

Biochimie Structurale



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.

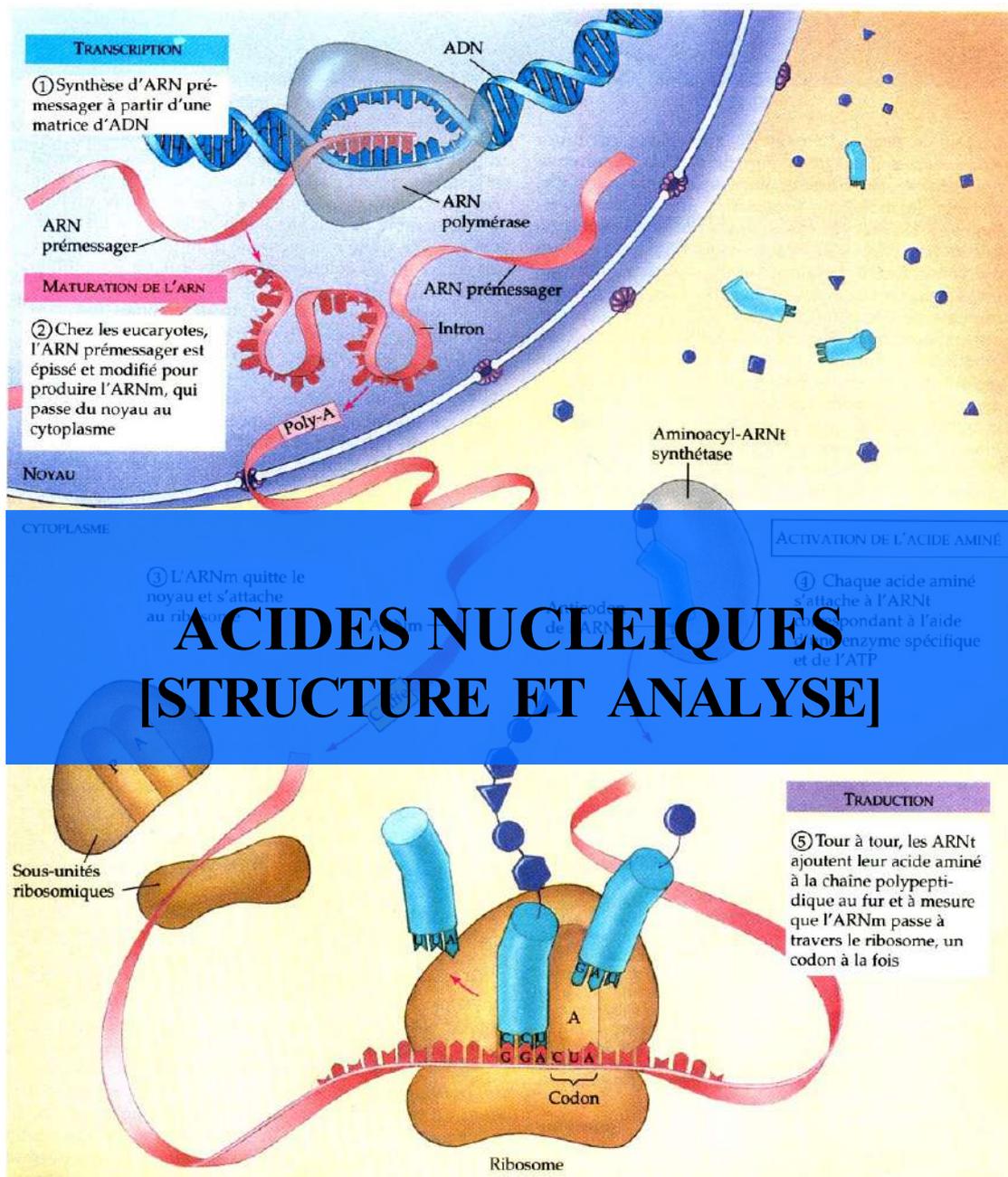


Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

UNIVERSITE CADI AYYAD, FACULTE DES SCIENCES SEMLALIA
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



PROFESSEUR A. A. BENSLIMANE

STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES

SOMMAIRE

SITUATION GENERALE	3
OBJECTIFS GENERAUX	4
CHAPITRE 1	5
LES NUCLEOTIDES	
A- ELEMENTS CONSTITUANTS LE NUCLEOTIDE	
1- L'ACIDE PHOSPHORIQUE	
2- L'OSE	
3- LA BASE AZOTEE	
a- Bases puriques (Pu)	
b- Bases pyrimidiques (Py)	
c- Formes tautomères	
B- ASSOCIATION DES TROIS ELEMENTS CONSTITUANT LE NUCLEOTIDE	
1- LIAISON OSE-BASE \Rightarrow NUCLEOSIDE	
2- LIAISON ACIDE PHOSPHORIQUE-OSE	
a- Nomenclature des différents nucléotides	
b- Cas particuliers : dérivés nucléotidiques	
CHAPITRE 2	16
ASSOCIATION DES NUCLEOTIDES DANS UN ACIDE NUCLEIQUE	
A- LIAISON RELIANT LES NUCLEOTIDES	
B- STRUCTURE PRIMAIRE DES ACIDES NUCLEIQUES	
C- CONVENTIONS D'ECRITURE D'UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE	
CHAPITRE 3	19
STRUCTURES ET CARACTERISTIQUES DU DNA	
A- LE DNA SIMPLE BRIN (STRUCTURE PRIMAIRE)	
B- LE DNA DOUBLE BRIN (STRUCTURE SECONDAIRE)	
C- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU DNA	
1- COMPOSITION	
2- FORME ET TAILLE DU DNA	

- 3- SPECTRE D'ABSORPTION
- 4- SOLUBILITE, PRECIPITATION ET EFFET DU pH
- 5- DENSITE DE FLOTTABILITE
- 6- DENATURATION, RENATURATION, HYBRIDATION

CHAPITRE 4 31

PROPRIETES TOPOLOGIQUES DU DNA

- A- SURENROULEMENT DU DNA**
- B- NIVEAUX SUPERIEURS DE CONDENSATION DES MACROMOLECULES DE DNA**
 - 1- STRUCTURE DU CHROMOSOME PROCARYOTE
 - 2- STRUCTURE DU GENOME CHEZ LES EUCARYOTES
 - I. Nucléosome
 - II. Fibre de chromatine et niveaux supérieurs de condensation

CHAPITRE 5 38

ACIDES RIBONUCLEIQUES

- A- LES DIFFERENTS GROUPES DE RNA**
- B- CARACTERISTIQUES GENERALES DU RNA**
 - 1- L'OSE : RIBOSE
 - 2- BASES AZOTEES
 - 1- APPARIEMENT DES BASES
 - 2- SPECTRE D'ABSORPTION, QUANTIFICATION
 - 3- EFFET DU pH ALCALIN
 - 4- DENATURATION THERMIQUE
 - 5- DIVERSITE ET SYNTHESE DES RNA
 - I. RNA POLYMERASE I
 - II. RNA POLYMERASE II
 - III. RNA POLYMERASE III

CHAPITRE 6 43

INTRODUCTION AUX TECHNIQUES D'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES

- A- ENDONUCLEASE DE RESTRICTION**
- B- SYNTHESE D'UNE SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE**
 - 1- APPLICATION N°1 : CONFECTION D'UNE SONDE
 - 2- APPLICATION N°2 : CONFECTION D'UN cDNA
- C- ELECTROPHORESE**
- D- TRANSFERT SUR MEMBRANE – HYBRIDATION**
- E- PCR ET RT-PCR**
- F- SEQUENCAGE « METHODE DE SANGER »**

STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES

SITUATION GENERALE

☑ **DEFINITION** : les **acides nucléiques** sont des **macromolécules** formées par la répétition de sous unités appelées **nucléotides**. On distingue deux types :

i - L'**acide désoxyribonucléique** (ou **DNA**).

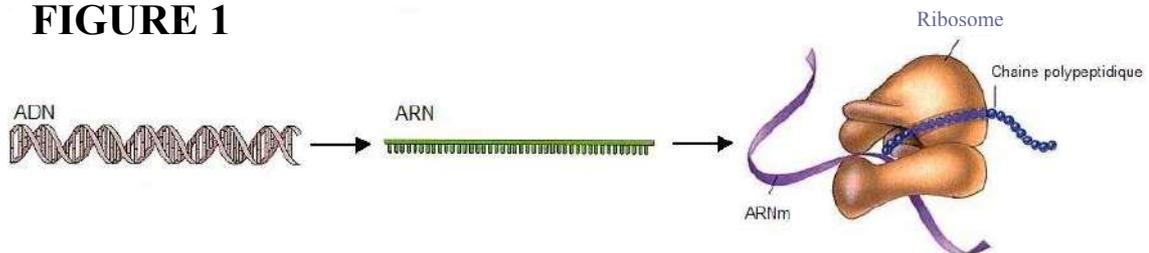
ii) L'**acide ribonucléique** (ou **RNA**).

☑ Les acides nucléiques permettent aux organismes vivants de reproduire leur contenu complexe d'une génération à l'autre. Unique en son genre, le DNA (RNA dans le cas de certains virus) fournit les directives pour sa propre **réplication**. Cette reproduction moléculaire est à la base de la continuité de la vie.

☑ Les acides nucléiques constituent le support de l'**information génétique** que les organismes se transmettent au fil des générations. Très longue, la molécule de DNA porte des milliers de **gènes**. Chaque gène occupe une position spécifique le long de la macromolécule.

☑ L'expression de cette information génétique dans les cellules passe par la **synthèse des protéines**. Cette synthèse fait intervenir l'autre sorte d'acides nucléiques : les RNA qui servent d'intermédiaires dans la circulation de l'information génétique du DNA aux protéines (**transcription et traduction**).

FIGURE 1



☑ En plus des nucléotides majeurs qui composent les macromolécules de DNA et de RNA, existent des **dérivés nucléotidiques** qui jouent des rôles essentiels dans le métabolisme cellulaire (stockage de l'énergie : **ATP** et **GTP**. Intervention dans le métabolisme cellulaire comme **co-enzyme** (**NADP**, **FAD**, **co-enzyme A**) etc ...

STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES

OBJECTIFS GENERAUX

- ☑ Connaître la structure des acides nucléiques : savoir reconnaître les molécules simples dont ils sont constitués, les classer d'après leurs propriétés ou leur fonctions.
- ☑ L'étudiant doit savoir reconnaître n'importe quelle **base azotée**, **nucléoside**, **nucléotide** ou **nucléoside polyphosphate**.
- ☑ Il doit savoir identifier les **liaisons riches en énergie** et distinguer les **groupements phosphate (α , β ou γ)** présents dans ces molécules.
- ☑ Il doit savoir interpréter et manipuler les différentes représentations de la structure primaire du DNA et du RNA, préciser la nature des liaisons impliquées dans l'enchaînement des nucléotides, distinguer une **extrémité 5'** d'une **extrémité 3'** et manipuler les unités de taille (**dalton**, **kb**, **pb**, **kpb**, **Mpb** etc ...).
- ☑ L'étudiant doit également reconnaître les liaisons impliquées dans la **complémentarité des bases** ainsi que les éléments structuraux essentiels d'une double hélice de DNA.
- ☑ Comprendre le mécanisme de **surenroulement** du DNA et rendre compte de l'importance biologique des **topoisomérases**.
- ☑ Reconnaître les éléments structuraux essentiels de la **chromatine** et des différentes espèces de RNA
- ☑ Comprendre et savoir exploiter les **propriétés physico-chimiques** des acides nucléiques : absorption de la lumière UV, effet du pH et de la température, densité de flottabilité.
- ☑ Enumérer les facteurs qui permettent l'**hybridation** de deux brins d'acides nucléiques.
- ☑ Décrire l'activité de quelques enzymes qui permettent l'étude des acides nucléiques et être capable de montrer l'effet de ces enzymes sur un exemple précis et détaillé (une séquence d'acide nucléique par exemple). Cet objectif comprend au moins les activités des **endonucléases de restriction**, les **polymérases** et les **ligases**.
- ☑ Etre capable d'interpréter des données expérimentales obtenues par les méthodes couplant **électrophorèse** et **hybridation sur filtre**.
- ☑ Expliquer le mécanisme de l'**amplification du DNA** par **PCR** ou **RT-PCR**.
- ☑ Expliquer le mécanisme d'un **séquençage** d'acide nucléique

STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES
CHAPITRE 1
LES NUCLEOTIDES

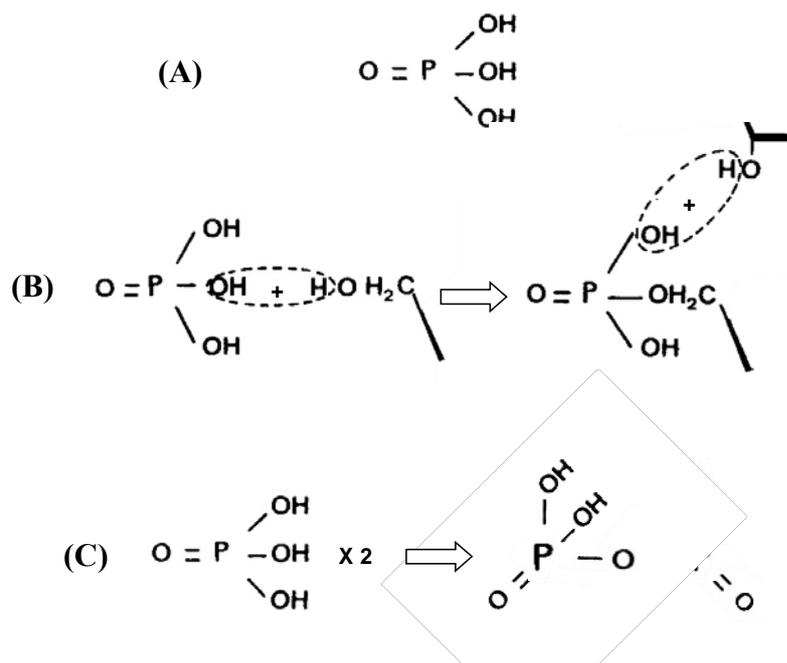
A-ELEMENTS CONSTITUANT LE NUCLEOTIDE

- ☑ Les acides nucléiques sont des polymères linéaires de nucléotides.
- ☑ Les nucléotides sont composés de trois éléments :
 - 1) **acide phosphorique**,
 - 2) **oses**,
 - 3) **bases azotées**.

1- L'ACIDE PHOSPHORIQUE

- ☑ **Figure 2 : (A)** L'acide phosphorique possède **trois fonctions acides**
- ☑ **Figure 2 : (B)** Deux des fonctions acides de l'acide phosphorique peuvent être **estérifiées** dans les acides nucléiques.
- ☑ **Figure 2 : (C)** De plus, deux acides phosphoriques peuvent se combiner par une **liaison anhydre d'acide** en donnant un **acide pyrophosphorique**.

FIGURE 2



2- L'OSE

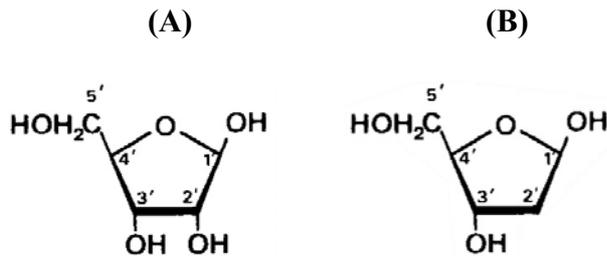
☑ **Figure 3 : (Formes cycliques et numérotation en prime).**

Dans les acides nucléiques on peut rencontrer deux types d'ose :

(A) : le **ribose** (ou **β -D-ribofuranose**) dans les RNA.

(B) : le **désoxyribose** (ou **β -D-2'-désoxyribofuranose**) dans les DNA.

FIGURE 3



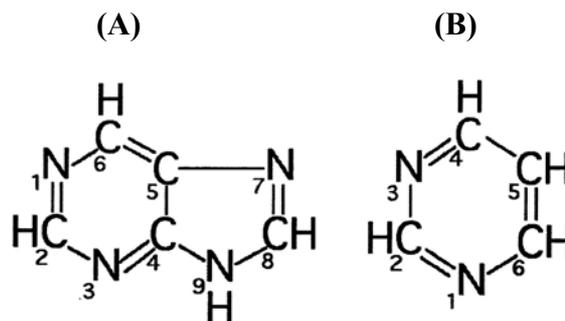
3- LA BASE AZOTEE

☑ **Figure 4 :** Les bases azotées dérivent toutes de deux bases **hétérocycliques** (c'est-à-dire contenant du carbone et de l'azote) :

(A) la **purine** → (bases puriques).

(B) la **pyrimidine** → (bases pyrimidiques).

FIGURE 4



☑ Lorsqu'on représente ce genre de cycles, on peut ne pas écrire les atomes de carbones. On précise simplement les atomes d'azote. Contrairement au ribose et au désoxyribose, la numérotation se fait ici sans prime.

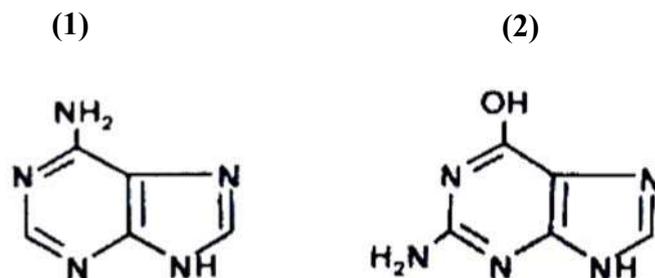
☑ Les bases azotées sont des bases faibles très peu solubles dans l'eau, elles contiennent des doubles liaisons conjuguées ; ce qui leur confère un caractère aromatique et donc une forte absorption de la lumière UV.

a) Bases puriques (Pu)

☑ ► **Figure 5** : Deux types de bases puriques majoritaires :

- 1- A = adénine = 6-amino-purine.
- 2- G = guanine = 2-amino-6-oxy-purine.

FIGURE 5

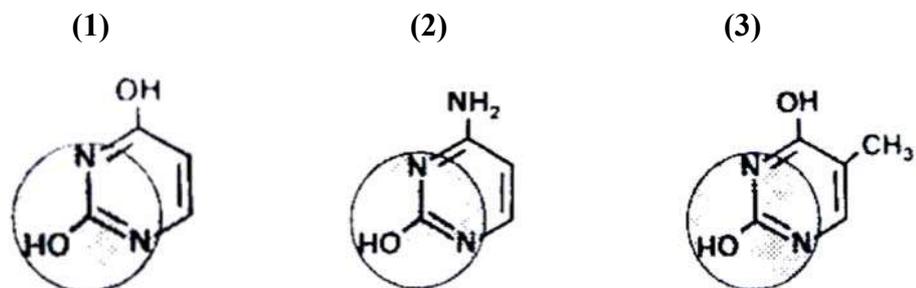


b) Bases pyrimidiques (Py)

☑ **Figure 6** : On rencontre dans les acides nucléiques trois types de bases pyrimidiques majoritaires :

- 1- U = uracile = 2,4-dioxy-pyrimidine.
- 2- C = cytosine = 2-oxy-4-aminopyrimidine.
- 3- T = Thymine = 5-méthyl-2,4-dioxy-pyrimidine.

