

LES ACIDES NUCLEIQUES

1-Introduction

Les acides nucléiques sont :

- le support de l'information génétique (ADN)
- les facteurs d'expression de l'information génétique (ARN).

Représentent 10 à 20 % du poids sec de la matière vivante.

Ce sont des poly-nucléotides à caractère acide.

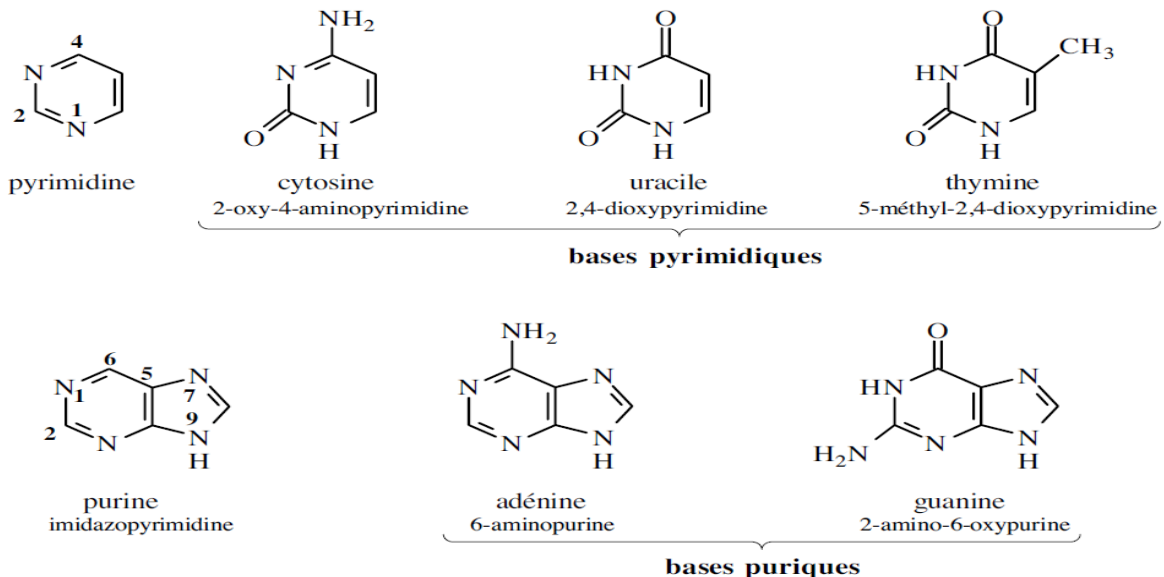
Souvent ils sont associés à des protéines pour donner des nucléoprotéines.

Les nucléotides = base azotée + pentose + acide phosphorique.

2-Bases azotées

- hétérocycles azotés à caractère basique
- constituants des nucléosides et nucléotides

2-1/ Bases majeures

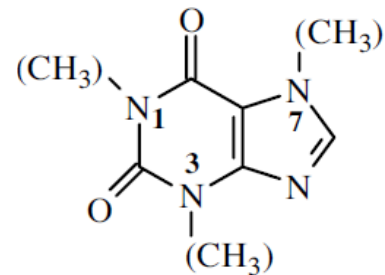


2-2/ Bases mineures : molécules d'intérêt biologique

Ces bases sont mineures par leurs quantités mais sont importantes physiologiquement :

- 5 méthyl-Cytosine → ADN humain et bactérien, cette méthylation protège les acides nucléiques.
- Des végétaux contiennent d'autres bases puriques en particulier des méthyl-xanthines qui possèdent des propriétés pharmacologiques. Elles ont des propriétés stimulantes en période d'activité intellectuelle. :

- la caféine (1.3.7. triméthyl xanthine) du café.
- la théophylline (1.3. diméthyl xanthine) du thé.
- la théobromine (3.7. diméthyl xanthine) du cacao.



• Dérivés puriques et pyrimidiques synthétiques = agents de chimiothérapie

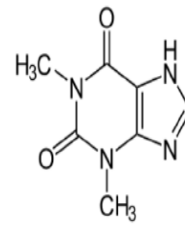
Les analogues des noyaux puriques et pyrimidiques réalisées par synthèse trouvent beaucoup d'application en médecine.

