degrés C. que le pourcentage de séquence non-appariée de l'oligonucléotide.
- Lorsqu'on travaille en présence de formamide, il faut encore diminuer la T_m en fonction de la concentration de l'amide :

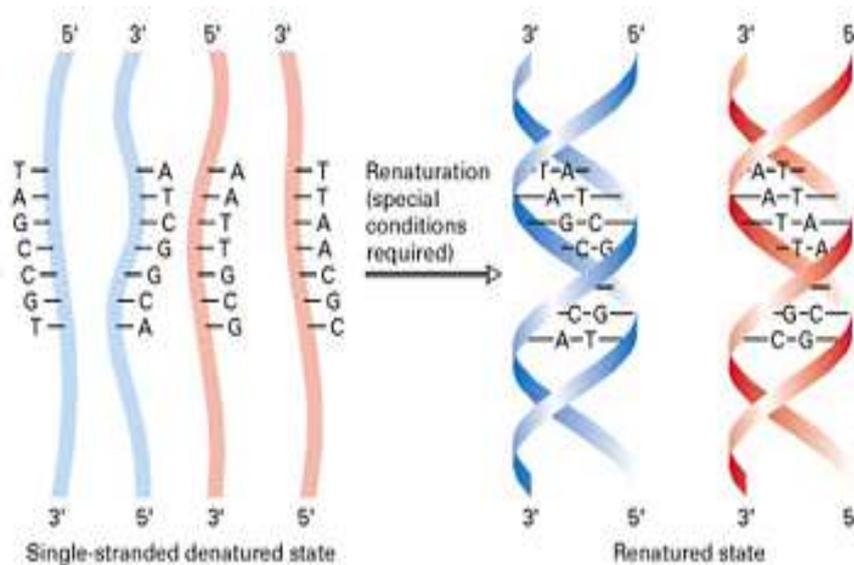
$$T'_m = T_m - 0,6(\% \text{ formamide})$$

La dénaturation (fusion) de l'ADN s'accompagne de modifications des propriétés physico-chimiques :

- ✓ Augmentation de l'absorption dans l'UV : effet hyperchrome (hyperchromocité)
- ✓ Diminution de la viscosité
- ✓ Augmentation de la densité

Renaturation : c'est le réappariement spontané des 2 brins complémentaires d'ADN.

Le COT (concentration over time) est le paramètre définissant la renaturation



L'ADN dénaturé sous forme de simple brin peut être renaturé par refroidissement :

- si le refroidissement est rapide : les 2 brins restent séparés sous forme de simple brin,
- si le refroidissement est lentement : les 2 brins se réappariaient par complémentarité des bases et la double hélice est reconstituée.

La renaturation thermique est à la base du principe de l'hybridation moléculaire (sondes, PCR,...)

Le COT (concentration over time = concentration dans le temps) (détail supplémentaire)

L'analyse C0t, une technique basée sur les principes de la cinétique de réassociation de l'ADN, est une technique biochimique qui mesure la quantité d'ADN répétitif dans un échantillon d'ADN tel qu'un génome. Il est utilisé pour étudier la structure et l'organisation du génome et a également été utilisé pour simplifier le séquençage des génomes qui contiennent de grandes quantités de séquences répétitives

La procédure consiste à chauffer un échantillon d'ADN génomique jusqu'à ce qu'il se dénature en la forme simple brin, puis à le refroidir lentement, de sorte que les brins puissent se réassocier. Pendant que l'échantillon refroidit, des mesures sont prises de la quantité d'ADN appariée en base à chaque température.

La quantité d'ADN simple et double brin est mesurée en diluant rapidement l'échantillon, ce qui ralentit la réassociation, puis en liant l'ADN à une colonne d'hydroxylapatite. La colonne est d'abord lavée avec une faible concentration de tampon phosphate de sodium, qui élue l'ADN simple brin, puis avec des concentrations élevées de phosphate, qui élue l'ADN double brin. La quantité d'ADN dans ces deux solutions est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

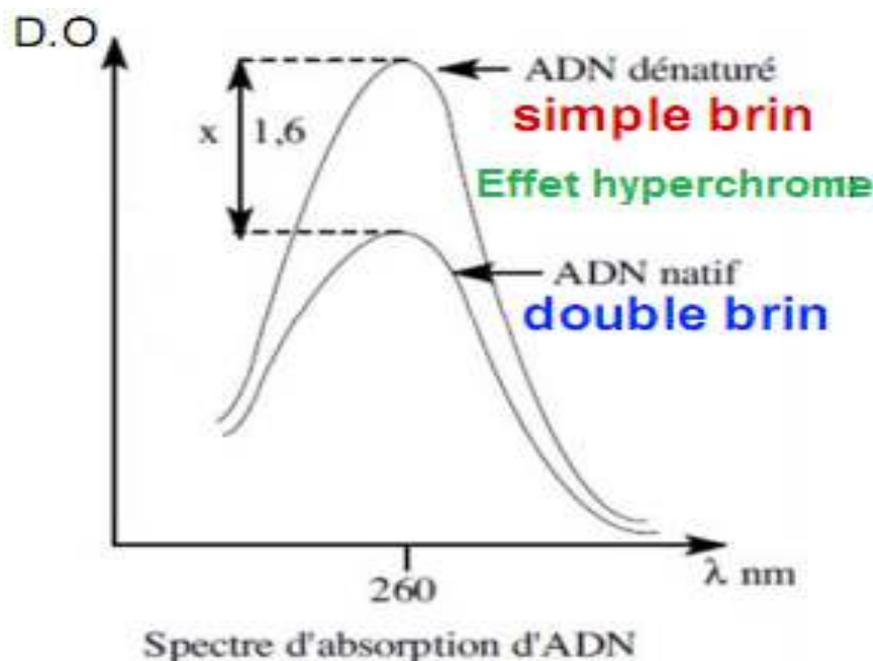
Puisqu'une séquence d'ADN simple brin doit trouver son brin complémentaire pour reformer une double hélice, les séquences communes se renaturent plus rapidement que les séquences rares. En effet, la vitesse à laquelle une séquence se réassociera est proportionnelle au nombre de copies de cette séquence dans l'échantillon d'ADN. Un échantillon avec une séquence hautement répétitive se renaturera rapidement, tandis que les séquences complexes se renatureront lentement.