FIGURE 6

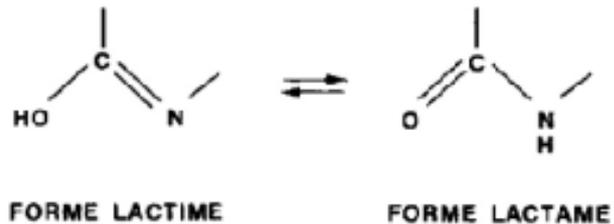


c) Formes tautomères

- ☑ La **structure conjuguée** des bases azotées et la présence de **substituants hydroxylés** et **aminés** font qu'il existe un équilibre entre des formes tautomères de la même base (par échange d'un proton).

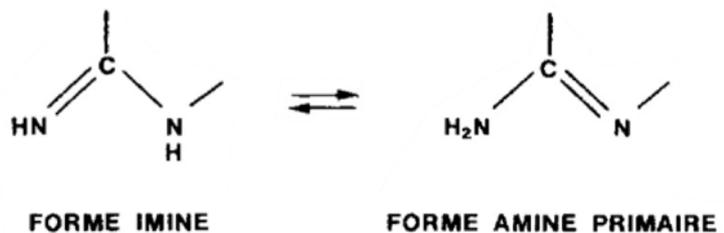
- ☑ **Figure 7** : Pour les dérivés hydroxylés : équilibre entre la **forme lactime** (ou énol) et la forme **lactame** (ou céto).

FIGURE 7



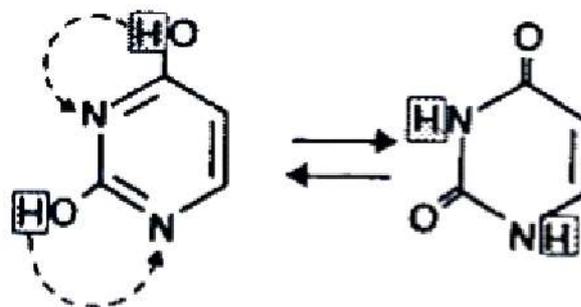
- ☑ **Figure 8** : Pour les dérivés aminés : équilibre entre la **forme imine** et la **forme amine primaire**.

FIGURE 8



- ☑ Le déplacement de l'équilibre d'une forme vers l'autre dépend du pH du milieu.
- ☑ Au pH physiologique, ce sont les formes lactame et amine primaire qui prédominent.
- ☑ **Figure 9** : formes tautomères de l'uracile en exemple.

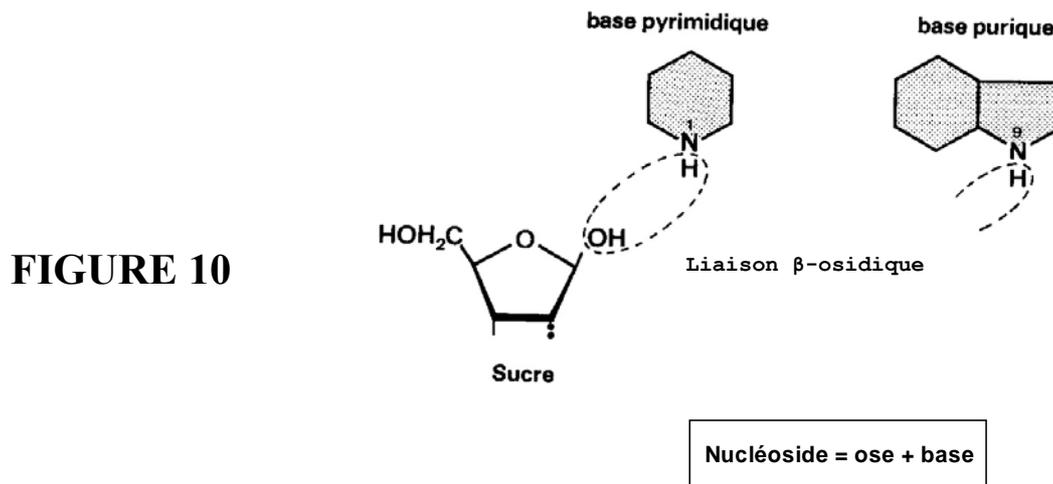
FIGURE 9



B- ASSOCIATION DES TROIS ELEMENTS CONSTITUANT LE NUCLEOTIDE

1- LIAISON OSE-BASE \Rightarrow NUCLEOSIDE

- Figure 10** : La liaison entre un ose et une base azotée forme un **nucléoside**. C'est donc un hétéroside azoté.



- La liaison se fait au moyen d'une **liaison β -osidique** entre le **carbone 1'** du sucre et l'**azote en position 1** pour les bases pyrimidiques ou l'**azote en position 9** pour les bases puriques.

- Tableau I** : Noms des différents nucléosides.

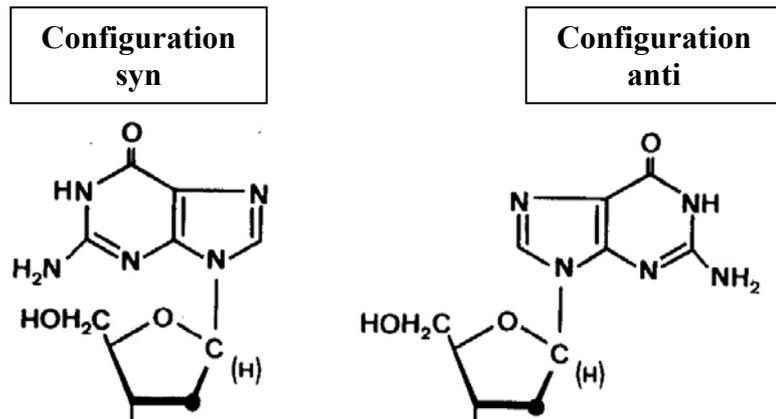
<i>Base</i>	<i>Ribonucléoside</i>	<i>Déoxyribonucléoside</i>
Adénine	Adénosine	Déoxyadénosine
Guanine	Guanosine	Déoxyguanosine
Uracile	Uridine	Déoxyuridine
Cytosine	Cytidine	Déoxycytidine
Thymine	Thymine ribonucléoside ou ribothymidine (rare)	Déoxythymidine ⁽¹⁾

⁽¹⁾ « Déoxythymidine » est l'appellation correcte, mais on trouve encore souvent le terme de « thymidine » qui date de l'époque où l'on pensait que la thymine n'existait que dans les DNA (et donc forcément liée au désoxyribose), de sorte que le préfixe « désoxy » était sous-entendu.

☑ Deux configurations sont possibles : « **syn** » ou bien « **anti** » : figures 11 et 12.

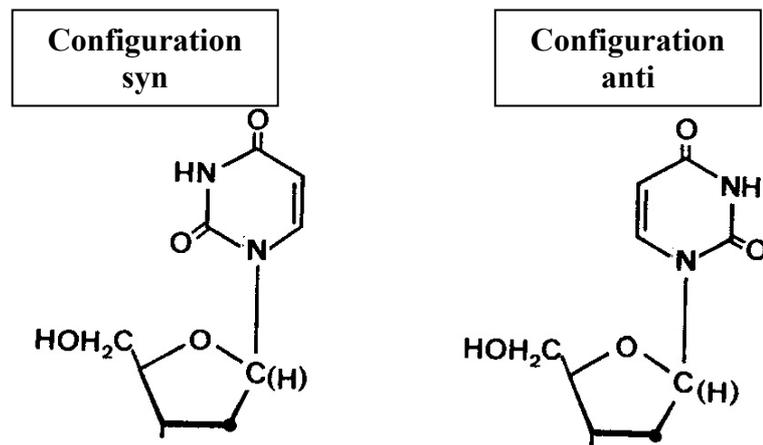
☑ **Figure 11** : Exemple avec une base purique (guanine)

FIGURE 11



☑ **Fig. 12** : Exemple avec une base pyrimidique (uracile)

FIGURE 12



2- LIAISON ACIDE PHOSPHORIQUE-OSE

☑ **Figure 13** : Un **nucléotide** est l'association entre un nucléoside et un acide phosphorique au moyen d'une liaison ester entre un groupement hydroxyle libre du pentose (**OH du carbone 5'**) et une fonction acide de l'acide phosphorique.

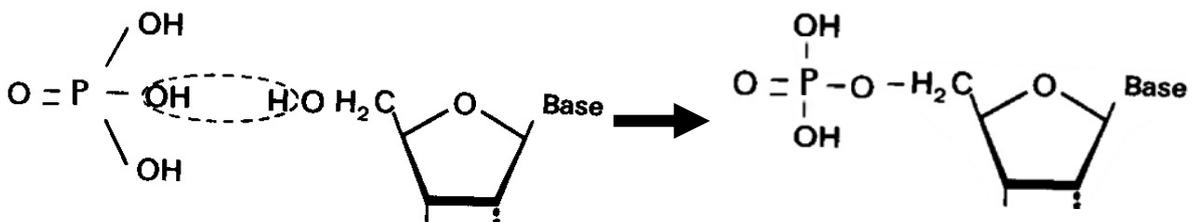


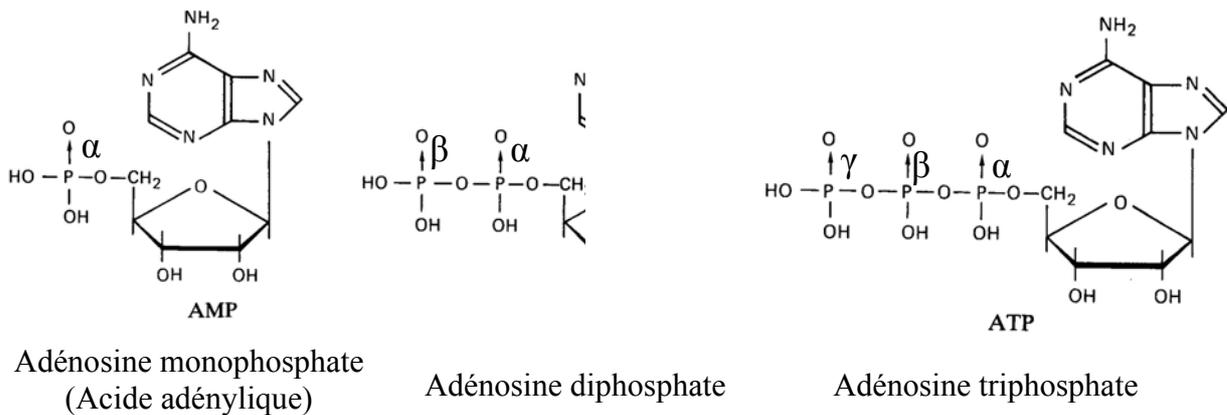
FIGURE 13

- ☑ Un nucléotide est donc formé d'une base azotée, liée par une liaison osidique avec un sucre, lui-même lié par une liaison ester avec un phosphate.

nucléotide = nucléoside monophosphate = nucléoside + H ₃ PO ₄ nucléotide = nucléoside monophosphate = ose + base + H ₃ PO ₄
--

- ☑ **Figure13-bis** : Dans le métabolisme en général, celui des acides nucléiques en particulier, interviennent des substrats riches en énergie, les nucléosides di- ou triphosphates. Un nucléoside poly-phosphate est un nucléotide dont le phosphate est lui-même lié à un ou deux autres phosphates par des liaisons anhydrides d'acide. En exemple : base = adénine (AMP, ADP et ATP). La position des trois groupements phosphoryl est indiquée par les lettres α , β et γ .

FIGURE 13-bis



a) Nomenclature des différents nucléotides

- ☑ **Tableau II** : Nucléotides à base pyrimidique.

B = Base S+B = nucléoside : (désoxy)radical + « idine » S+B+P = nucléotide : acide (désoxy)radical + « idylique »

Radical = uracile : ur cytosine : cyt thymine : thym
--

- ☑ **Tableau III** : Nucléotides à base purique.

B = Base S+B = nucléoside : (désoxy)radical + « osine » S+B+P = nucléotide : acide (désoxy)radical + « ylique »

Radical = adénine : adén guanine : guan

- Tableau IV** : Nomenclature des unités nucléotidiques.

Bases	Nucléosides	Nucléosides 5'-mono, di, triphosphates	Unités nucléotidiques des acides nucléiques
A = Adénine	(désoxy-) adénosine	AMP, ADP, ATP dAMP, dADP, dATP	(d-) adénylate
G = Guanine	(désoxy-) guanosine	GMP, GDP, GTP dGMP, dGDP, dGTP	(d-) guanylate
C = Cytosine	(désoxy-) cytidine	CMP, CDP, CTP dCMP, dCDP, dCTP	(d-) cytidylate
U = Uracile	uridine	UMP, UDP, UTP	uridyate
T = Thymine	désoxy- thymidine	dTMP, dTDP, dTTP	d-thymidylate

- Les bases azotées sont conventionnellement désignées par une initiale et par une couleur : **verte** pour l'adénine (A), **jaune** pour la guanine (G), **bleue** pour la cytosine (C) et **rouge** pour la thymine.
- Chaque nucléoside peut être lié à un, deux ou trois phosphates. On les désigne par des sigles conventionnels (M, D ou T).
- On désigne par nucléotide les nucléosides monophosphates. 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
- En fait désoxythymidine est l'appellation correcte mais on trouve souvent le terme de thymidine de l'époque où l'on pensait que la thymine n'existait que dans les DNA.

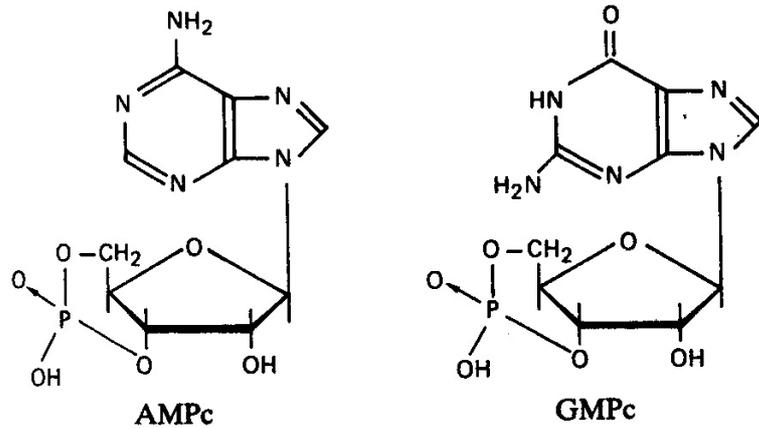
b) Cas particuliers : dérivés nucléotidiques

- En plus des nucléotides majeurs des DNA et RNA, existent des dérivés nucléotidiques qui jouent des rôles essentiels dans le métabolisme cellulaire.
- (1) Stockage de l'énergie : ATP et GTP** : Les fonctions acides phosphorique distaux sont fortement ionisés au pH physiologique. Les liaisons anhydrides unissant les acides phosphoriques sont des liaisons riches en énergie ($\Delta G \geq 31$ kJ/mol).

- ☑ Les dérivés nucléotidiques sont souvent cités en biologie dans différentes disciplines. Quelques exemples sont succinctement décrits ci-dessous.

☑ (2) Rôle de messager hormonal intracellulaire : AMPc et GMPc

FIGURE 14



Adénosine-3', 5'-monophosphate

Guanosine-3', 5'-monophosphate

L'adénylate cyclase des cellules eucaryotes, localisée dans la membrane cytoplasmique, transforme l'ATP en AMPc. Cet enzyme est stimulé par certaines hormones apportées par le sang. L'AMPc est également appelé second messager parce qu'il transmet et amplifie à l'intérieur des cellules les signaux chimiques provenant des hormones circulantes considérées comme premiers messagers.

☑ (3) Rôle coenzymatique :
(rappel : holoenzyme = apoenzyme + coenzyme)

- ☑ **Coenzymes non vitaminiques** : certains nucléosides triphosphates simples (ATP, UTP et CTP) ont des propriétés activatrices à l'égard de molécules simples avec lesquelles elles se combinent.

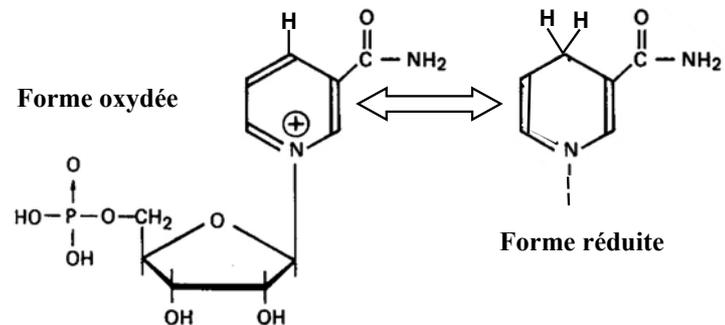
L'ATP, par certains de ces aspects, peut être considéré comme un coenzyme d'activation. L'UTP, en se fixant à certains oses simples pour former des UDP-oses, permet de nombreuses réactions (interconversion, oxydation, amination des oses). Le CTP se fixe à certains lipides comme les acides phosphatidiques pour former des CDP-diglycérides, intermédiaires dans la biosynthèse des phospholipides.

- ☑ **Coenzymes vitaminiques d'oxydoréduction** (dinucléotides irréguliers : NAD, NADP, FAD), de transport de radicaux (**coenzyme-A**) et de réarrangement de radicaux (**adénosyl de cobalamine**)

☑ **Figure. 15 : Nicotinamide ribonucléotide monophosphate (NRM) :**

Il s'agit d'un ribonucléotide irrégulier (vitamine PP = nicotinamide au lieu d'une base habituelle purique ou pyrimidique). Il fait partie de la structure biochimique du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et du NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate).

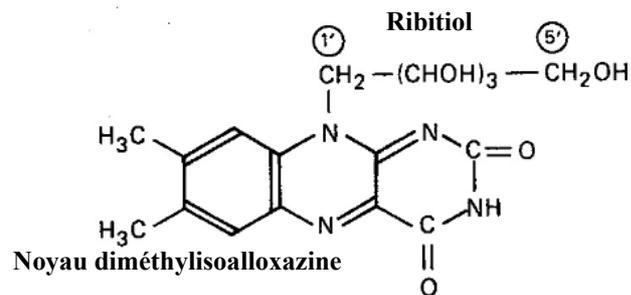
FIGURE 15



☑ **Figure 16 : Flavine mononucléotide (FMN) :**

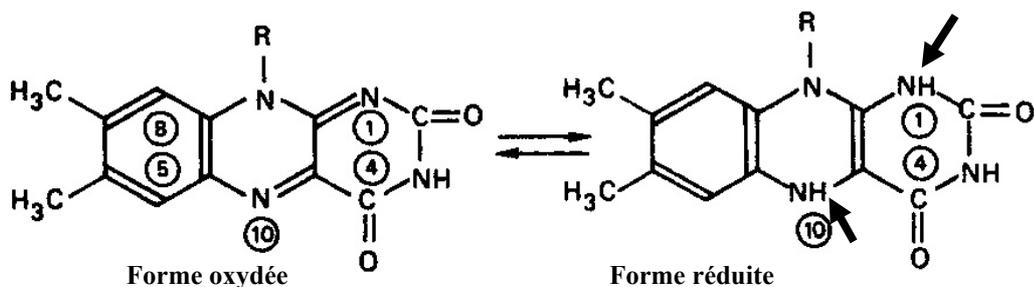
Il s'agit d'un ester phosphorique en 5' de la riboflavine (vitamine B2). C'est un nucléotide irrégulier dans lequel le noyau diméthylisoalloxazine remplace la base azotée et le ribitol (alcool dérivant de la réduction du ribose) remplace le ribose. Il fait partie de la structure du FAD (flavine adénine dinucléotide).

FIGURE 16

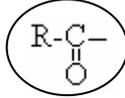


☑ **Figure 17 :** Le noyau isoalloxazine comporte deux doubles liaisons conjuguées capables de fixer réversiblement deux atomes d'hydrogène.