Beaucoup de ces dérivés sont utilisés comme médicament pour arrêter la synthèse des acides nucléiques :

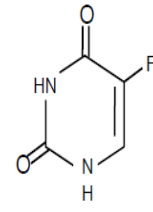
- soit en inhibant l'enzyme responsable de la synthèse des acides nucléiques
- soit en s'incorporant dans les acides nucléiques pour fausser le transfert d'information.

D'autres sont des antimétabolites.

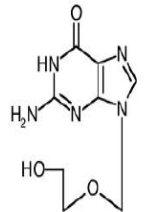
- **azathioprine** : utilisé dans la transplantation d'organe pour empêcher le rejet de greffe.
- **2-thiouracile** : anti-thyroïdien
- **allopurinol** : traitement de la goutte et l'hyper-uricémie
- **5-fluoro-uracile**, analogue de thymine : anticancérigène
- **6 thioguanine** et **6 mercaptopurine** : anticancérigène
- **6,azaguanine** et **8-azaguanine** : anticancérigène.
- **un antiviral classique (acyclovir)** est un dérivé de la guanine : (2-hydroxyéthoxyl) 9-méthylguanine



Théophylline (analogue de la guanosine) propriétés broncho-dilatatrices (asthme)



5 fluoro-uracile (analogue de la thymine) anticancéreux



Aciclovir analogue de la guanosine antiviral (herpes)

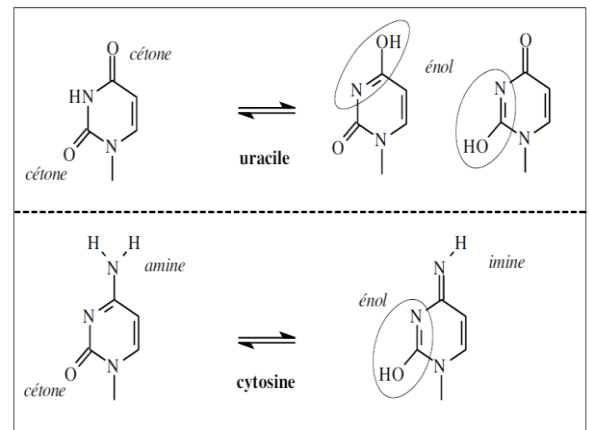
2-3/ Mélange tautomérique

En raison de leur caractère aromatique, les bases présentent 2 formes tautomériques :

- céto-énolique ou (oxo-hydroxy)
- amino-imine.

Les conditions physiologiques (pH neutre) favorisent fortement les formes amino et céto.

2-4/Propriétés physico-chimiques des bases puriques et bases pyrimidiques.



-Molécules fortement conjuguées c'est pourquoi elles absorbent dans l'UV à 260 nm et résistent à l'oxydation.

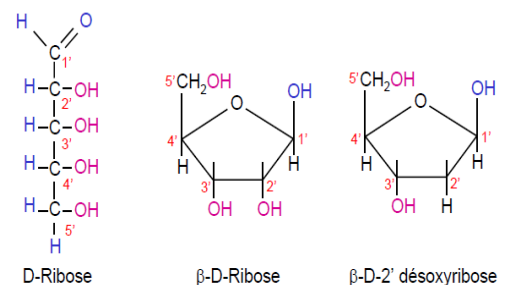
-Structure plane très stable et ne permet pas la rotation entre les liaisons simples.

-Sont hydrophobes et relativement insolubles à pH neutre.

-Ces bases ont un caractère basique du à la présence des amines (surtout extra-cycliques), cependant elles ne se trouvent pas à l'état protoné au pH physiologique.

3-Aldopentoses

L'ose est soit le D-ribose (ARN) ou le D-désoxyribose (ADN). Ils se trouvent sous forme furanique et de configuration β , ils sont numérotés en « prime » pour les distinguer des bases.