Cependant, au lieu de simplement mesurer le pourcentage d'ADN double brin en fonction du temps, la quantité de renaturation est mesurée par rapport à une valeur C0t. La valeur COT est le produit de CO (la concentration initiale d'ADN), t (temps en secondes) et une constante qui dépend de la concentration de cations dans le tampon. L'ADN répétitif renaturera à de faibles valeurs de COT, tandis que des séquences d'ADN complexes et uniques se renatureront à des valeurs de COT

élevées. La renaturation rapide de l'ADN répétitif est due à la disponibilité de nombreuses séquences complémentaires.

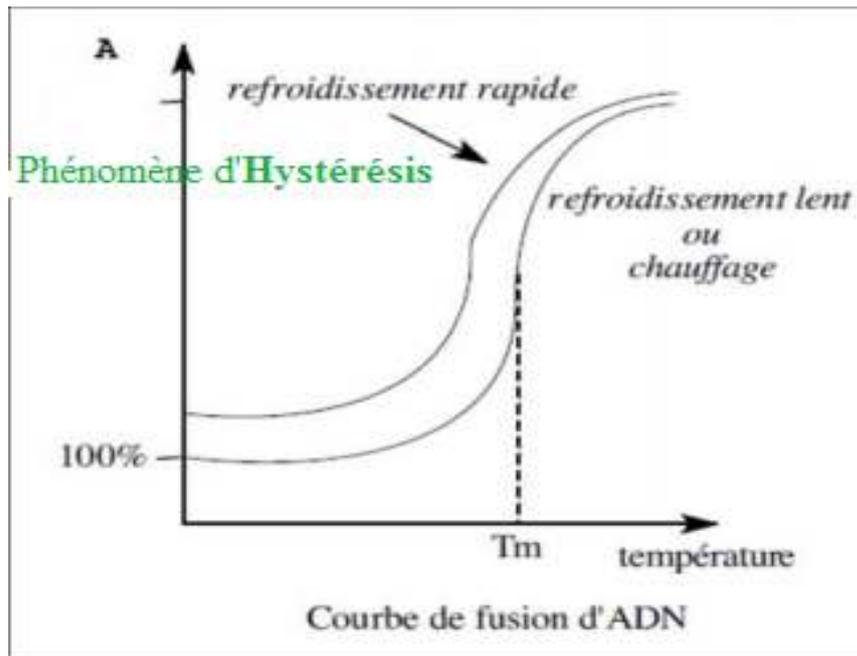
La filtration COT est une technique qui utilise les principes de la cinétique de renaturation de l'ADN pour séparer les séquences d'ADN répétitives qui dominent de nombreux génomes eucaryotes des séquences simples / à faible copie "riches en gènes". Cela permet au séquençage d'ADN de se concentrer sur les parties du génome qui sont plus informatifs et intéressants, ce qui accélérera la découverte de nouveaux gènes et rendra le processus plus efficace

2.3.5. L'effet hyperchrome



2.3.6. Phénomène d'hystérésis

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**



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

2.4. Des propriétés physicochimiques de l'ADN souvent utilisées en pratique

L'hydrolyse de l'ADN est la dégradation des liaisons covalentes fortes qui interviennent soit dans la formation des unités nucléotidiques (liaison N-glycosidique et/ou phospho-ester) ou dans l'enchaînement de ces unités (liaisons phosphodi-ester)

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

- L'enchaînement phosphodiester
- Les unités nucléotidiques : composants et liaisons osidiques

A- L'hydrolyse chimique :

A-1- Traitement Acide :

affecte l'ADN et l'ARN de la même façon

A-1-1- Traitement Acide sévère : dans les conditions drastiques (acide concentré et chauffage) auxquelles ne résistent pas les liaisons osidiques ni phosphodiester. Cette dégradation conduit à la libération d'un mélange de phosphates, oses et bases

A-1-2- Traitement Acide doux : PH=4

Seules les liaisons osidiques avec les purines seront hydrolysées

A-2- Traitement Alcalin :

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

les ADN résistent plus que les ARN

A-2-1- PH 13 et 37°C

Les ADN : Une dizaine de coupures de ponts phosphodiester par million de ponts

A-2-2- PH 11 et 37°C

Les ARN : sont totalement hydrolysés en leurs ribonucléotides en quelques minutes

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

B- L'hydrolyse enzymatique

Les enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison phosphodiester des acides nucléiques sont des phosphodiesterases spécifiques appelées : nucléases.

Les nucléases sont classées par :

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

Les bactéries possèdent des endonucléases de très haute spécificité, ce sont des désoxyribonucléases désignées sous le nom d'enzymes de restriction.