FIGURE 17

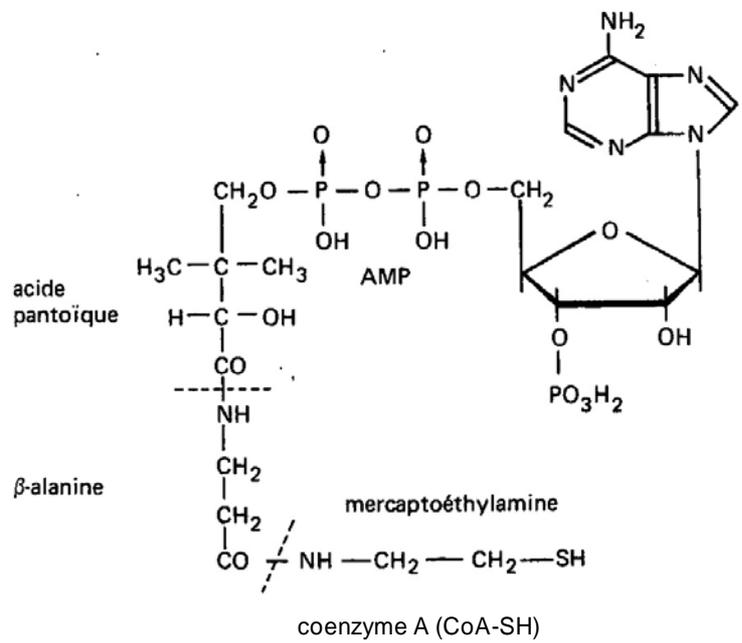


- ☑ **Figure 18 : Le coenzyme A (ou CoA-SH) joue le rôle de transporteur de radicaux acyl :**



(ou acétyl quand R est CH₃).

FIGURE 18

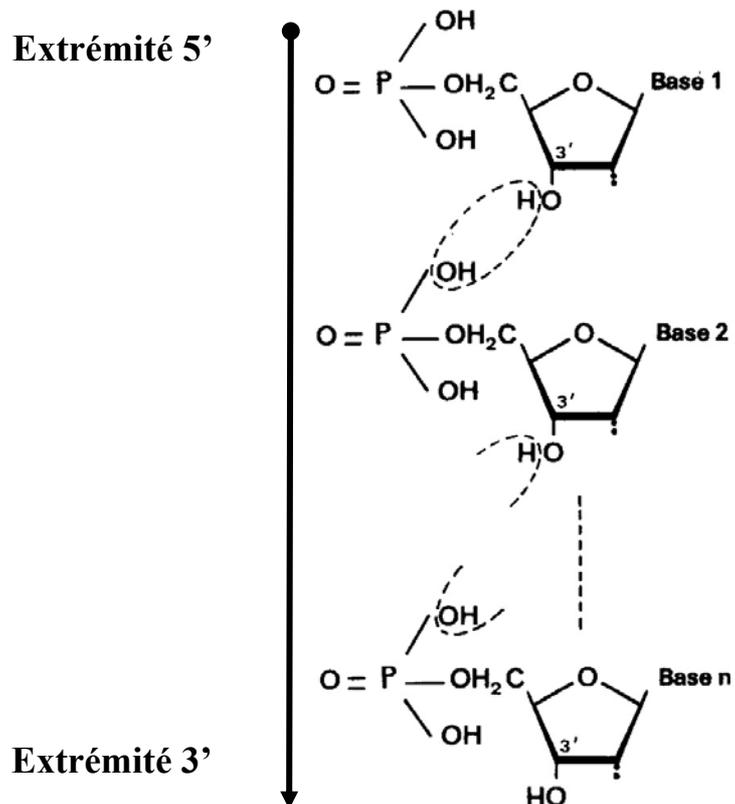


STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES
CHAPITRE 2
ASSOCIATION DES NUCLEOTIDES
DANS UN ACIDE NUCLEIQUE

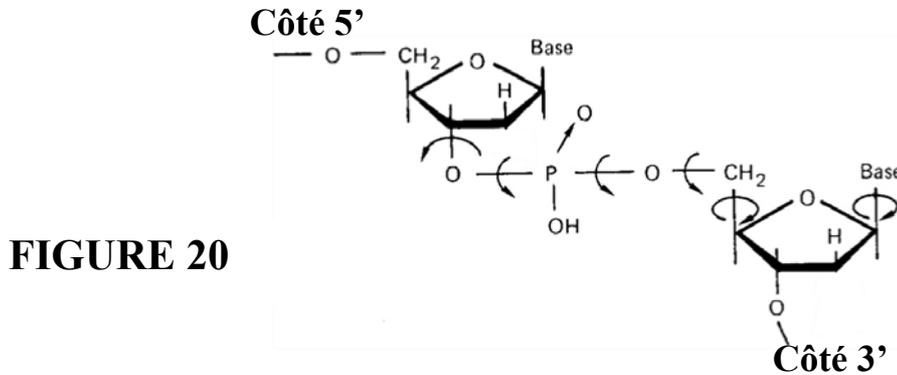
A-LIAISON RELIANT LES NUCLEOTIDES

- ☑ Dans les acides nucléiques, les nucléotides sont associés entre eux par des liaisons ester. Une molécule d'eau est éliminée entre une fonction acide de l'acide phosphorique et l'alcool en position 3' du sucre. Ainsi, l'acide phosphorique engage deux fonctions acides en donnant naissance à une **liaison phosphodiester**. La troisième fonction de l'acide phosphorique reste libre et confère des propriétés acides aux chaînes de DNA et de RNA
- ☑ Ces **liaisons définissent un sens à la molécule** : le début étant le nucléotide dont le **phosphate en 5'** ne serait lié à aucun autre nucléotide et la fin correspond au nucléotide dont la **fonction alcool en 3'** n'est pas estérifiée.
- ☑ En cas de **pH neutre** ($\text{pH} \gg \text{pKa}$ de la troisième fonction acide libre de l'acide phosphorique), chaque groupement phosphorique engagé dans une liaison phosphodiester possède **une seule charge négative**. Les chaînes d'acides nucléiques sont par conséquent des **polymères anioniques hautement chargés**.

FIGURE 19



- ☑ **Figure 20** : La liaison phosphodiester est très mobile et peut permettre différentes rotations rendant possible les structures secondaires et tertiaires que peuvent adopter les macromolécules d'acides nucléiques.



B-STRUCTURE PRIMAIRE DES ACIDES NUCLEIQUES

- ☑ **Définition** : La **structure primaire** d'un DNA ou d'un RNA est la succession ordonnée de tous les nucléotides composant la macromolécule de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. L'information génétique est apportée par la nature des bases azotées (A, C, G, T ou U).
- ☑ On peut utiliser le terme de chaîne nucléotidique, de filament ou de brin avec l'adjectif 'simple' ou monocaténaire. On distingue sur ce filament deux parties :

(1) Une **partie constante** ou **monotone** qui sert de support. Cette première partie est constituée par une succession régulièrement alternée de résidus de sucre (ribose ou 2-désoxyribose) et de groupements phosphate réalisant des ponts phosphodiester entre deux sucres successifs : **figure 21**.

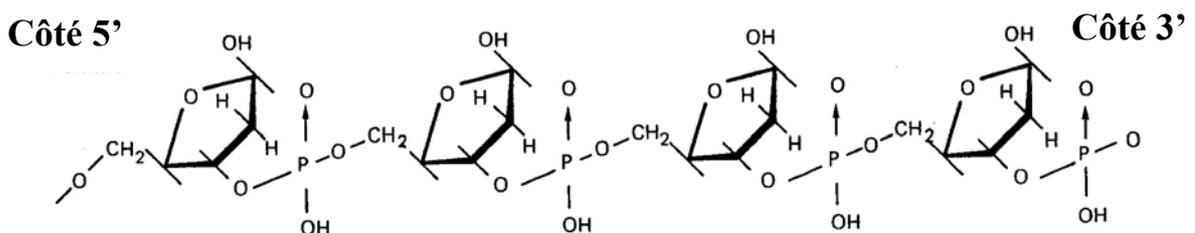


FIGURE 21

**Partie constante d'un filament monocaténaire de DNA.
Il est important de définir le sens du filament 5' → 3'.**

(2) Une **partie porteuse de l'information génétique** sous forme d'une succession ordonnée de bases azotées. Les bases sont fixées sur la partie constante par des liaisons β -osidiques. Les deux bases puriques sont l'adénine et la guanine, les bases pyrimidiques la thymine, la cytosine et l'uracile. La thymine est spécifique du DNA, tandis qu'on n'y trouve pas d'uracile. Au niveau des molécules de RNA, la thymine est remplacée par l'uracile.

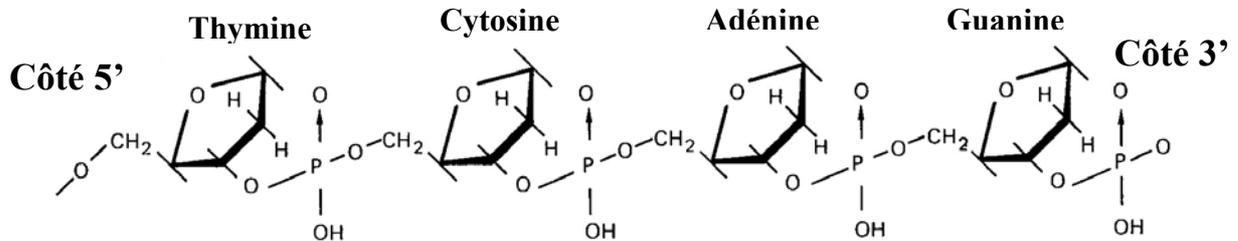
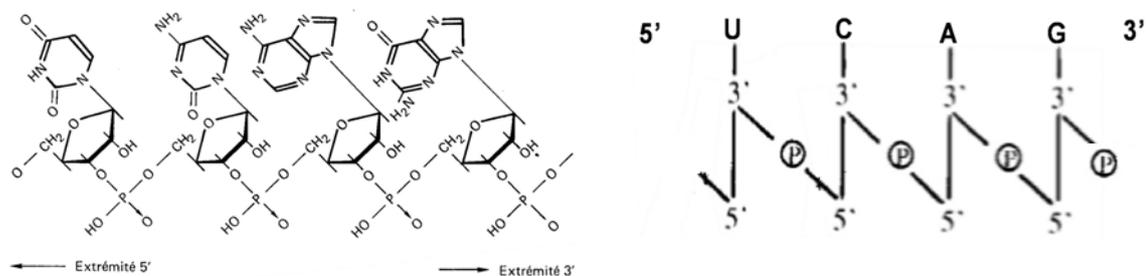


FIGURE 22

Filament monocaténaire de DNA.

C-CONVENTIONS DE D'ECRITURE D'UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE

- Une séquence d'acide nucléique correspond à la succession ordonnée des bases azotées portées par un filament monocaténaire. Par convention, l'écriture d'une séquence primaire d'acide nucléique se fait toujours à partir de l'extrémité 5' à gauche vers l'extrémité 3' à droite.
- Le modèle d'écriture qui sera choisi dépendra du contexte de l'étude et du degré d'information disponible ou nécessaire pour l'illustration de la séquence étudiée.
- Figure 23** : modèles d'écriture (en exemple la partie d'un filament monocaténaire de RNA).



5' U p C p A p G p 3'
 5' Py p U p A p Pu p 3'
 5' U C A G 3'

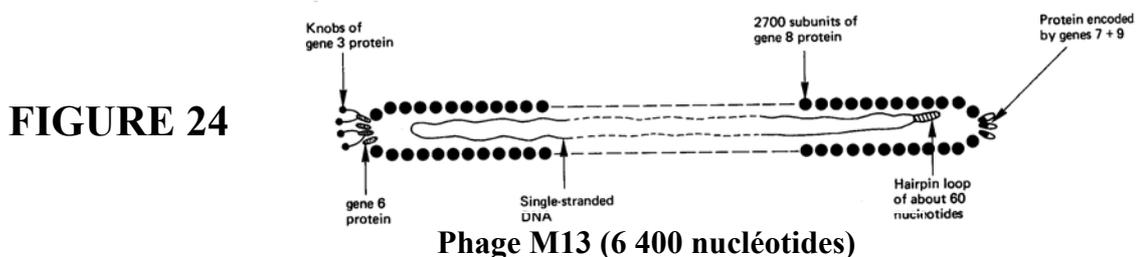


STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES
CHAPITRE 3
STRUCTURES ET CARACTERISTIQUES
DU DNA

- ☑ Le DNA est la molécule-mémoire responsable de la transmission des caractères héréditaires d'une génération à la suivante. Les entités vivantes concernées peuvent être des organismes simples tels que certains virus, un être unicellulaire ou pluricellulaire, du règne animal ou végétal.

A-LE DNA SIMPLE BRIN
(STRUCTURE PRIMAIRE)

- ☑ **Figure 24** : Certains virus, tels que le **phage M13** (6 400 nucléotides) et le phage Φ X174 (5 386 nucléotides), possèdent un génome constitué d'une chaîne monocaténaire circulaire de DNA.

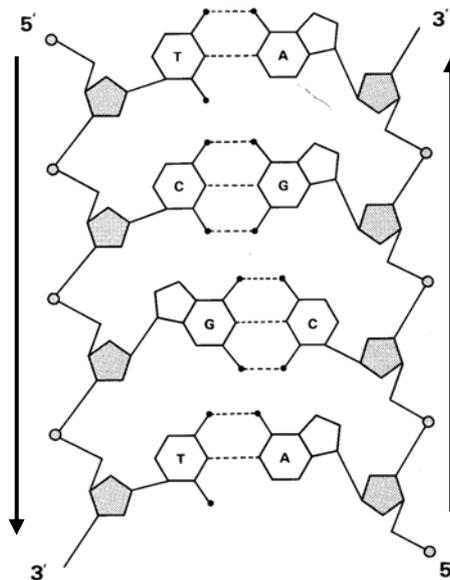


- ☑ La forme circulaire s'obtient simplement par l'établissement d'une liaison ester entre l'acide phosphorique à l'extrémité 5' et l'hydroxyle libre qui se trouve à l'autre extrémité 3' de la chaîne simple brin du même DNA.
- ☑ Chez le phage M13, on trouve également une petite région qui se présente sous forme d'une petite **tige** de 60 nucléotides. Dans cette région, le DNA n'est pas simple brin. Il forme une structure secondaire en double brin de DNA.

B-LE DNA DOUBLE BRIN (STRUCTURE SECONDAIRE)

- ☑ **Figure 25 :** Dans la majorité des cas, le DNA se présente sous la forme **double brin** (on dit aussi forme **bicaténaire**). Il s'agit de la **structure secondaire** du DNA. C'est une structure en **double hélice** composée de deux filaments de DNA associés au niveau des bases par des **liaisons hydrogène**. Les deux filaments sont **complémentaires** et **antiparallèles**.

FIGURE 25



- ☑ **Figure 26 :** Les deux brins sont unis les uns aux autres par des **liaisons hydrogène** échangées par les bases puriques ou pyrimidiques situées au même niveau et appartenant à l'un ou à l'autre brin de la structure.
- ☑ Dans cette structure, un nucléotide à adénine se lie avec un nucléotide à thymine et un nucléotide à cytosine se lie avec un nucléotide à guanine. On dit qu'ils sont **complémentaires**. On dit aussi qu'ils sont **appariés**. L'**appariement** par **complémentarité** des bases a comme résultat le fait que la séquence de l'un des brins détermine obligatoirement celle de l'autre.

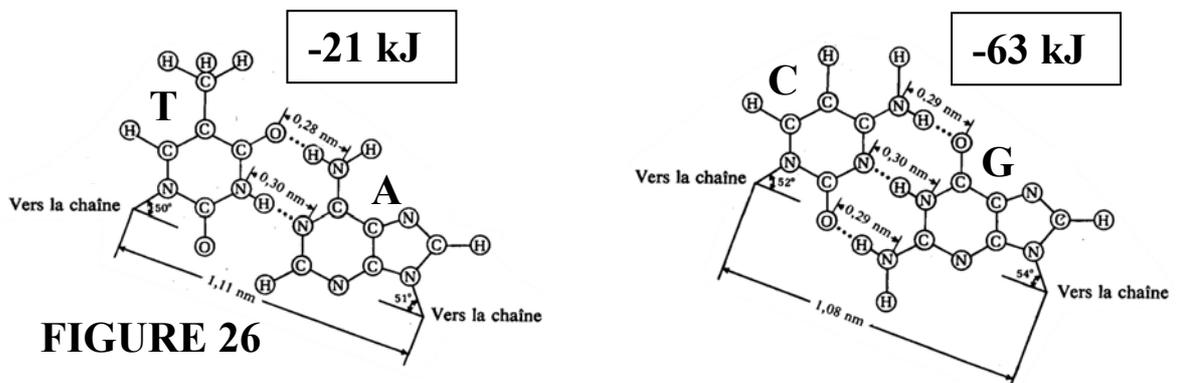
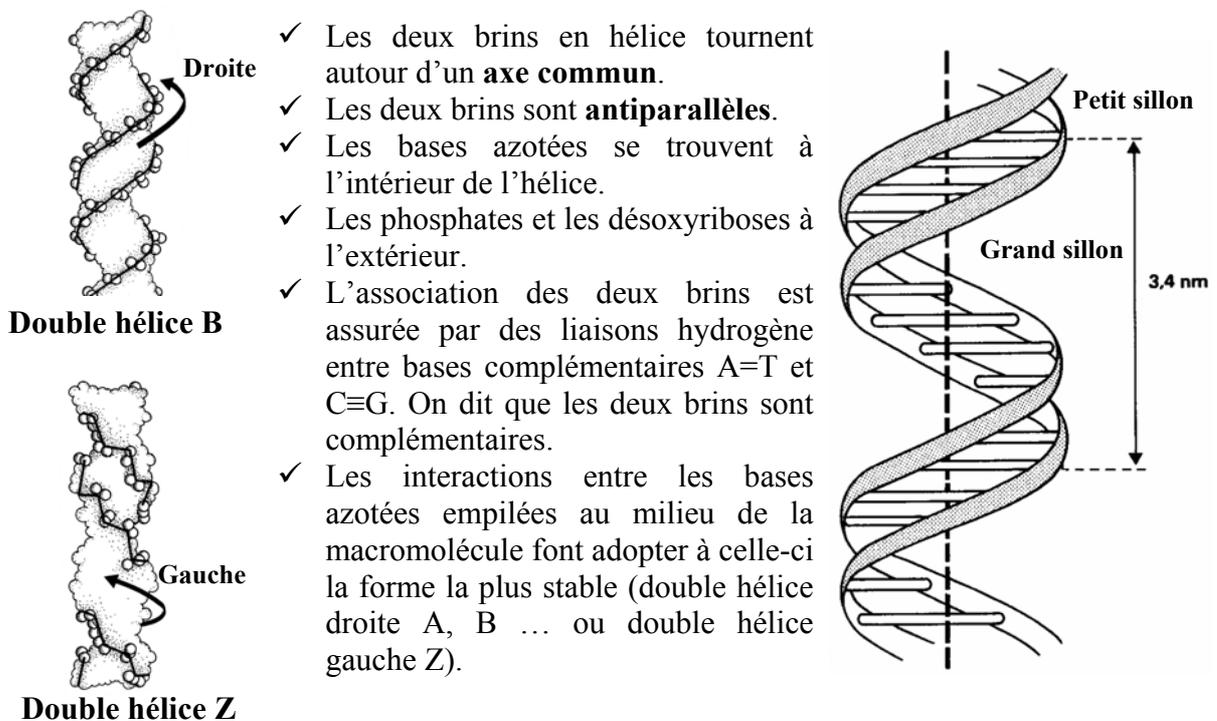