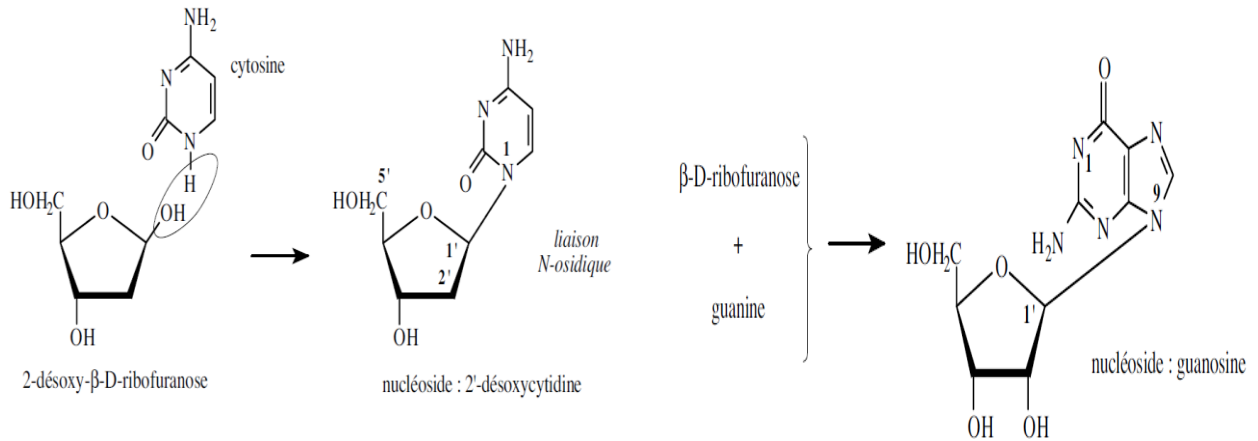


4-Structure des nucléosides et des nucléotides

***Nucléoside** = base + ose (ribose ou désoxyribose).

La liaison est **N osidique** = N₁ pyrimidine ou N₉ la purine avec C'₁ pentose

En raison de la configuration β du C'₁, la base est située au dessus du plan du cycle du pentose et dans un plan perpendiculaire au plan de ce dernier.

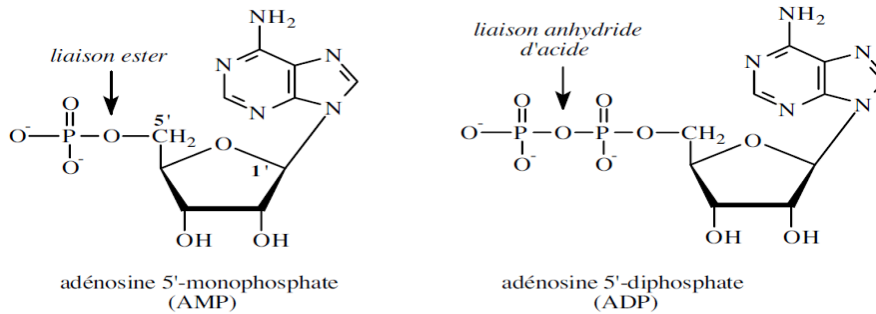


Une fois le nucléoside formé, il n'y a plus de rotation autour de la liaison β -N-glycosidique.

*Les nucléotides : sont des esters phosphoriques de nucléosides.

Nucléotide = base azotée + pentose + un ou plusieurs groupement phosphoryles.

Le site d'estérification est le C'5 du pentose.

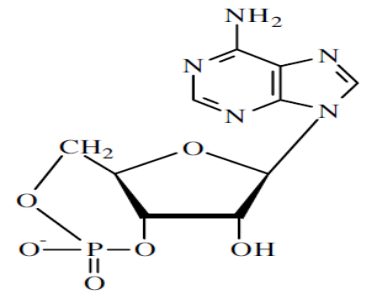


Les nucléotides tiennent leur caractère acide des groupements phosphoryles qui sont déprotonés à pH physiologique. Ainsi l'ATP porte 4 charges négatives.

Le désoxy-ribose (ADN) peut être phosphorylé sur le C'3 et C'5

Le ribose (ARN) peut être phosphorylé sur le C'3, C'2 et C'5

Une double phosphorylation C'3-C'5 ou C'2-C'3 permet d'obtenir des cycles : AMPc et GMPc.



Adénosine 3',5'- (Mono) phosphate cyclique : AMPc

***Nomenclature**

Bases		Nucléoside	nucléotide	Nucléoside	nucléotide
		Base ribose +		Base +désoxyribose	
Purines	Adénine	Adénosine	AMP, ADP, ATP	d-Adénosine	d-AMP, d-ADP, d-ATP
	Guanine	Guanosine	GMP, GDP, GTP	d-Guanosine	d-GMP, d-GDP, d-GTP
pyrimidines	Uracile	Uridine	UMP, UDP, UTP	d-Uridine	d-UMP, d-UDP, d-UTP
	thymine	Thymidine	TMP, TDP, TTP	d-Thymidine	d-TMP, d-TDP, d-TTP
	cytosine	Cytidine	CMP, CDP, CTP	d-Cytidine	d-CMP, d-CDP, d-CTP

Dérivés des nucléotides

-**ADP** et **ATP** sont des substrats et produits pour la phosphorylation oxydative.