FIGURE 26

- ☑ L'association A=T (2 liaisons, -21 kJ) est moins stable que celle entre C≡G (3 liaisons, -63 kJ).
- ☑ Les liaisons hydrogène sont des liaisons de faible énergie. Dans le cas des nucléotides, ce type de liaison s'établit de façon très spécifique par **complémentarité** entre les bases (A=T et C≡G) qui doivent se trouver sous leur forme lactame.
- ☑ Les bases azotées étant des molécules **aromatiques** planes, les liaisons hydrogènes sont par conséquent disposées dans le même plan.
- ☑ **Figure 27** : Le **modèle en double hélice**, attribué à **Watson et Crick** 1953, est caractérisé par les points suivants :

FIGURE 27

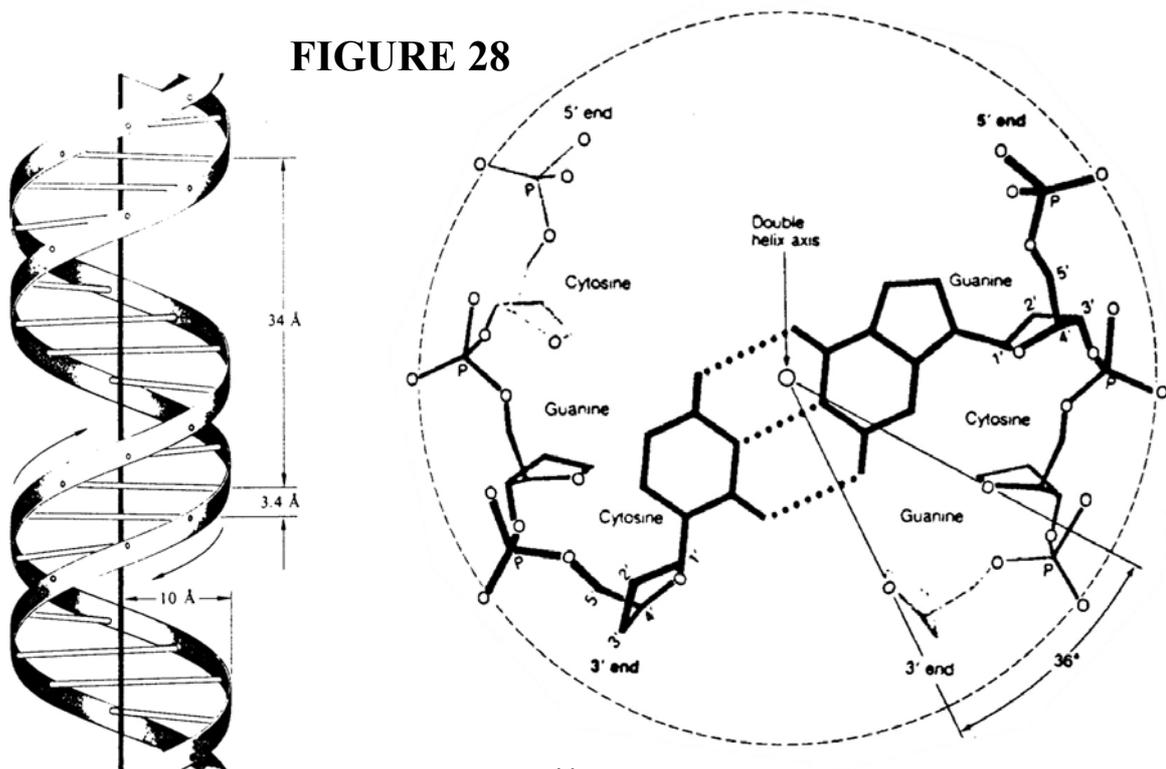


- ☑ La structure en double hélice de Watson et Crick a une valeur scientifique considérable car elle permet d'expliquer l'essentiel du fonctionnement du matériel génétique. Cette structure correspond à **la double hélice B** qui constitue, à l'état naturel, le cas de la majorité des DNA (voir caractéristiques : **Tableau V**).
- ☑ En réalité, ce n'est pas la seule structure que peuvent adopter les molécules double brin de DNA. La forme **DNA-A** par exemple dérive de la forme **DNA-B** par déshydratation. Le DNA-A possède 11 paires de bases par tour. Les bases, contrairement au DNA-B, ne sont pas perpendiculaires à l'axe mais sont inclinées de 70°.

- ☑ Ces structures sont possibles grâce aux rotations libres qui existent au niveau des 4 liaisons du pont phosphodiester et des deux liaisons osidiques (**figure 20**). Ainsi, différentes conformations peuvent être conçues avec des caractéristiques à chaque fois différentes (A, B, C, D Z).
- ☑ **Tableau V** : Une conformation paraît intéressante et peut exister dans certaines zones du DNA à l'état physiologique, c'est la double hélice Z.

DNA-B	DNA-Z
Double hélice droite	Double hélice gauche
Forme habituelle	Forme rare
Deux sillons	Sillon unique
10 pb par tour d'hélice	12 pb par tour d'hélice
3,4 nm / pas	4,6 nm / pas
2,0 nm de diamètre	1,8 nm de diamètre
Squelette sucre - phosphate en spirale régulière	Squelette sucre - phosphate en zigzag
Nucléosides puriques et pyrimidiques en conformation anti	Nucléosides en conformation : anti pour les bases pyrimidiques et syn pour les bases puriques

- ☑ **Figure 28** : Vue latérale et axiale de la double hélice de DNA.



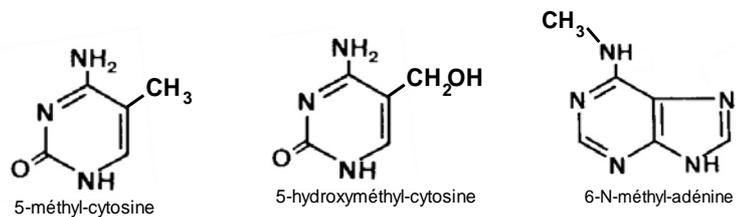
C- PROPRIETES PHYSICO - CHIMIQUES DU DNA

1- COMPOSITION

- ☑ Rappelons les constituants élémentaires du DNA :
 - ✓ Acide phosphorique,
 - ✓ Ose = β -D-2'-désoxyribofuranose,
 - ✓ Bases = A, T, C et G. (pour DNA double brin : % A = % T et % C = % G).

- ☑ **Figure 29** : Cependant, on trouve également, en quantités minimes, des bases modifiées. La modification est réalisée après synthèse du DNA par un mécanisme de **méthylation**. Les enzymes de modification sont des enzymes (**méthylases de modification**) que possèdent les bactéries pour se protéger d'une autodestruction (voir **enzymes de restriction**) en méthylant spécifiquement certains **résidus cytosine ou adénine**. Chez les mammifères, il existe un système de méthylation d'une autre nature qui touche **seulement les cytosines** et où méthylation est souvent synonyme de **verrouillage de l'expression**.

FIGURE 29



- ☑ On trouve le DNA comme support de l'information génétique chez différentes entités biologiques des plus simples aux plus complexes. La composition en AT ou en GC est caractéristique de l'espèce étudiée.
- ☑ Dans la majorité des cas, le DNA est double brin et nous avons donc des quantités identiques en bases complémentaires A et T, C et G. Dans ce cas : A=T et C=G ; Les rapports A/T = C/G = 1.
- ☑ Dans le cas où le DNA est simple brin (Phage M13 ou Φ X174 par exemple), la composition en Bases est toujours caractéristique mais il n'y a pas de correspondance entre les quantités en bases complémentaires.
- ☑ A noter que pour ces phages, une fois que leur DNA simple brin circulaire est injecté dans la cellule hôte, le deuxième brin complémentaire est alors synthétisé pour former une molécule circulaire double brin appelée forme RF (ou forme répliquative).

2- FORME ET TAILLE DU DNA

- Le DNA en double hélice peut adopter deux formes :
 - ✓ Forme **linéaire** : DNA de certains virus, chromosomes eucaryotes ...
 - ✓ Forme **circulaire** : DNA de certains virus, DNA du chromosome bactérien, plasmide, épisode, DNA mitochondrial, DNA chloroplastique ...
- Le poids moléculaire (PM) moyen d'un nucléotide est de **300 daltons**, d'une paire de nucléotides (ou paire de bases) : **600 daltons**. Le PM des DNA est toujours très élevé et sa taille très variable selon l'origine du DNA. Compléter le **tableau VI** suivant :

Tableau VI

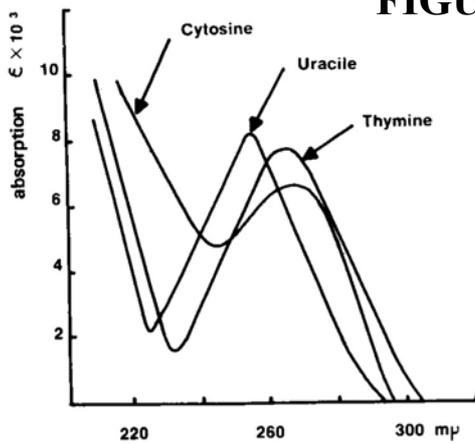
Organisme	Taille	Nature	Longueur (mm)	Nombre de macromolécules	PM
Phage Φ X 174	$5,5 \times 10^3$ nucléotides	Monocaténaire (simple brin)		1	$1,65 \times 10^6$
Phage T ₂	$2,5 \times 10^5$ pb	Bicaténaire (double brin)		1	120×10^6
Bactérie (<i>E. coli</i>)	pb	Bicaténaire	1,4	1	$2,4 \times 10^9$
Levure (<i>S. cerevisiae</i>)	$1,4 \times 10^7$ pb	Bicaténaire	4,6	16	
Drosophile	$1,7 \times 10^8$ pb	Bicaténaire	56	4	
Homme	$3,9 \times 10^9$ pb	Bicaténaire	990	23	

- La taille d'un DNA bicaténaire est le plus souvent estimée en nombre de paires de bases (pb) avec 1 kilo-paires de bases (1 **kpb**) = 1000 pb ; (Méga = 1 million) ...

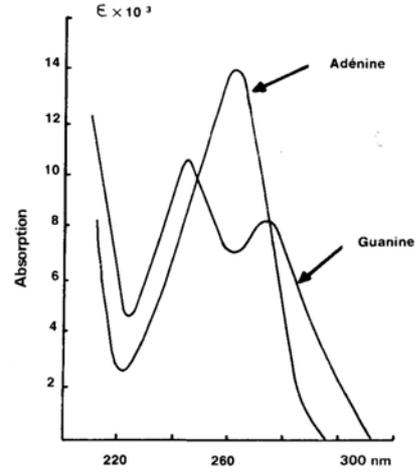
3- SPECTRE D'ABSORPTION

- Figure 30** : Le DNA absorbe dans l'UV avec un maximum à **260 nm**. Ceci est dû à la présence des bases azotées.
- Toutefois, cette absorption est nettement inférieure à celle que l'on obtiendrait avec un mélange des mêmes bases azotées aux mêmes concentrations à l'état libre. C'est l'**effet hypochrome**. La différence d'absorption résulte du fait que les noyaux aromatiques sont masqués (cachés) dans la structure en double hélice du DNA.

FIGURE 30



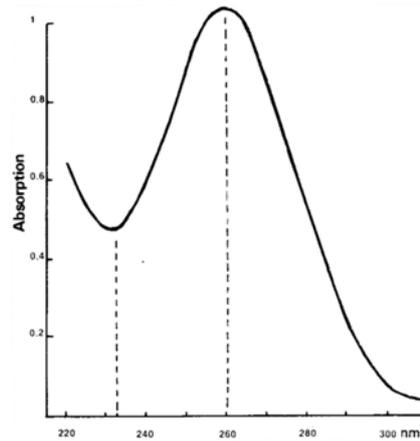
Courbe d'absorption dans l'ultra-violet de la cytosine, de l'uracile et de la thymine (bases pyrimidiques) (à pH = 7). (ϵ = coefficient d'absorption molaire).



Courbe d'absorption dans l'ultra-violet de l'adénine et de la guanine (bases puriques), à pH = 7. (ϵ = coefficient d'absorption molaire).

Figure 31 : Spectre d'absorption caractéristique d'un DNA bicaténaire.

FIGURE 31



Spectre ultra-violet caractéristique d'un acide nucléique.
 λ max. = 260 nm
 λ min. = 232 nm

L'absorption de la lumière UV se fait de manière proportionnelle à la teneur en DNA (concentration). Ceci constitue l'une des techniques d'estimation de la quantité en DNA.

C: concentration en ADN en $\mu\text{g/ml}$ (**DNA double brin**)
 A_{260} : absorbance à 260 nm sous un trajet optique de 1cm
 A_{320} : absorbance à 320 nm sous un trajet optique de 1cm
 $C = 50 (A_{260} - A_{320})$

C: concentration en ADN en $\mu\text{g/ml}$ (**DNA simple brin**)
 A_{260} : absorbance à 260 nm sous un trajet optique de 1cm
 A_{320} : absorbance à 320 nm sous un trajet optique de 1cm
 $C = 33 (A_{260} - A_{320})$

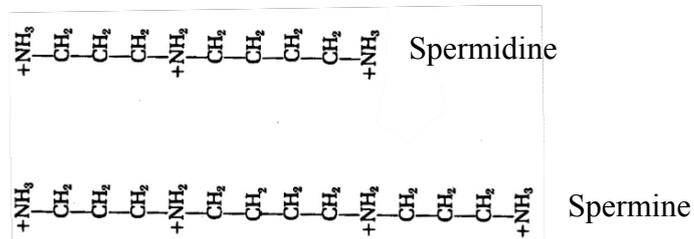
L'analyse et la manipulation du DNA exigent généralement des préparations d'assez bonne qualité. La pureté des préparations peut être estimée par la détermination du rapport d'absorption à 260 et 280 nm.

Rapport $A_{260} / A_{280} = 1,8$
Si rapport $> 1,8$: préparation contaminée par RNA
Si rapport $< 1,8$: préparation contaminée par protéines

4- SOLUBILITE, PRECIPITATION ET EFFET DU pH

- ☑ Le DNA est un acide qui peut former des sels en présence de cations monovalents tel que le sodium. Les **sels de sodium d'un DNA** sont **solubles dans l'eau** en donnant des solutions très visqueuses.
- ☑ Les groupements phosphate secondaires, fortement polaires, ont un **pKa** assez bas et sont totalement ionisés au dessus de pH 4. Par conséquent, le DNA se comporte comme un **polyacide fort**. Les groupements phosphate, placés à la périphérie de la double hélice, sont totalement exposés à l'eau ambiante. Les DNA lient fortement les cations tels que Mg^{2+} et Ca^{2+} ainsi que des **polyamines** telles que la **spermine** et la **spermidine** (Figure 32). La fixation des polyamines dans le sillon des DNA bicaténaire neutralise leurs charges négatives et rend la macromolécule plus **flexible**.

FIGURE 32

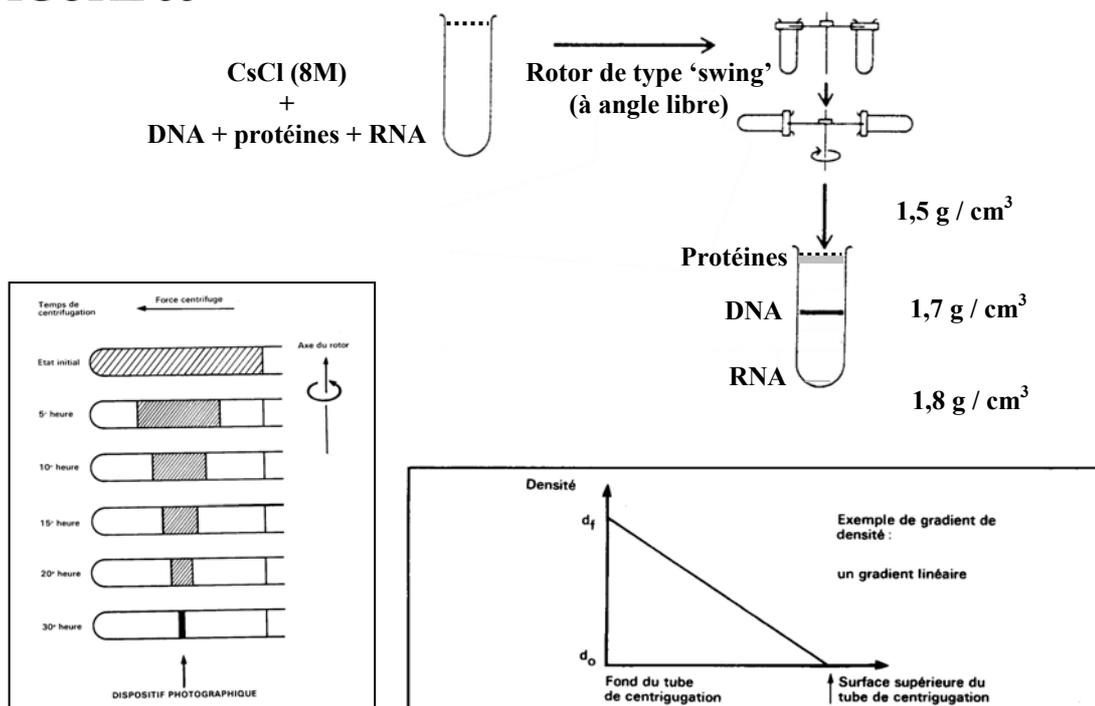


- ☑ Les DNA (sels) sont précipitables par l'éthanol ce qui permet en pratique de concentrer les solutions de DNA en les solubilisant par la suite dans un volume aqueux plus petit que celui d'avant.
- ☑ La capacité des différentes bases à établir entre elles des liaisons hydrogène dépend de leur forme ionique variable suivant le pH. Il en résulte que la **stabilité de l'appariement** des bases dans la double hélice des DNA dépend elle aussi du pH. Les appariements de bases ont une stabilité maximum entre pH 4,0 et pH 10,0.
- ☑ A un pH situé entre 3 et 4, les **liaisons osidiques** associées aux **bases puriques** sont hydrolysées. L'acide nucléique (**DNA ou RNA**) devient **apurinique**.
- ☑ Dans un acide fort et à des températures élevées (acide perchlorique $HClO_4$ à plus de $100\text{ }^\circ C$), les acides nucléiques (DNA ou RNA) sont **complètement hydrolysés** en leurs constituants (**bases, ose et phosphate**).
- ☑ A un pH physiologique, les bases azotées prédominent dans la forme 'ceto'. L'effet du **pH alcalin** est de changer l'**état tautomère** des bases du DNA. L'augmentation du pH produit un revirement à la forme 'énol'. Ceci affecte les liaisons hydrogènes entre les paires de base complémentaires en dissociant la structure bicaténaire du DNA. Il s'agit d'une '**dénaturation alcaline**'. Elle aboutit à la séparation des deux brins complémentaires du DNA.

5- DENSITE DE FLOTTABILITE

- ☑ **Figure 33** : L'analyse et l'épuration des DNA peuvent être faites selon sa **densité** (ρ). Dans une solution de **chlorure de césium CsCl 8,0 M** ($\rho = 1,7 \text{ g/cm}^3$), le DNA présente en moyenne une densité similaire au volume de la solution (environ $1,7 \text{ g/cm}^3$). Si la solution est centrifugée à une très grande vitesse (champ de gravitation compris entre 100 000 et 200 000 g), le sel de césium tend à migrer au fond du tube en créant un gradient de densité croissant. Le DNA, mélangé de façon homogène au départ se retrouve en fin de centrifugation à une position correspondant à sa propre densité de flottabilité dans le gradient.