L'ATP sert de transducteur biologique essentiel de l'énergie libre.

C'est le nucléotide libre intracellulaire le plus abondant chez les mammifères (1 mmol/l).

-**AMPc** est formé à partir de l'ATP grâce à l'adénylate cyclase. C'est un second messenger (médiateur chimique) qui participe à diverses fonctions de régulations comme par exemple l'activité des protéines kinases dépendantes de l'AMPc.

-**GDP** est nécessaire à la conversion du succinyl CoA en succinate.

-**GTP** est source d'énergie pour la synthèse des protéines. C'est aussi un régulateur allostérique en effet il est nécessaire à certaines hormones pour activer l'adénylate cyclase.

GMPc est un second messenger qui peut agir de manière antagoniste à l'AMPc. Il est obtenu du GTP par la guanylate cyclase.

-Les dérivés vitaminiques

Beaucoup de nucléotides sont des précurseur de :

- vitamines : ex. la riboflavine (vit b2), nicotinamide.
- coenzymes : FAD, NAD⁺, NADP⁺ et coenzyme A.

5-Acides désoxy-ribonucleiques (ADN)

5-1/ Structure d'un brin d'ADN

Les nucléotides fondamentaux (monomères) constituant l'ADN sont :

- Acide désoxyadénylique ou désoxyadénosine monophosphate (d-AMP)
- Acide désoxyguanilique ou désoxyguanosine monophosphate (d-GMP)
- Acide désoxycytidylrique ou désoxycytidine monophosphate (d-CMP)
- Acide désoxythymidylrique ou désoxythymidine monophosphate(dAMP)

Ces monomères sont liés entre eux dans le brin par des liaisons 3'5'phosphodiester.

L'information génétique réside dans l'ordre de ces nucléotides dans la séquence.

Chaque brin d'ADN possède une polarité 5' → 3'

Un brin peut s'écrire simplement : pTpApG ou pTAG

5-2/ Appariement des bases entre 2 brins

Les bases sont liées entre elles par des liaisons hydrogènes (liaisons fragiles), cependant leur abondance donne une cohésion à la structure de la molécule. Chaque base s'apparie avec sa base complémentaire (A = T) et (C ≡ G) ainsi : **A=T** et **C=G**

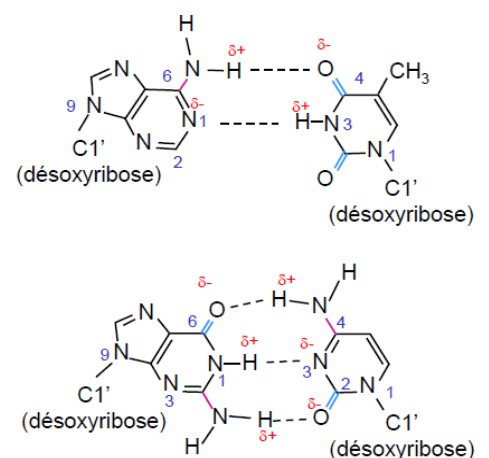
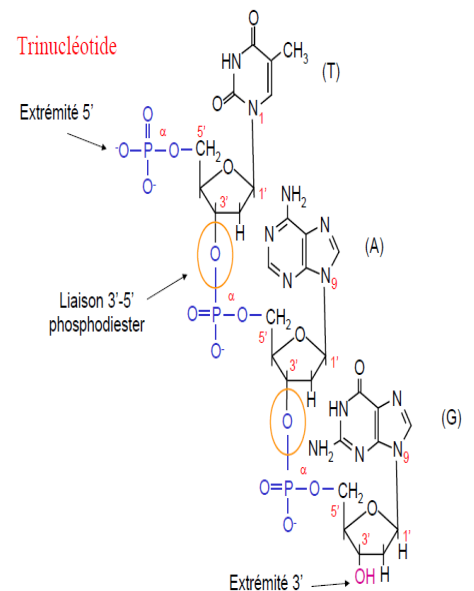
-Coefficient de Chargaff : A+T / C+G

Diffère d'une espèce à l'autre :

Homme : 1.5.

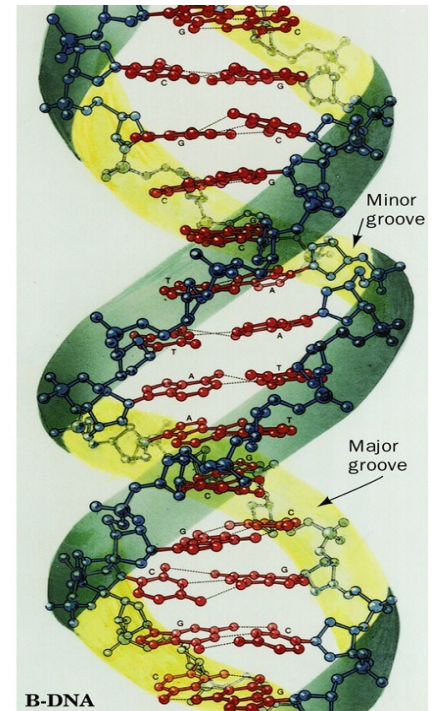
Animaux et végétaux >1 : bœuf 1.3, rat 1.2, blé 1.2 etc.

Bactéries (0.35 – 2.7): *E.coli* 1.04, *Clostridium perfringens* 2.6, *Saccharomyces cerevisiae* 1.7.



5-3/ Structure de la double hélice

- **ADN-β** → principale forme d'ADN qu'on rencontre in vivo (la plus fréquente)
- 2 brins allongés côte à côte et enroulés l'un autour de l'autre sous forme **d'hélice droite** de **2 nm** de diamètre
- les brins sont **antiparallèles** : les chaînes ne peuvent s'apparier que si elles sont orientées dans des directions opposées.
- Le **squelette** est formé par les **2'désoxyribose** reliés par des liaisons phospho diesters.
- Les bases sont tournées vers l'intérieur qui est donc apolaire.
- La surface constituée d'ose et phosphate est polaire (charge négative) → **poly-anion**.
- Les bases sont parallèles entre eux et perpendiculaires à l'axe de l'hélice.
- Chaque base subit une rotation de **36°**. Un tour de **360°** est formé donc de 10 bases.
- chaque base mesure **3,4 Å** → le pas d'un tour = **34 Å**
- L'ADN présente un
 - petit sillon (6 Å)
 - grand sillon (12 Å). Les protéines (de régulation) se fixent sur les bases accessibles du grand sillon
- Sur le plan fonctionnel les deux brins ne sont pas équivalents :
 - le brin codant (brin sens ou brin matrice) est celui qui sera lu lors de la transcription. Il est complémentaire de l'ARN
 - le brin non codant (brin anti sens) a la même séquence que l'ARN seulement la thymine est remplacée par l'uracile. Par convention le sens de l'ADN est donné selon le sens du brin non codant. 5' → 3'.



5-4/ propriétés physico – chimiques

- a- Poids moléculaire : macromolécules → PM (plusieurs millions de daltons)
- b- Caractère acide : poly anions → présence d'acides phosphoriques tournés vers l'extérieur
- c- Densité élevée → due à la présence de **C ≡ G** qui rapprochent et compactent les 2 brins. L'ADN alors est dense. Donc il existe une relation entre la densité et le % de G et C.

$$\text{densité} = 1,660 + 0,001(G+C)\%$$

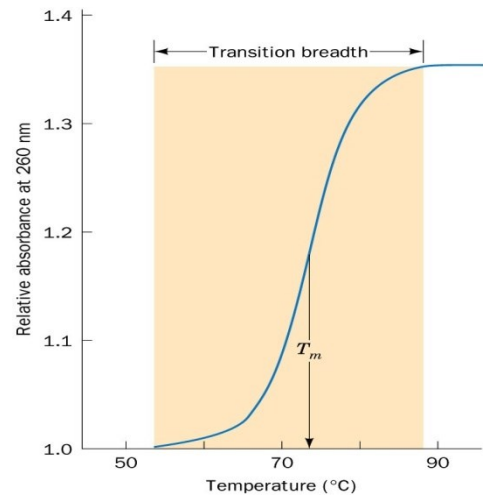
- d- Solubilité : l'ADN s/f de sels de Na dilués → est soluble mais présente une viscosité élevée.
- e- Il est insoluble dans les solvants organiques.
- f- spectre d'absorption : Absorbe dans l'UV à 260 nm → présence de doubles liaisons conjuguées des noyaux aromatiques.
- g- Dénaturation : = perte de la forme native de l'ADN → séparation des deux brins par suite à l'incubation dans une solution saline ou un chauffage qui rompent les liaisons Hydrogène.
- h- Effet hyper-chrome : Lorsque l'ADN est chauffé l'absorption augmente à 260 nm alors que la viscosité diminue.