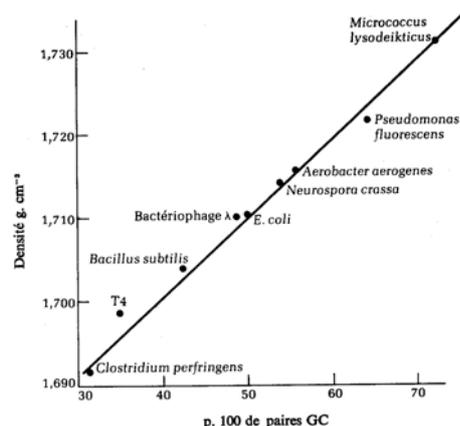
FIGURE 33



- ☑ Cette technique s'appelle « **centrifugation isopycnique** » ou « **centrifugation du gradient de densité à l'équilibre** ». Elle peut servir à purifier les préparations de DNA des contaminants (RNA au fond et protéines à la surface), à séparer le DNA plasmidique du DNA chromosomique bactérien. C'est également une **technique analytique** puisque la densité de flottabilité du DNA est une fonction linéaire de son contenu en G+C (**figure 34**).

FIGURE 34

$$\rho = 1,66 + 0,0098 \% (G+C)$$



6- DENATURATION, RENATURATION, HYBRIDATION

- ☑ **Figure 35 (étape 1) :** La **dénaturation** du DNA s'obtient par la déstabilisation des liaisons hydrogènes entre les bases azotées. Ceci provoque la dissociation de la structure en double hélice et la séparation des deux brins complémentaires. Cette déstabilisation peut être provoquée par **l'augmentation de la température (fusion)** ou bien sous l'action du **pH alcalin** (dénaturation alcaline) ou encore sous l'effet d'agents chimiques tels que **l'urée** (H_2NCONH_2) ou le **formamide** (HCONH_2).
- ☑ **Figure 35 (étape 2a) :** C'est un mécanisme qui peut être **réversible** dans une certaine mesure. On parle de **renaturation** quand les deux brins réassociés sont ceux là même qui ont été séparés par dénaturation. On parle d'**hybridation** lorsque les deux brins réassociés sont de sources ou d'origine différentes.
- ☑ Après suppression du facteur dénaturant, le refroidissement lent (ou bien l'incubation à une température favorable à la renaturation) laisse suffisamment de temps aux deux brins complémentaires pour se retrouver et se réassocier en double hélice.

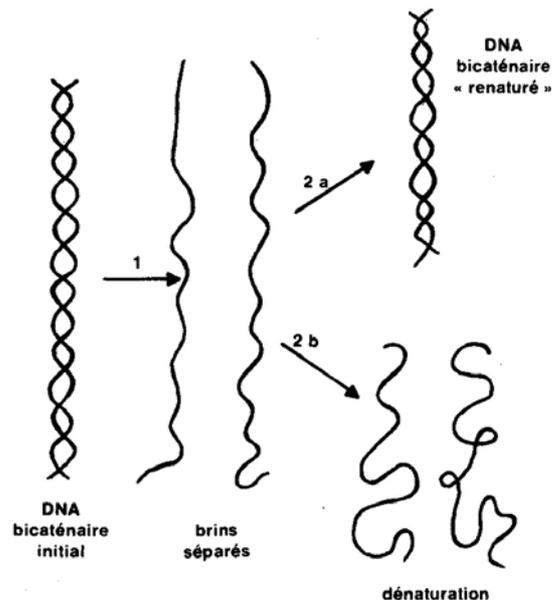


FIGURE 35

- ☑ **Figure 36 :** La dénaturation est accompagnée d'une augmentation de 40 % de l'absorption en lumière UV : on parle d'**effet hyperchrome**. Cette augmentation ne se fait pas de manière linéaire progressive (voir figures 37 et 38).

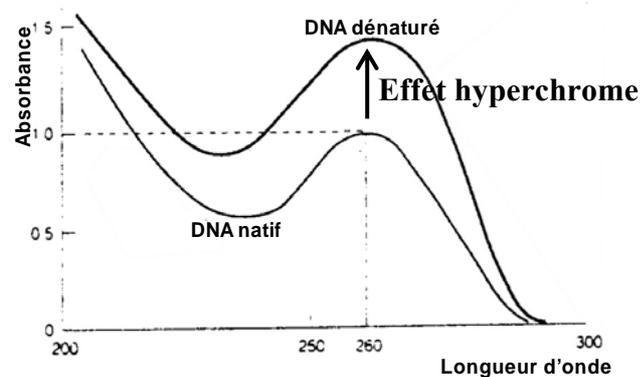
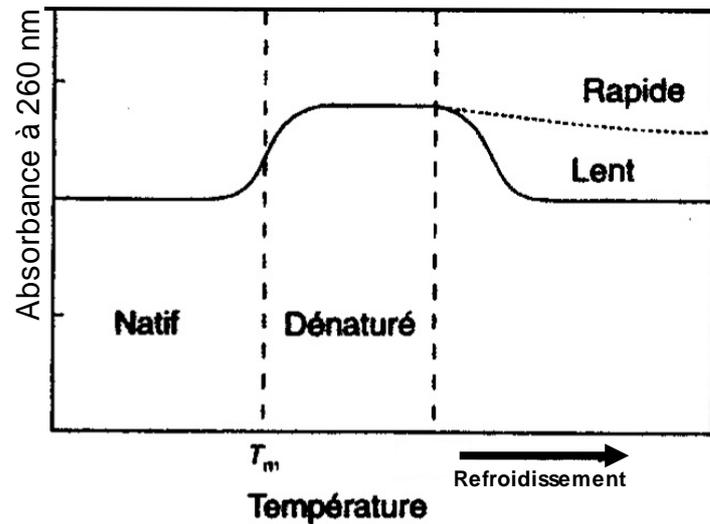


FIGURE 36

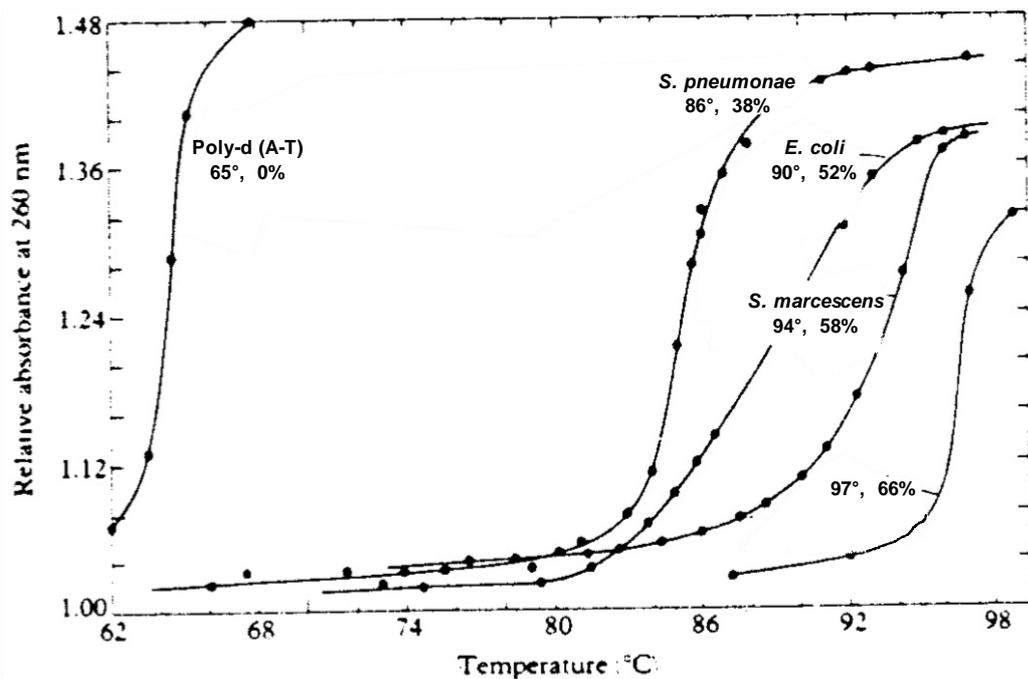
- ☑ La fusion du DNA double brin est dite **coopérative** car la fusion partielle des extrémités de la molécule et des régions riches en (A=T) va déstabiliser les régions adjacentes de la double hélice, ce qui déclenche une fusion concertée de toute la structure.
- ☑ **Figure 37** : Le **point d'inflexion** correspond à la **température de fusion** ou **T_m** (en anglais : melting temperature). Elle représente la température à laquelle **50%** des liaisons hydrogène sont déstabilisées : on parle de **DNA demi-dénaturé**.

FIGURE 37



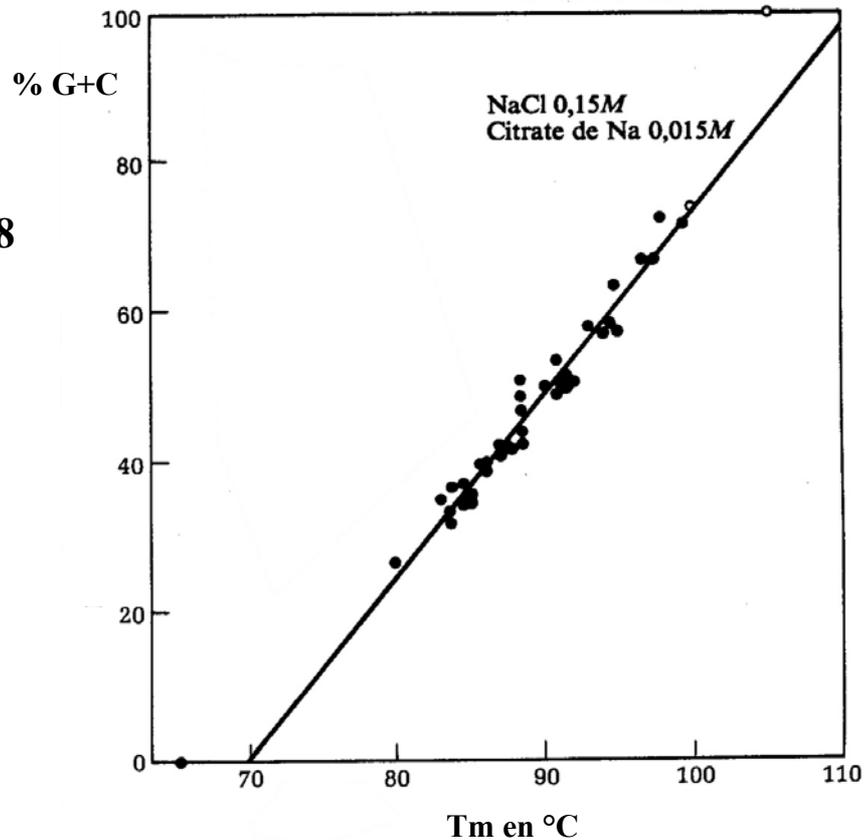
- ☑ **Figure 37-bis** : La valeur de la T_m dépend du **contenu (G=C)** du DNA. Plus un DNA double brin est riche en (**% GC**), plus la T_m sera élevée.

FIGURE 37-bis



- ☑ **Figure 38** : Dans des conditions fixes de pH et de force ionique, la détermination du point de fusion d'un échantillon de DNA permet une estimation remarquablement précise de sa composition en bases: $T_m = a + b \cdot (\% G+C)$ (fonction linéaire).

FIGURE 38



Le graphique montre les résultats correspondant à 40 échantillons de DNA bicaténaire de différentes origines : végétale, animale ou virale. Les mesures sont effectuées dans des conditions identiques (NaCl 150 mM ; citrate de sodium 15 mM). Le pourcentage en G+C et la T_m de chaque échantillon de DNA ont été expérimentalement déterminés. L'analyse du graphique permet d'établir une relation linéaire entre ces deux variables :

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

STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES
CHAPITRE 4
PROPRIETES TOPOLOGIQUES DU DNA

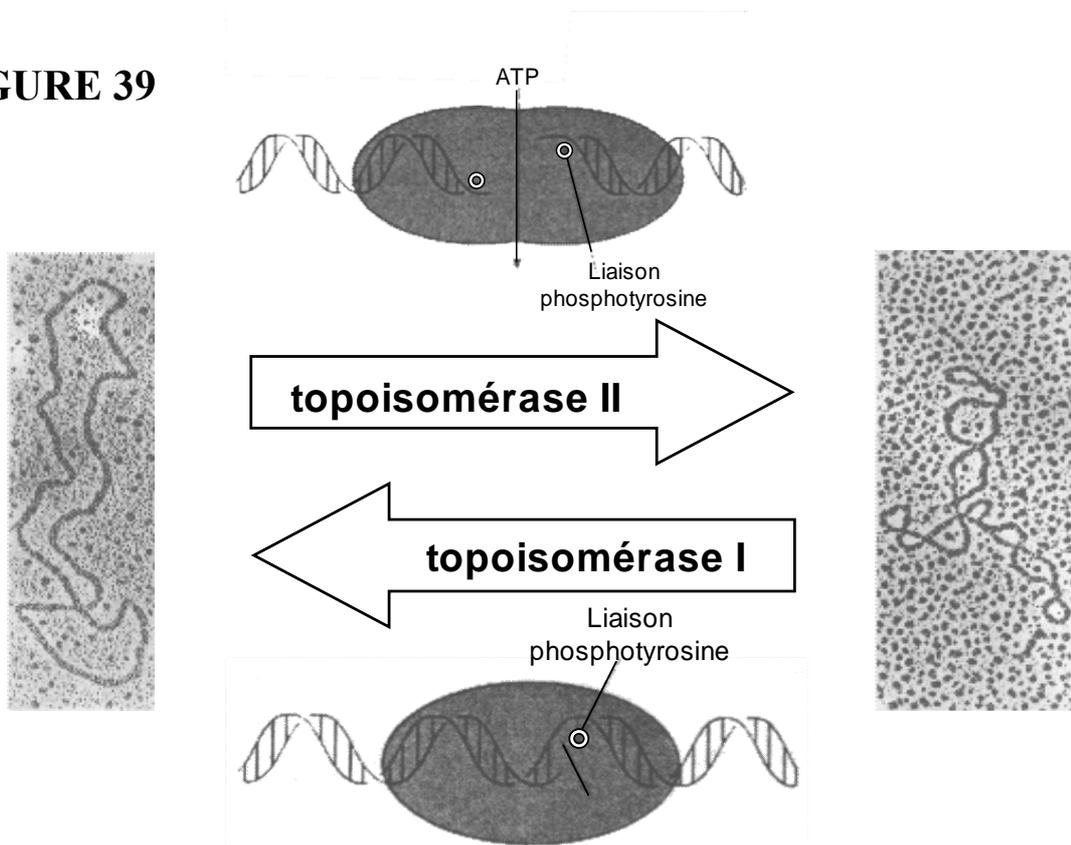
A-SURENROULEMENT DU DNA

☑ **Figure 39 :** Les **topoisomérases** sont des enzymes qui modifient le nombre d'enlacement. Elles sont capables d'introduire ou d'éliminer des **supertours** dans une double hélice de DNA. Deux types de topoisomères sont essentiellement décrits :

1- Les topoisomérases I : C'est des enzymes qui suppriment les supertours. Elles procèdent à une seule coupure transitoire. L'OH en 3' est momentanément libéré, le phosphate en 5' estérifie une tyrosine du site actif de l'enzyme. Il y a rotation libre du brin de DNA coupé puis ressoudure du brin de DNA. C'est donc des enzymes relâchantes. Elles ne nécessitent pas d'apport en ATP.

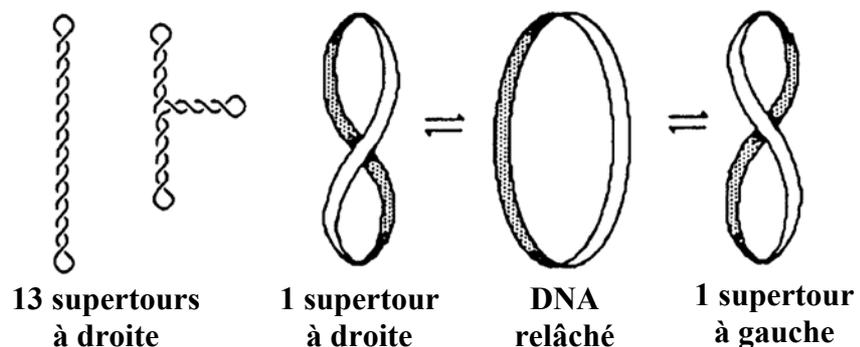
2- Les topoisomérases II : Elles coupent de manière transitoire, introduisent des supertours négatifs puis ressoudent les deux brins du DNA (environ 1 supertour pour 200 paires de bases). Elles sont dimériques, chaque brin du DNA est coupé par l'une des deux sous-unités. Ces opérations sont couplées avec l'hydrolyse de molécules d'ATP.

FIGURE 39



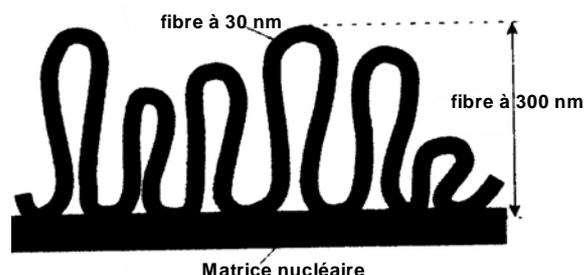
- ☑ **Définition :** Soit deux molécules de DNA circulaires ayant exactement la même séquence nucléotidique. Ces deux molécules sont des **topoisomères** si elles présentent un nombre différent d'**enlacement** ou de **supertours** (c'est-à-dire le nombre de tours que fait l'un des deux brins autour du brin complémentaire selon l'axe de la double hélice).
- ☑ Les DNA bicaténaires circulaires (de virus, bactéries, mitochondries), isolés avec précaution sous une forme native, présentent souvent une structure torsadée. Cette structure est observée généralement parce que le DNA en question est désenroulé (moins de 10 nucléotides par tour d'hélice. En conséquence, la structure entière du DNA circulaire compense ou dissipe les contraintes dues aux forces de torsion en s'entrecroisant dans le sens opposé jusqu'à revenir à 10 nucléotides par tour d'hélice.
- ☑ **Figure 40 :** Deux formes de surenroulement sont possibles par rapport à la forme relâchée d'un DNA :
 - 1- **Surenroulement négatif :** C'est le cas de la grande majorité des molécules de DNA rencontrées dans la nature. le nombre d'enlacements a été diminué, la tension produite par désenroulement conduit à la formation d'une superhélice « négative » avec des supertours à droite.
 - 2- **Surenroulement positif :** Très rares dans la nature, il existe chez les **bactéries thermophiles**. Le nombre d'enlacement a été augmenté, l'axe de la double hélice s'enroule selon une superhélice « gauche ».

FIGURE 40



- ☑ Un DNA linéaire ou circulaire est dans état relâché lorsqu'il n'est soumis à aucune tension de surenroulement. C'est le cas des DNA linéaires extraits et purifiés.
- ☑ Un DNA linéaire peut être également sous forme surenroulée et montrer des topoisomères à condition que les deux extrémités aient un point d'ancrage. Ce qui est en fait le cas dans les cellules eucaryotes (DNA retenu en grosses boucles par l'interaction avec les protéines de la matrice nucléaire : **Figure 41**).