- La dénaturation est réversible, elle est obtenue par un refroidissement progressif (Renaturation ou hybridation). Le refroidissement brusque dénature irréversiblement l'ADN.

- T_m (température moyenne ou $T_f = t^\circ$ de fusion) : température qui permet l'ouverture de la moitié de la molécule d'ADN.

$$T_m = 69,3 + 0,41(G+C)\%$$

- La dénaturation fait augmenter l'absorption à cause de l'apparition des bases qui étaient masquées dans l'ADN natif.



6- Acides ribonucléiques (ARN)

* ARN messenger

- Masse moléculaire d'environ $2 \cdot 10^6$ daltons

- Sont de taille hétérogène (différentes tailles)

- L'ARNm est synthétisé dans le noyau comme pré-ARNm puis il sort dans le cytosol où il subit une maturation (épissage).

- L'extrémité 5' terminale portera alors une **coiffe (cap)** → 7 méthyl guanosine triphosphate

- La coiffe est impliquée dans :

- la reconnaissance de l'ARNm par l'ARNr
- protection de l'ARNm contre l'attaque par des 5' exonucléase.
- C'est aussi le signal du début de la traduction.

- L'extrémité 3' présente une « **Queue poly A** » qui est une longue chaîne de résidus d'adénine (100-250 Adénine). Cette queue stabilise l'ARNm en empêchant l'attaque par des 3' exonucléases.

* ARN de transfert

- Comportent environ 70 à 95 nucléotides et représentent 20% de l'ARN total

- Ce sont des ARN solubles PM est environ 23.000 à 30.000 daltons

- Comportent plusieurs bases modifiées

- Sont des adaptateurs de la traduction (l'ARNm → en acides aminés)

- Transfère l'AA sur le ribosome.

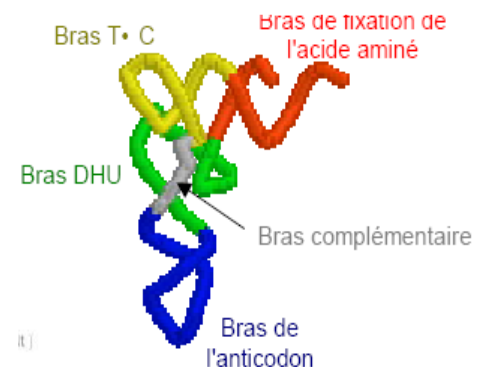
- Il existe au moins 20 espèces de ARNt dans chaque cellule correspondant chacune à 1 AA.

- Tous les ARNt présentent un repliement en structure de trèfle (forme L tordu)

- Tous les ARNt contiennent 5 bras.

Remarque : les ARNt sont les seuls ARN qui peuvent contenir la thymine.

Les bras de l'ARNt se replient pour former une forme en trèfle ou en un majuscule L. c'est la structure tertiaire des ARNt. Cette structure est maintenue par des liaisons hydrogènes.



* ARN ribosomal

- PM environ $4 \cdot 10^6$ daltons.

- Les ARNr sont riches en C et G et pauvres en base méthylées ou pseudo uridine.

-Représentent la machinerie de la synthèse protéique (usines moléculaires)
 -Auto-assemblage de nombreuses protéines synthétisées dans le cytoplasme et d'un nombre d'ARN synthétisés dans le noyau.

Les ribosomes sont constitués de 2 sous unités : La petite s/u sert à la fixation de l'ARNm, la grande s/u sert à la fixation de l'ARNt.

A l'état non fonctionnel (pas de synthèse protéique) les sous unités sont dissociées. Lors de la synthèse protéique elles s'assemblent en polysomes.

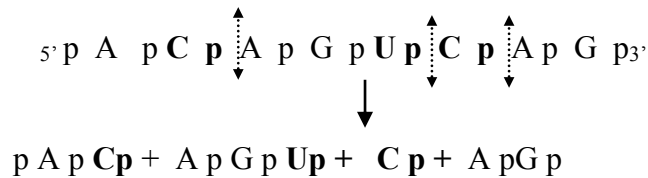
Ce sont les protéines ribosomales qui en se liant aux ARNr permettent cet assemblage.