FIGURE 41



- ☑ **Figure 42 :** Le DNA désenroulé (= surenroulé négativement) est une conformation qui facilite le déroulement de l'hélice, permet aux deux brins de s'écarter localement et autorise ainsi le déroulement de processus tels que la réplication et la transcription.

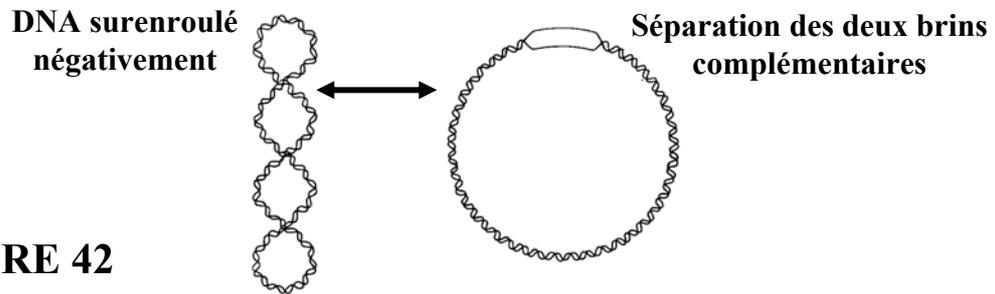
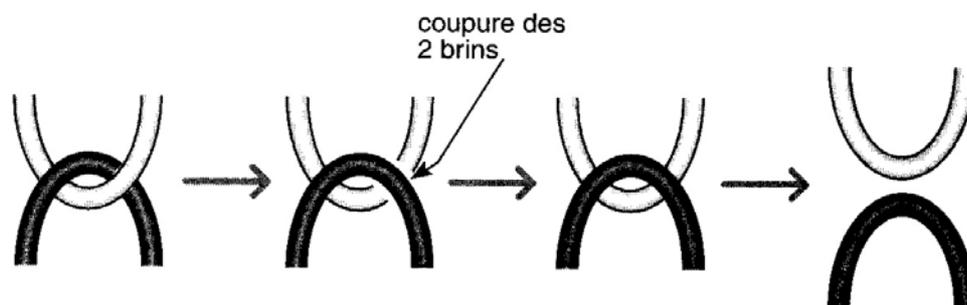


FIGURE 42

- ☑ **Intérêt biochimique et rôles biologiques des topoisomérases :**

- 1- En général, l'introduction des supertours dans le DNA lui permet d'adopter une configuration vrillée compactée. Ceci permet et facilite l'**empaquetage** d'une très longue molécule sous un petit volume.
- 2- En outre, les topoisomérases sont essentielles en facilitant la réplication, la transcription et la réparation du DNA. Plusieurs processus physiologiques biologiques propres aux DNA ne peuvent commencer que si le DNA est surenroulé négativement. Le rôle des enzymes relâchant serait d'ajuster le bon degré de surenroulement du DNA. Il existe donc une sorte d'équilibre que l'action simultanée des deux types de topoisomérases doit conserver.
- 3- De plus, les topoisomérases II ont également un rôle de **déméleur** qui permet de défaire les nœuds et les enchevêtrements des filaments de DNA (**Figure 43**).

FIGURE 43

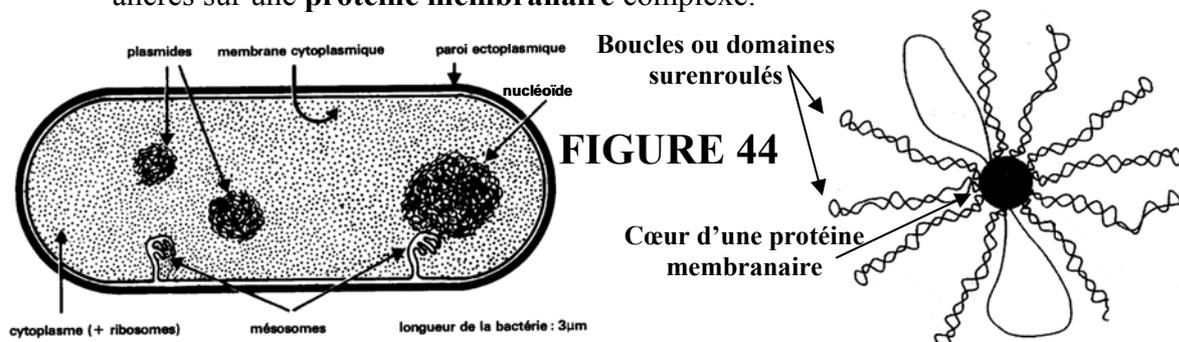


- 4- Dans le cas des archéobactéries et eubactéries thermophiles, organismes vivants dans les sources d'eaux chaudes à 80°C, le DNA est protégé dans ces conditions extrêmes de la dénaturation par l'action d'une topoisomérase particulière qui introduit, en présence d'ATP, des supertours positifs.

B-NIVEAUX SUPERIEURS DE CONDENSATION DES MACROMOLECULES DE DNA

1- STRUCTURE DU CHROMOSOME PROCARYOTE

- ☑ Le composant principal du génome bactérien est une molécule de DNA bicaténaire de forme circulaire appelée '**chromosome bactérien**' bien qu'elle diffère grandement des chromosomes des eucaryotes.
- ☑ Dans le cas de la bactérie intestinale commune *E. coli* (environ **3 000 gènes**), le chromosome comprend **4,6 millions paires de bases** représentant seulement un millième de la quantité qui se trouve dans une cellule eucaryote moyenne.
- ☑ Malgré tout, cette quantité représente beaucoup de DNA à emballer dans un volume aussi petit. Le DNA déployé d'une cellule de *E. coli* mesure environ **1,5 millimètres de longueur**, soit une longueur 500 fois supérieures à la longueur de la cellule elle-même.
- ☑ **Figure 44** : En fait, le chromosome bactérien forme une structure compacte très pelotonnée dans une région de la cellule appelée **nucléotide**. Il est réparti entre 50 à 100 **boucles** ou **domaines** de 50 à 100 kpb de longueur. Ces domaines sont tous ancrés sur une **protéine membranaire** complexe.



- ☑ En général, le génome bactérien est surenroulé négativement. Les différents domaines sont topologiquement indépendants, ce qui signifie qu'ils sont capables de supporter des niveaux différents de surenroulement.
- ☑ Les domaines de DNA sont compactés en s'enroulant autour de protéines liées au DNA de façon **non spécifique** (spécificité en terme de séquence nucléotidique). Ces protéines sont décrites comme **analogues aux histones** des eucaryotes. Les plus répandues sont :

1- Protéines HU : une petite protéine dimérique basique et chargée positivement. Elle se lie au DNA par le bobinage de celui-ci autour de la protéine.

2- Protéines H-NS : protéine monomérique neutre.

2- STRUCTURE DU GENOME CHEZ LES EUCARYOTES

- ☑ Les **chromosomes** d'eucaryotes renferment une quantité considérable de DNA par rapport à leur taille. Chaque chromosome comprend une seule macromolécule ininterrompue de DNA. Chez l'Homme par exemple, un chromosome contient environ 2.10^8 paires de nucléotides. Déroulée, une telle molécule de DNA aurait une longueur d'environ 6 cm, soit des milliers de fois le diamètre d'un noyau cellulaire. Tout ce DNA et aussi celui des 45 autres chromosomes humains peuvent prendre place dans le noyau grâce à son organisation.
- ☑ Chez les eucaryotes, **la chromatine** comporte du DNA associé de façon précise à de grandes quantités de protéines. Pendant l'interphase, les fibres de chromatine s'étirent et s'emmêlent considérablement et apparaissent, après coloration, comme masse diffuse. Cependant lorsque la cellule se prépare à la mitose, la chromatine s'enroule et se replie pour se condenser en un ensemble de chromosome courts et épais qui deviennent parfaitement visibles au microscope photonique.

I. NUCLEOSOME

- ☑ De petites protéines appelées **histones** assurent le premier niveau de condensation du DNA dans la chromatine. En fait, la chromatine est composée d'à peu près autant d'histones que de DNA.
- ☑ Les histones contiennent une forte proportion d'acides aminés **basiques** (lysine et arginine) de **charge positive** dans les conditions de pH cellulaire. Les histones se lient solidement au DNA qui porte des charges négatives et forment ainsi la chromatine. On trouve chez les eucaryotes **5 types d'histones** : **H₁** ; **H_{2A}** ; **H_{2B}** ; **H₃** et **H₄**.
- ☑ **Figure 45** : Chaque **nucléosome** est constitué d'un segment de DNA de **145 paires de nucléotides** et de Huit molécules d'histones (H_{2A} ; H_{2B} ; H₃ et H₄) x 2.

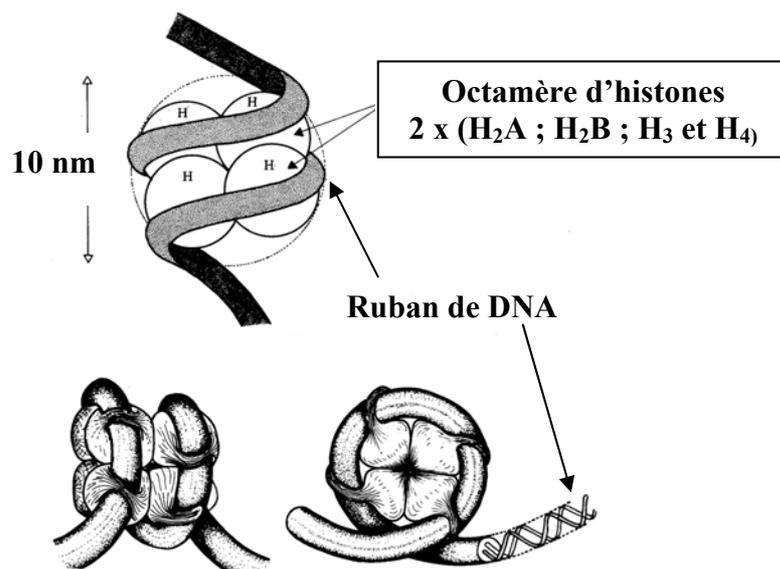


FIGURE 45

II. FIBRE DE CHROMATINE ET NIVEAUX SUPERIEURS DE CONDENSATION

- ☑ **Figure 46** : La chromatine déroulée ressemble à un **collier de perles (fibre de chromatine à 11 nm)**. Chacune des perles correspond en fait à un nucléosome, c'est-à-dire l'unité de base de condensation du DNA eucaryote. Les nucléosomes sont reliés par des brins minces de DNA : le **DNA linker** d'une taille moyenne de 55 paires de nucléotides.
- ☑ Grâce à l'histone H1 (Une par nucléosome), le collier de perle subit à son tour un repliement d'ordre supérieur. La fibre de 11 nm s'enroule sur elle-même pour former une structure hélicoïdale de 30 nm de diamètre : structure dite en **solénoïde**. Environ six nucléosomes par tour de solénoïde. Elle forme une grande partie la chromatine dite '**compactée**' où le DNA n'est pas accessible.

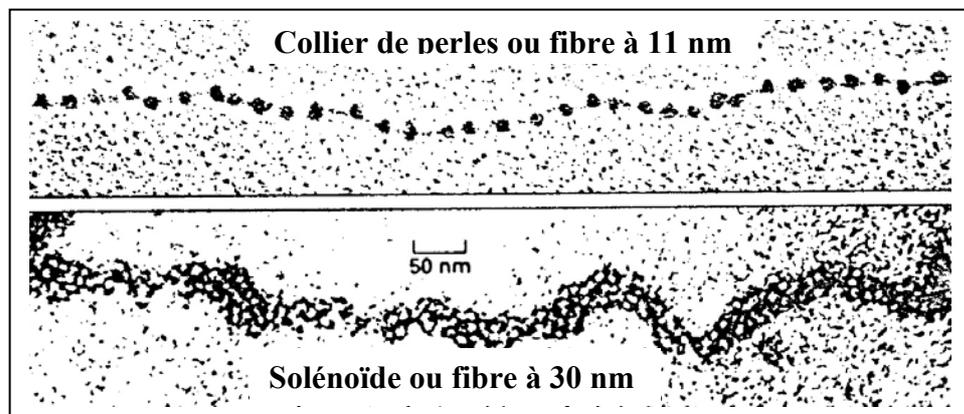
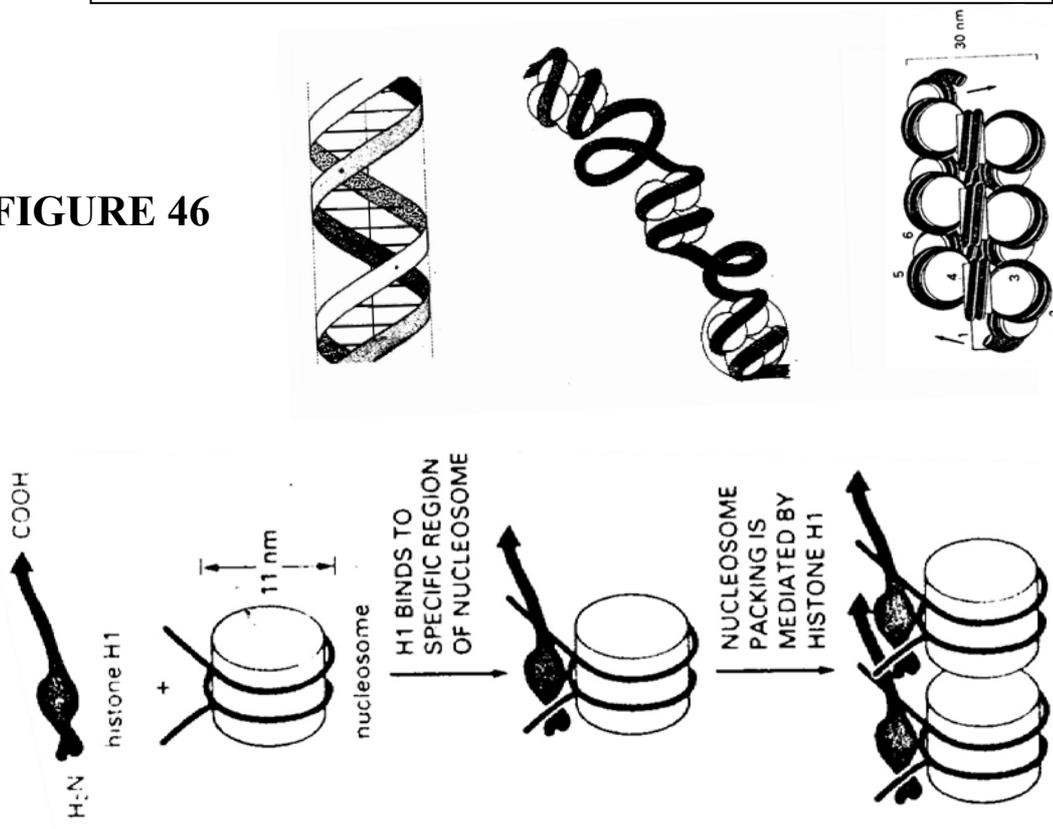
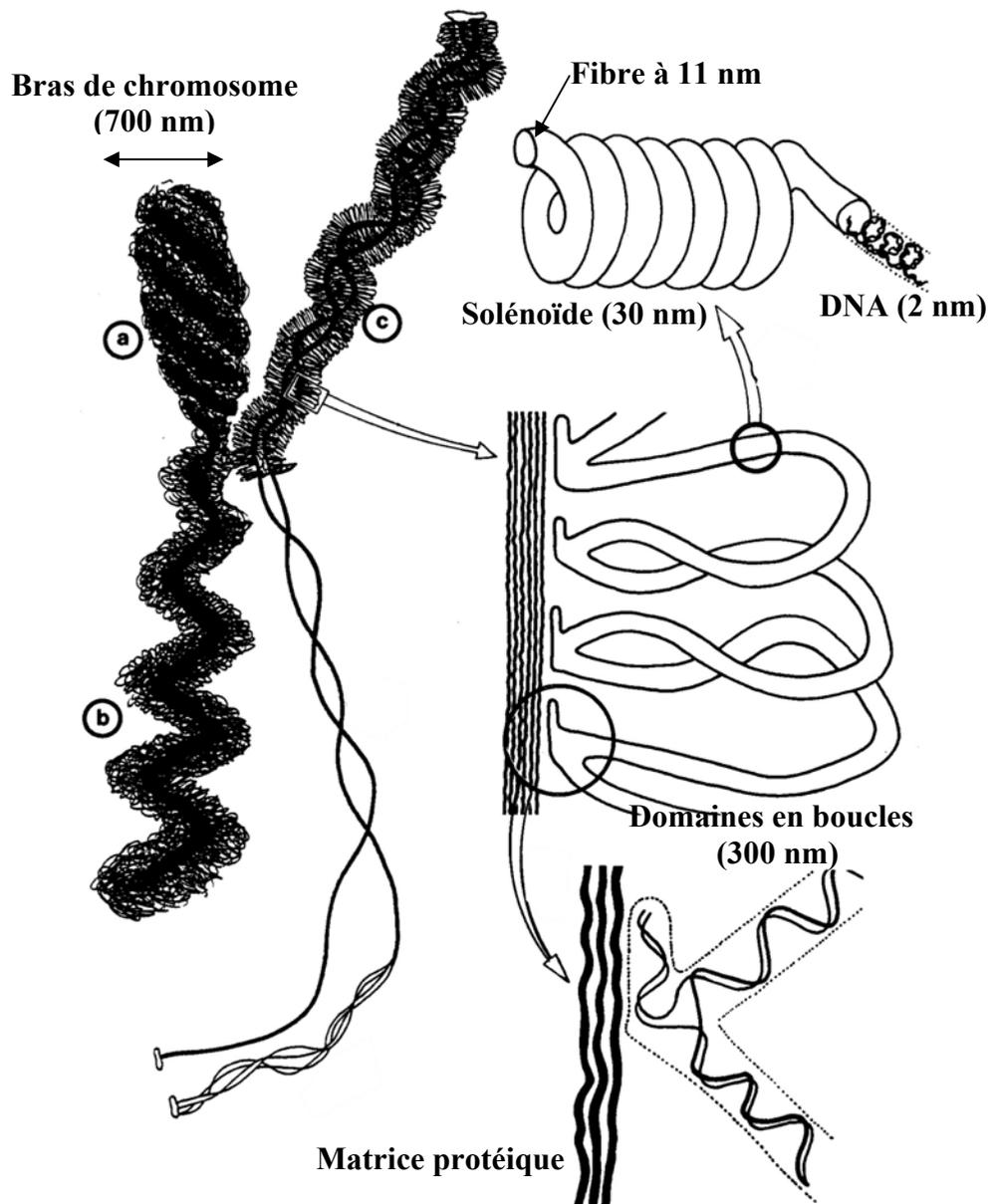


FIGURE 46



- ☑ **Figure 47** : La fibre de chromatine à 30 nm décrit à son tour des **domaines en boucle (Fibre 300 nm)** et dans un chromosome en mitose, les domaines en boucles s'enroulent et se replient sur eux même, de sorte que la chromatine devient encore plus compacte (fibre à 700 nm de diamètre) et confère aux chromosomes leur aspect caractéristique en métaphase.