7- Hydrolyse enzymatique :

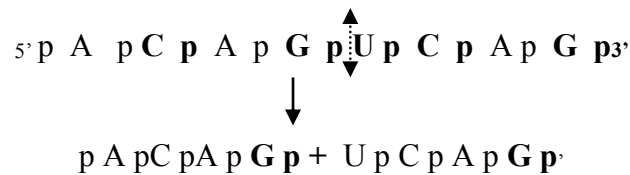
*RNAses et DNAses :

Les ribonucléases sont des enzymes qui hydrolysent spécifiquement les RNA donnant naissance à des oligo nucléotides : ces enzymes coupent la **liaison phosphodiester**.

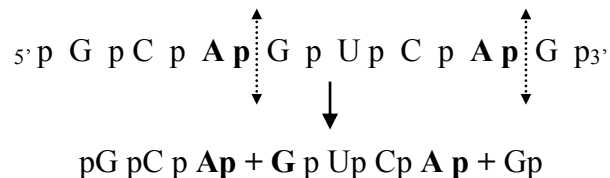
-Ribonucléase pancréatique (type b): coupe après **3'P de C et U** → oligo nucléotides 3'P



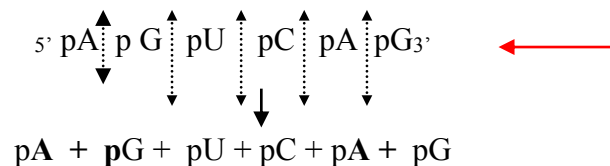
-Ribonucléase T1 (type b) : coupe après **3'P de G** → oligo nucléotides se terminant G 3'P



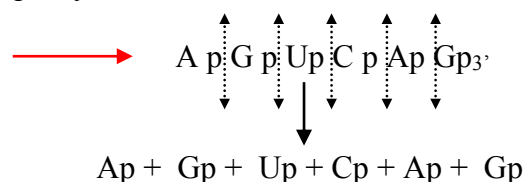
Ribonucléase T2 (type b): coupe après **3'P de A** → oligonucléotides se terminant par A 3'P



Phosphodiesterase de venin de serpent (type a): Exonucléase qui agit sur ADN et ARN attaque à l'extrémité 3' non phosphorylée → libérant **nucléosides 5'P**



Phosphodiesterase de rate de boeuf : Exo nucléase qui agit sur ADN et ARN attaque à l'extrémité 5' non phosphorylée → libérant **nucléosides 3'P**



*** Actions des désoxyribonucléases (DNAses)**

La DNase pancréatique 1 : qui engendre des oligo désoxyribonucléotides 5' monophosphate.

La DNAase 2 : qui fournit des oligo désoxyribonucléotides 3'-mono-phosphate.

5' mono-phospho-estérase → enlève le phosphate à l'extrémité 5'

3' mono-phospho-estérase → enlève le phosphate à l'extrémité 3'*

***Hydrolyse chimique**

- **hydrolyse acide douce (pH ≈3)**→ coupe les liaisons β-N glycosidiques entre ose et base.
- **acide à chaud** → coupe les liaisons esters et glycosidiques libérant base + pentose + acide phosphorique.

***Le séquençage de l'ADN**

-Consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné.

Actuellement, la plupart du séquençage d'ADN est réalisée par la méthode de **Sanger**.

-Dans cette méthode, la polymérisation de l'ADN est initiée par un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer.

-L'élongation de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase I, les quatre désoxynucléosides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'en faible concentration les quatre 2'-3'didésoxynucléosides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par des fluorochromes différents.

-Ces didésoxynucléosides, une fois incorporés à la nouvelle chaîne synthétisée, empêchent la poursuite de l'élongation, d'où terminaison de la synthèse de l'ADN.

-Il en résulte de nouveaux fragments d'ADN de taille variable, qui sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, ce gel permet de séparer deux intermédiaires consécutifs qui ont une différence de taille d'un seul nucléotide.

-Afin de lire les quatre nucléotides de l'ADN, on fait migrer séparément les fragments issus des quatre mélanges réactionnels (à ddATP, à ddCTP, à ddGTP et à ddTTP). Le sens de la lecture des nucléotides est l'inverse du sens de leurs migrations.