FIGURE 47



STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES
CHAPITRE 5
ACIDES RIBONUCLEIQUES (RNA)

A-LES DIFFERENTS GROUPEES DE RNA

☑ **Tableau VII** : Les cellules contiennent 4 groupes de RNA :

RNA	Composition moyenne dans une cellule
rRNA	82 %
tRNA	16 %
mRNA	2 %
snRNA	Moins de 1%

- 1- **rRNA** (RNA ribosomiaux)
- 2- **tRNA** (RNA de transfert)
- 3- **mRNA** (RNA messenger)
- 4- **snRNA** ('small nuclear RNA')

☑ Les RNA constituent également le support de l'information génétique de certains **bactériophages** ($R_{17}, Q\beta$), des **virions** et de beaucoup de **virus** :

- 1- **RNA simple brin** (mosaïque du tabac, poliomyélite, grippe, herpès, variole)
- 2- **RNA double brin** en double hélice (rotavirus)

B-CARACTERISTIQUES GENERALES DU RNA

1- L'OSE : RIBOSE

2- BASES : A, C, G ET U A LA PLACE DE T.

3- APPARIEMENT DES BASES :

☑ **Figure 48** : En règle générale : ($G \equiv C$) et ($A = U$).

☑ Parfois ($G = U$) lorsque la tige d'appariement est assez long

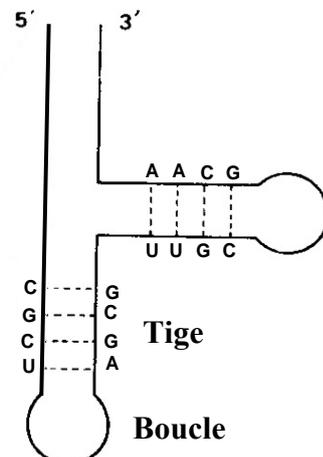
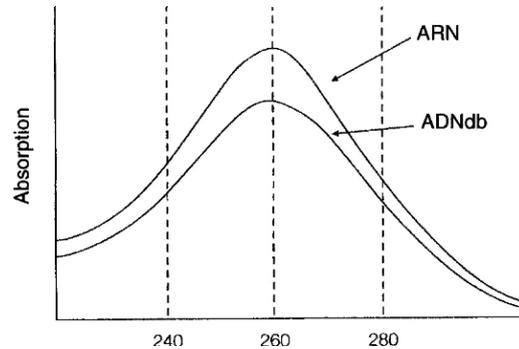


FIGURE 48

4- SPECTRE D'ABSORPTION, QUANTIFICATION :

- ☑ **Figure 49** : spectres d'absorption en UV de solutions de RNA monocaténaire et de DNA bicaténaire à une concentration égale.

FIGURE 49



C: concentration en RNA en $\mu\text{g/ml}$

A_{260} : absorbance à 260 nm sous un trajet optique de 1cm

A_{320} : absorbance à 320 nm sous un trajet optique de 1cm

$$C = 40 (A_{260} - A_{320})$$

5- EFFET DU pH ALACALIN :

- ☑ **Figure 50** : La présence du groupement 2'-OH dans le RNA entraîne, aux pH alcalins élevés, le **clivage** du squelette du RNA par une attaque intramoléculaire sur le phosphate de la liaison phosphodiester. Les produits sont un 5'OH libre et un phosphodiester cyclique 2'-3' qui est plus tard hydrolysé en monophosphate 2' ou 3'.

(Même en cas de pH neutre, les RNA sont plus susceptibles de s'hydrolyser que les DNA. Leur extraction et leur manipulation exigent beaucoup plus de précautions).

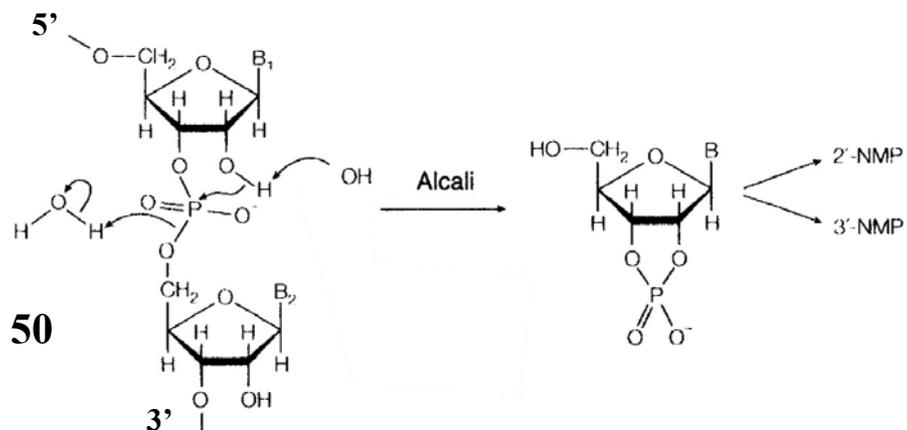
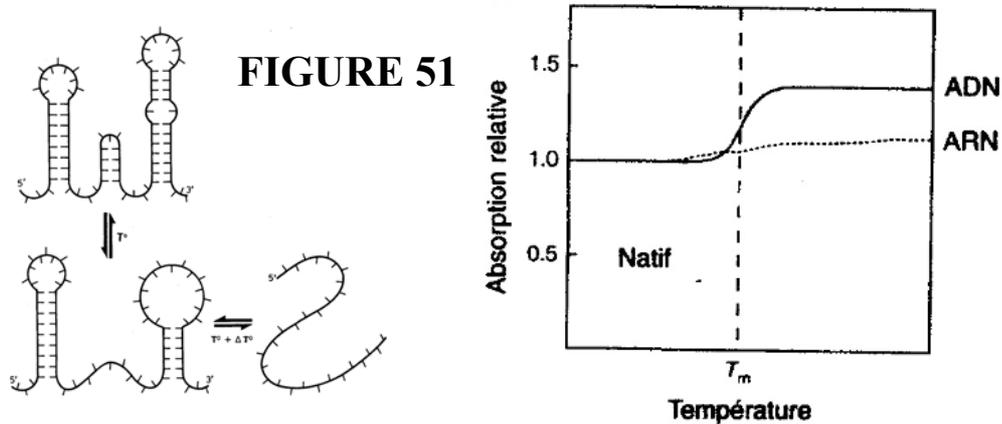


FIGURE 50

6-DENATURATION THERMIQUE :

- ☑ **Figure. 51 :** Si la température est élevée, l'absorption d'un échantillon de RNA augmente progressivement et irrégulièrement tant que l'empilement des bases dans les régions à double brin est réduit.



7-DIVERSITE ET SYNTHÈSE DES RNA

- ☑ Les RNA sont tous, à des degrés divers, impliqués dans la transmission de l'information entre le DNA et les protéines. A la différence du DNA dont il existe une variété restreinte de types (et parfois une seule molécule par cellule comme c'est le cas chez les procaryotes), il existe plusieurs types de RNA différant par leur taille, leur fonction et leur localisation cellulaire.
- ☑ **Figure 52 :** Les RNA cellulaires sont tous produits, dans le processus appelé **transcription**, par **complémentarité** à partir du DNA des gènes correspondants. L'enzyme responsable de la synthèse des RNA est une « **RNA polymérase DNA dépendante** ».

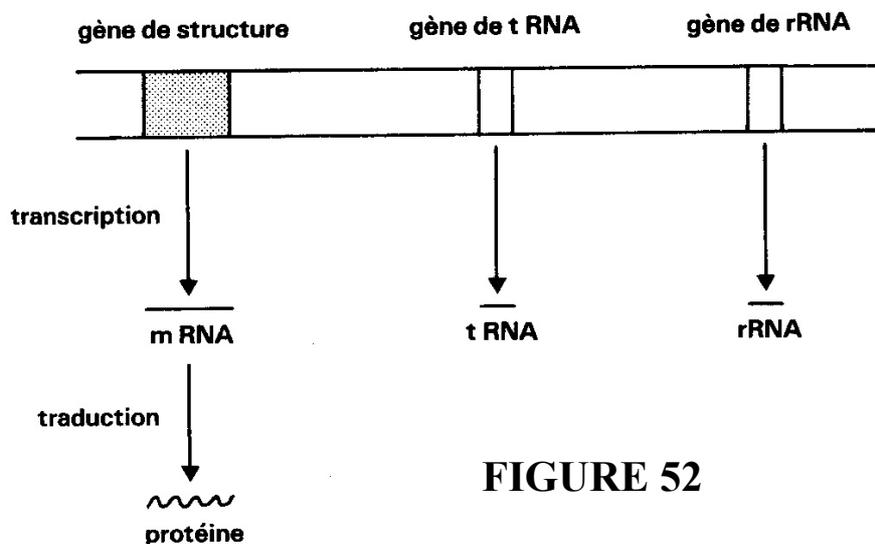


FIGURE 52

- ☑ Chez les procaryotes, E.coli par exemple, une seule RNA polymérase est responsable de la synthèse de tous les RNA.
- ☑ Chez les eucaryotes, trois **RNA polymérases (I, II et III)** transcrivent les différents jeux de gènes :

I) RNA polymérase I ⇔ rRNA (18S, 28S et 5,8S)

- ☑ Les **ribosomes** sont de petits **organites cellulaires** présents dans le cytoplasme et servant à la synthèse des protéines. Les mitochondries et les chloroplastes possèdent leurs propres ribosomes. Chaque ribosome est constitué de **deux sous unités** qualifiées de petite et de grande sous unités.
- ☑ Les ribosomes sont constitués par l'association de plusieurs molécules de rRNA et de nombreuses **r-protéines**. Les RNA ribosomiaux sont synthétisés sous la forme de grosses molécules monocaténares de RNA précurseurs qui sont ensuite remaniés et clivés en rRNA qui se combinent avec des protéines spécifiques pour former les ribosomes.

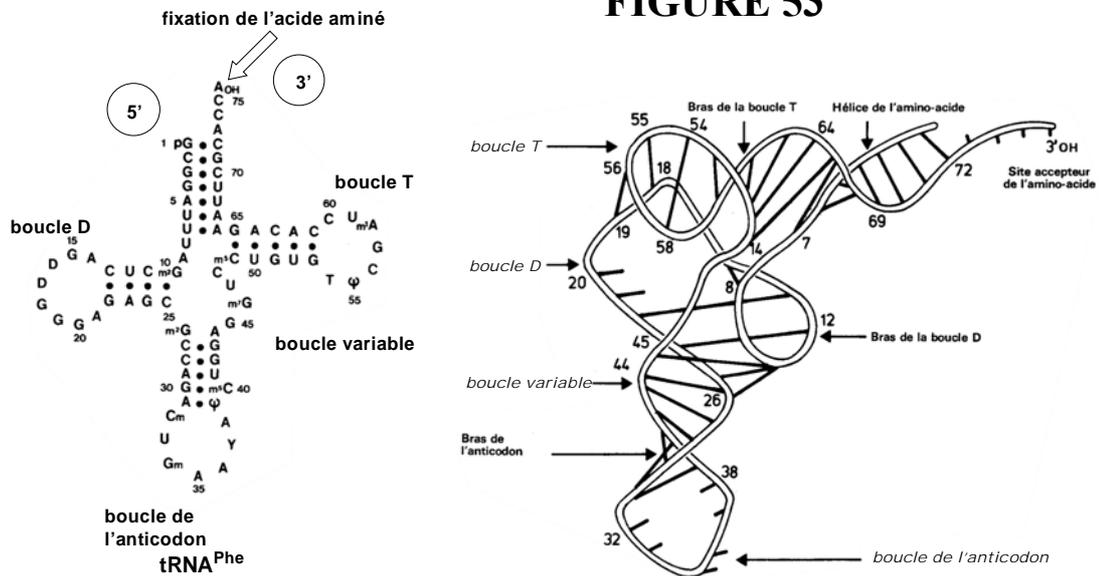
II) RNA polymérase II ⇔ pré-mRNA et certains snRNA (U1, U2...)

- ☑ Comme tous les autres RNA cellulaires, les mRNA sont formés d'une seule chaîne de ribonucléotides. Cette chaîne est ensuite utilisée pour diriger l'incorporation des acides aminés au cours du processus de **synthèse protéique** ou **traduction**.
- ☑ Le mRNA fait ainsi passer le message contenu dans le DNA du gène par des **codons** dont chacun est constitué par la séquence de trois bases déterminées dans le **code génétique**.

III) RNA polymérase III ⇔ tRNA, rRNA 5S et snRNA U6

- ☑ Les tRNA sont ainsi appelés car ils vont transférer, véhiculer, les acides aminés qui se trouvent dans le cytoplasme jusqu'au ribosome, lieu de synthèse protéique.
- ☑ **Figure 53** : La séquence en bases des tRNA fait apparaître la possibilité de complémentarité de bases dans 4 zones différentes, de telle sorte qu'on reconstruit artificiellement la séquence des tRNA selon une forme de croix ou de **feuille detreñfle** (**figure 53** : exemple de tRNA spécifique de la phénylalanine).
- ☑ Les tRNA sont de petite taille (**70 à 100 nucléotides**).

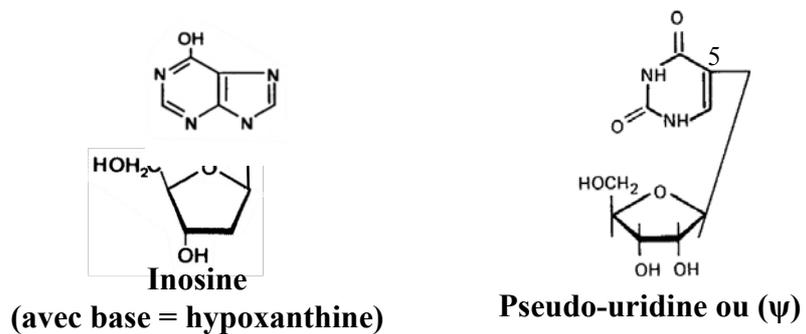
- ☑ **Figure 53** : En fait, la structure secondaire en trèfle des tRNA se replie sur elle-même dans l'espace pour donner une structure tridimensionnelle en forme de L. Cette structure est maintenue par des liaisons hydrogènes établies entre les bases non appariées des boucles et par les OH 2' des riboses.



- ☑ L'anticodon est formé de trois bases complémentaires de celles du codon porté par le mRNA. Lors de la synthèse protéique, le tRNA-aa viendra s'adapter exactement sur le codon correspondant grâce à cette complémentarité.

- ☑ **Figure 54** : Les tRNA contiennent des **bases atypiques**, inhabituelles qui ne sont d'ailleurs pas incorporées telles quelles au moment de la synthèse (transcription) des tRNA. Elles sont formées secondairement par modification post-transcriptionnelle : (**thymine**/TMP, **hypoxanthine**/IMP et **pseudo-uridine**/ψMP).

FIGURE 54



STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES
CHAPITRE 6
INTRODUCTION AUX TECHNIQUES
D'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES

A- ENDONUCLEASE DE RESTRICTION

- ☑ **Définition :** Les **endonucléases de restriction** sont de véritables enzymes-outils pour couper le DNA au laboratoire. La coupure se fait en un **site de restriction** particulier (en général 4 à 8 paires de bases), reconnu **spécifiquement** par l'enzyme.
- ☑ ► Il existe plus d'une centaine d'enzymes de restriction. Ils sont isolés de microorganismes, bactéries le plus souvent. En effet, les bactéries peuvent être parasitées par des virus à DNA. Pour se défendre, les bactéries synthétisent des enzymes de restriction qui coupent le DNA viral étranger. Ces microorganismes ont développé en parallèle un système enzymatique spécifique afin que leur propre DNA ne soit pas hydrolysé (des **méthylases** spécifiques qui reconnaissent et méthylent les bases **C** ou **A** des sites concernés). Les sites sont méthylés de telle manière qu'ils ne soient plus reconnus par l'enzyme de restriction correspondante.
- ☑ Les sites de restriction sont des **palindromes** où la même séquence nucléotidique se lit sur le brin complémentaire dans le sens complémentaire 5' vers 3'.
- ☑ **Figure55 :** Les extrémités obtenues après coupure d'un DNA par une endonucléase de restriction peuvent être de deux sortes :

1) **bouts cohésifs** ou 2) **bouts francs.**

Les extrémités cohésives peuvent présenter un surplomb 5' ou bien 3'.

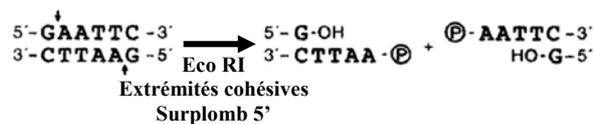
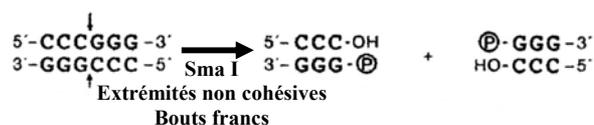
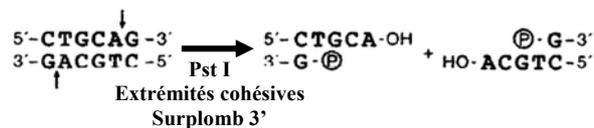


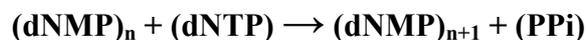
FIGURE 55



- ☑ Une **carte de restriction** d'une molécule de DNA est une représentation précise, indiquant les **positions** des sites de restriction et la **taille** des fragments séparant ces mêmes sites. La carte peut être linéaire ou circulaire en fonction de la nature de la molécule étudiée. Elle peut montrer les positions des sites d'un seul ou de plusieurs enzymes de restriction.

B- SYNTHÈSE D'UNE SÉQUENCE NUCLEOTIDIQUE

- ☑ La copie enzymatique d'une chaîne d'acide nucléique, qu'il s'agisse de synthétiser une chaîne de DNA ou de RNA, s'effectue toujours de manière complémentaire et antiparallèle. L'addition des nouveaux nucléotides se faisant toujours dans le sens 5' phosphate vers le 3' OH. Elle nécessite la présence de nucléotides triphosphates (NTP) ou de désoxynucléotides triphosphates (dNTP).
- ☑ **Figure 56 : Exemple d'enzymes recopiant un DNA en DNA** : Ce sont des **DNA polymérase DNA dépendantes**. Elles ne sont pas capables de synthétiser le brin nouveau de DNA sans la présence d'une séquence de **DNA matrice**, d'une **amorce** d'acides nucléiques. L'amorce doit également posséder une **extrémité 3'OH libre**. Ils catalysent la réaction générale suivante :



Avec (N = A, C, T ou G) et (PPi = groupe pyrophosphate).

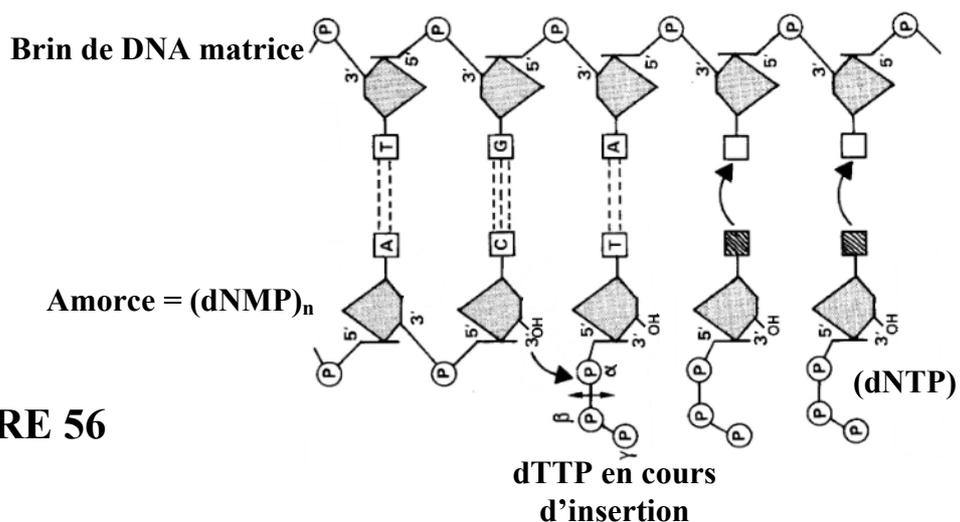


FIGURE 56

- ☑ 3 Exemples d'enzymes :
 - ▣ DNA polymérase I de E. coli.
 - ▣ Taq polymérase.
 - ▣ Rétrotranscriptase

1- APPLICATION N°1 : CONFECTION D'UNE SONDÉ

- ☑ Une sonde est une chaîne nucléotidique marquée. On distingue le marquage dit « **chaud** » utilisant des **isotopes radioactifs** (phosphore 32 ou ^{32}P , Soufre 35 ou ^{35}S) et les marquages dits « **froids** » qui utilisent des molécules aux propriétés **colorimétriques** (exemple : biotine / streptavidine – peroxydase), fluorescentes (fixation de fluorochromes) ou chimio-luminescentes.
- ☑ On distingue plusieurs méthodes selon la localisation du marquage (extrémités ou interne à la molécule) et selon la nature de la séquence marquée (simple ou double brin).
- ☑ **Figure 57 : Marquage au hasard ou 'random printing'** : Très employé dans les laboratoires, il permet d'obtenir des activités spécifiques élevées.

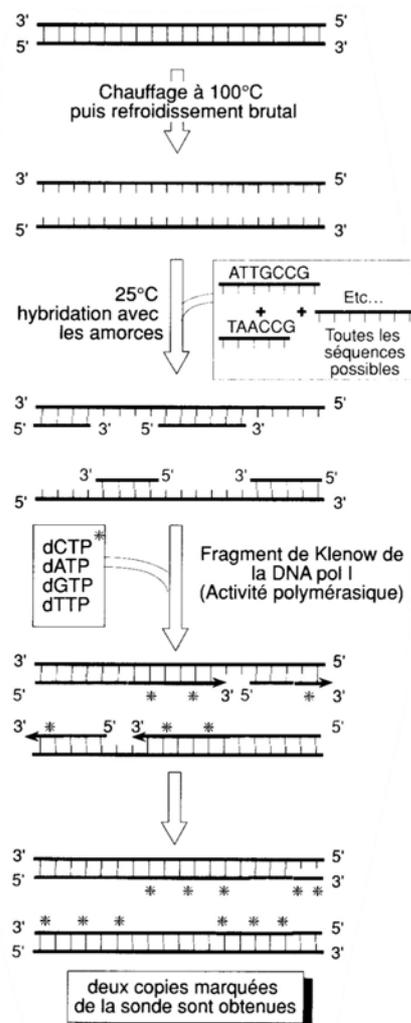
FIGURE 57

► Les deux brins du DNA de la sonde sont préalablement séparés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal.

► On ajoute ensuite un mélange d'oligonucléotides (hexanucléotides de synthèse) correspondant à toutes les combinaisons statistiquement possibles (soit $4^6 = 4096$).

► Ces oligonucléotides vont s'hybrider de façon aléatoire sur la séquence matrice.

► Ils vont ensuite, en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués, servir d'amorces au fragment de Klenow pour reconstituer l'intégrité des deux fragments.

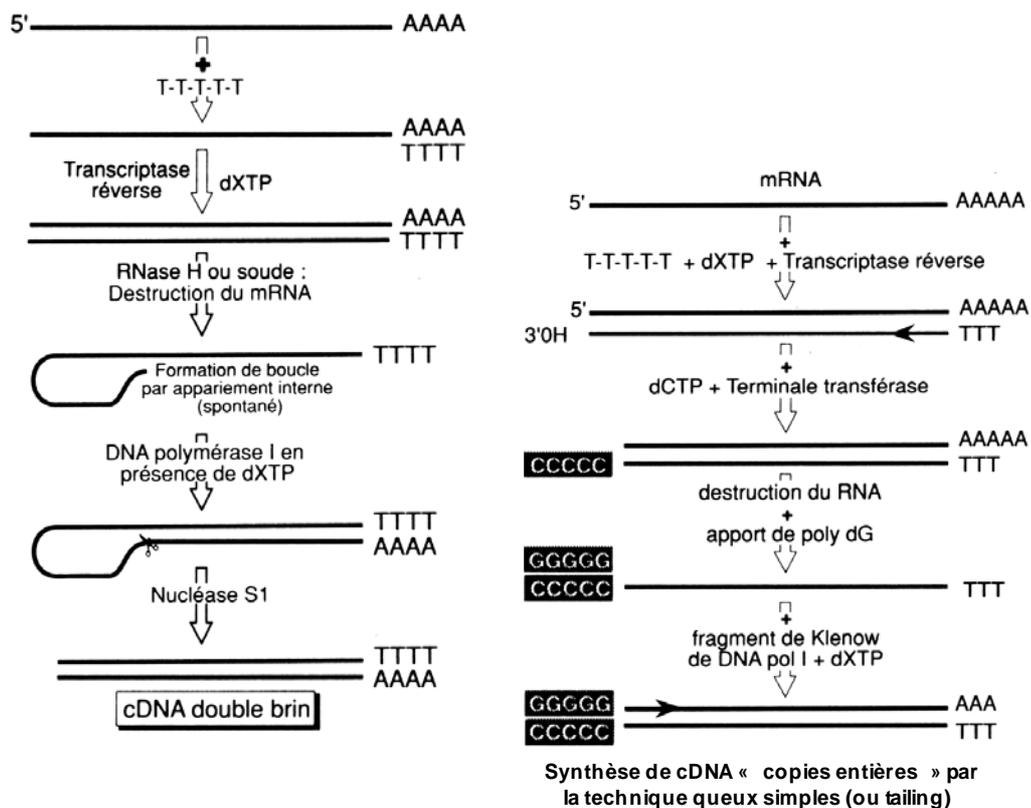


2- APPLICATION N° 2 : CONFECTION D'UN cDNA

- ☑ La **rétrotranscriptase** (RT) ou **transcriptase inverse** est surtout présente dans les rétrovirus (virus à RNA). Elle permet de fabriquer un **cDNA** (DNA complémentaire) à partir d'un RNA. C'est donc une DNA polymérase RNA dépendante.

- ☑ **Figure 58** : La technique classique pour préparer un cDNA à partir d'un mRNA consiste à fournir une amorce à la RT. Cette amorce peut être une séquence oligo(dT) capable de s'hybrider avec l'extrémité poly(A) du mRNA. A partir de cette amorce, la RT synthétise un DNA complémentaire au mRNA. De plus, à la fin de la copie, le mRNA étant détruit (RNase H ou traitement alcalin), elle provoque le retournement de l'extrémité 3' du DNA copié et elle peut ainsi recopier son propre travail en créant une épingle à cheveu de 10 à 20 pb. C'est ensuite une DNA polymérase DNA dépendante qui est ajoutée pour réaliser une copie du DNA simple brin en DNA double brin. La nucléase S1 peut ensuite éliminer l'extrémité de l'épingle à cheveu. D'autres techniques existent pour préparer du cDNA (copie entière) à partir du mRNA : voir **Figure 58**.

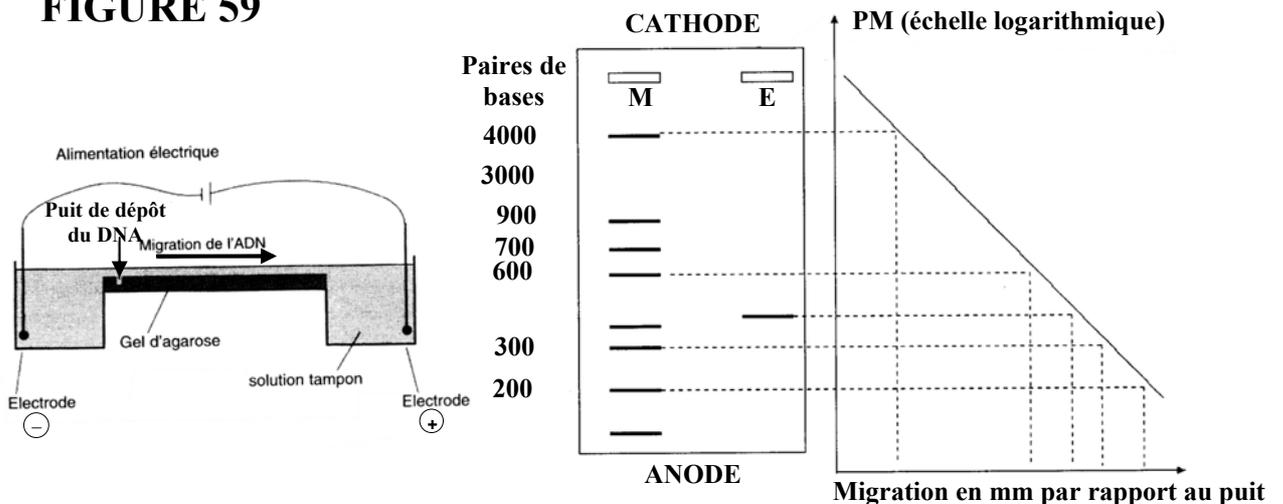
FIGURE 58



C- ELECTROPHORESE

- ☑ C'est une technique qui permet de séparer des molécules chargées en fonction de leur taille, leur forme et leur charge. En utilisant un courant électrique continu dans un milieu gélifié (gels d'**agarose** ou de **polyacrylamide** essentiellement), on peut ainsi séparer, analyser et purifier des molécules chargées tels que les protéines, les DNA et les RNA.
- ☑ Lorsqu'un champ électrique est appliqué au gel en présence d'une solution tampon conduisant l'électricité, les fragments de DNA migreront vers l'électrode positive (Le DNA est hautement chargé négativement) à une vitesse qui dépend principalement de sa taille et accessoirement de sa forme (linéaire / circulaire, relâchée / surenroulée).
- ☑ Les petits fragments se déplaceront plus rapidement que les gros fragments qui sont retardés par l'emmêlement avec le réseau des fibres formant le gel.
- ☑ **Figure 59** : La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse est effectuée en faisant migrer des **marqueurs de poids moléculaire** (M) en parallèle avec l'échantillon à analyser (E).

FIGURE 59



- ☑ La détection des acides nucléiques sur ce type de gel est généralement réalisée par exposition aux **rayons UV** après coloration avec du **bromure d'éthidium**.
- ☑ L'électrophorèse peut être réalisée dans des conditions **non dénaturantes** dans le cas où l'analyse concerne du DNA double brin (fragments de restriction par exemple, fragments de DNA amplifiés par **PCR**) ou bien d'autres acides nucléiques analysés dans leur **état natif**.
- ☑ Elle peut également être menée dans des conditions **dénaturantes** (en présence d'urée par exemple) lorsque l'expérience nécessite le maintien des acides nucléiques sous forme de simple brin (RNA, produits des réactions de séquençage).

D- TRANSFERT SUR MEMBRANE – HYBRIDATION

- ☑ Après séparation par électrophorèse et visualisation, les acides nucléiques peuvent être prélevés et purifiés en découpant la bande de gel qui les contient : « **élution** ».
- ☑ **Figure 60** : L'ensemble du gel peut également être soumis à un traitement adéquat et les acides nucléiques séparés sur le gel sont **dénaturés** et peuvent alors être **transférés** et fixés sur une membrane de **nitrocellulose** ou de **nylon**. Les acides nucléiques fixés peuvent par la suite s'hybrider avec une sonde marquée s'ils possèdent en commun une séquence nucléotidique homologue : expériences de type « **Southern** » ou « **Northern** ».

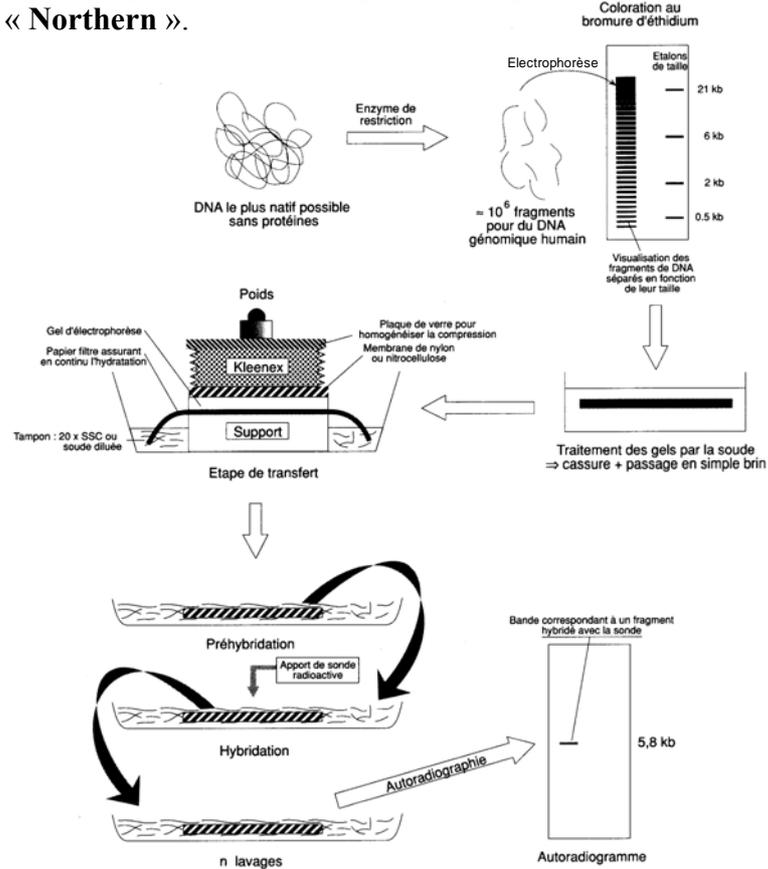
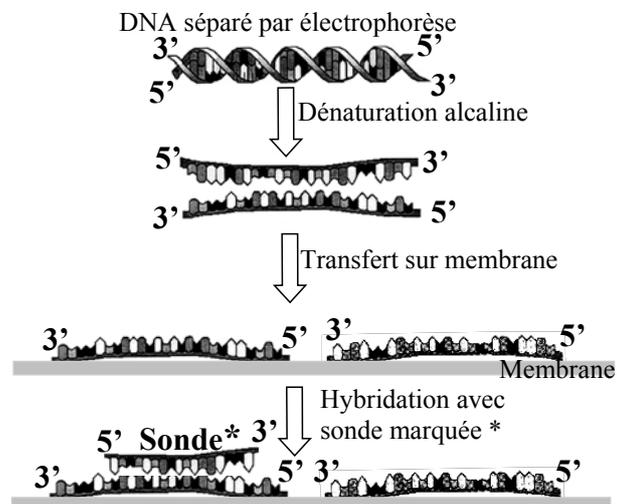


FIGURE 60

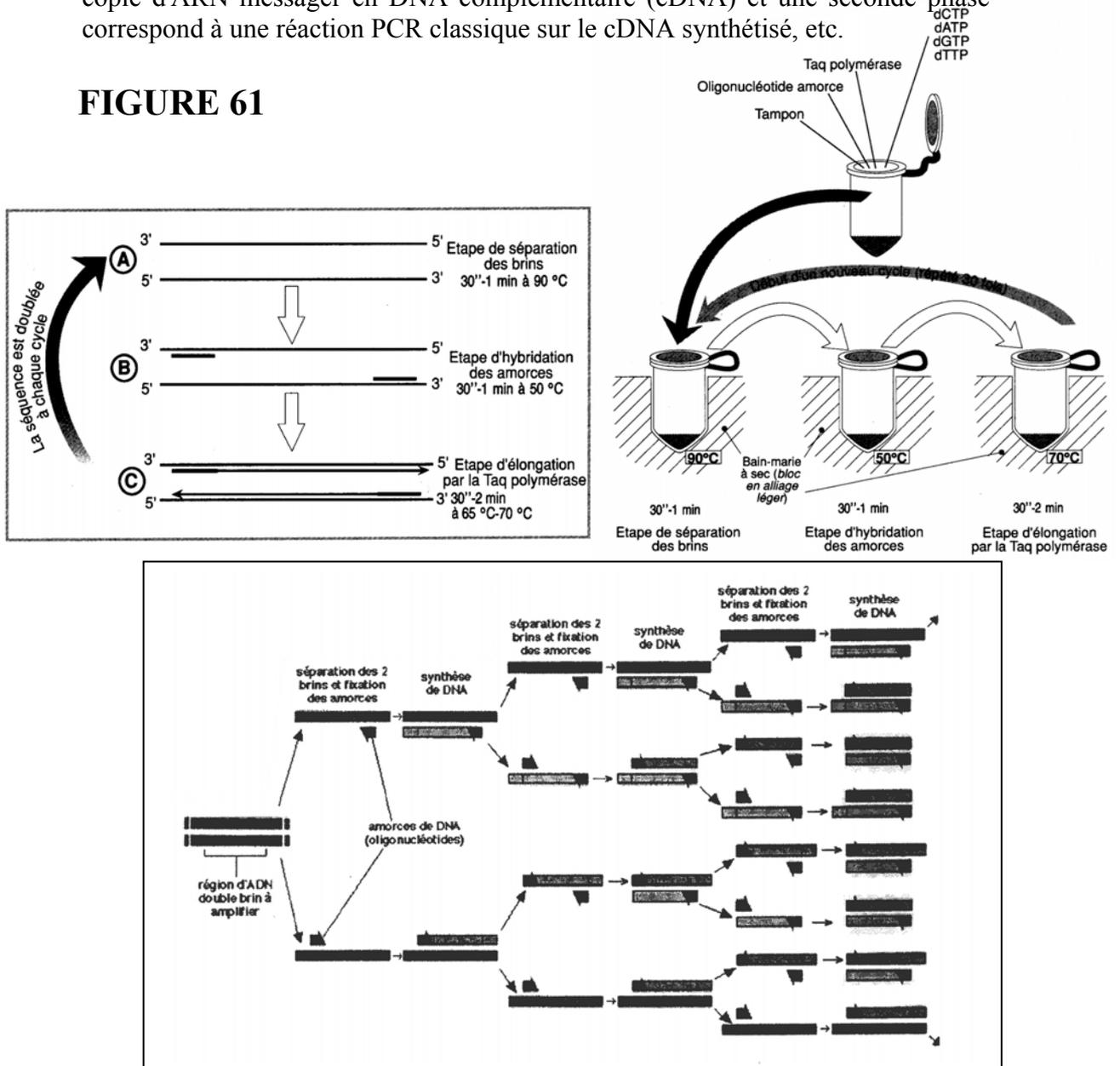
Réalisation de l'expérience de 'Southern'



E- PCR et RT-PCR

- ☑ Les différentes étapes de cette technique sont décrites sur la **Figure 61**. La PCR (**Polymerase Chain Reaction**) nécessite très peu de DNA au départ de la réaction (environ 20 ng). Elle permet d'amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un ou plusieurs segments du DNA analysé. Ces segments se situent entre deux amorces oligonucléotidiques (longs de 20 à 30 nucléotides) servant de point de départ pour la synthèse de DNA.
- ☑ De façon théorique, en partant de deux brins de DNA complémentaires initiaux, on obtient 4 segments d'ADN à la fin du premier cycle, 8 à la fin du second, 16 à la fin du troisième et jusqu'à 2 à la puissance n après n cycles ...etc. soit plus d'un million de copies en une vingtaine de cycles (**Figure 61**).
- ☑ La **RT-PCR** : Se déroule en deux phases : Une première phase correspond à la copie d'ARN messager en DNA complémentaire (cDNA) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur le cDNA synthétisé, etc.

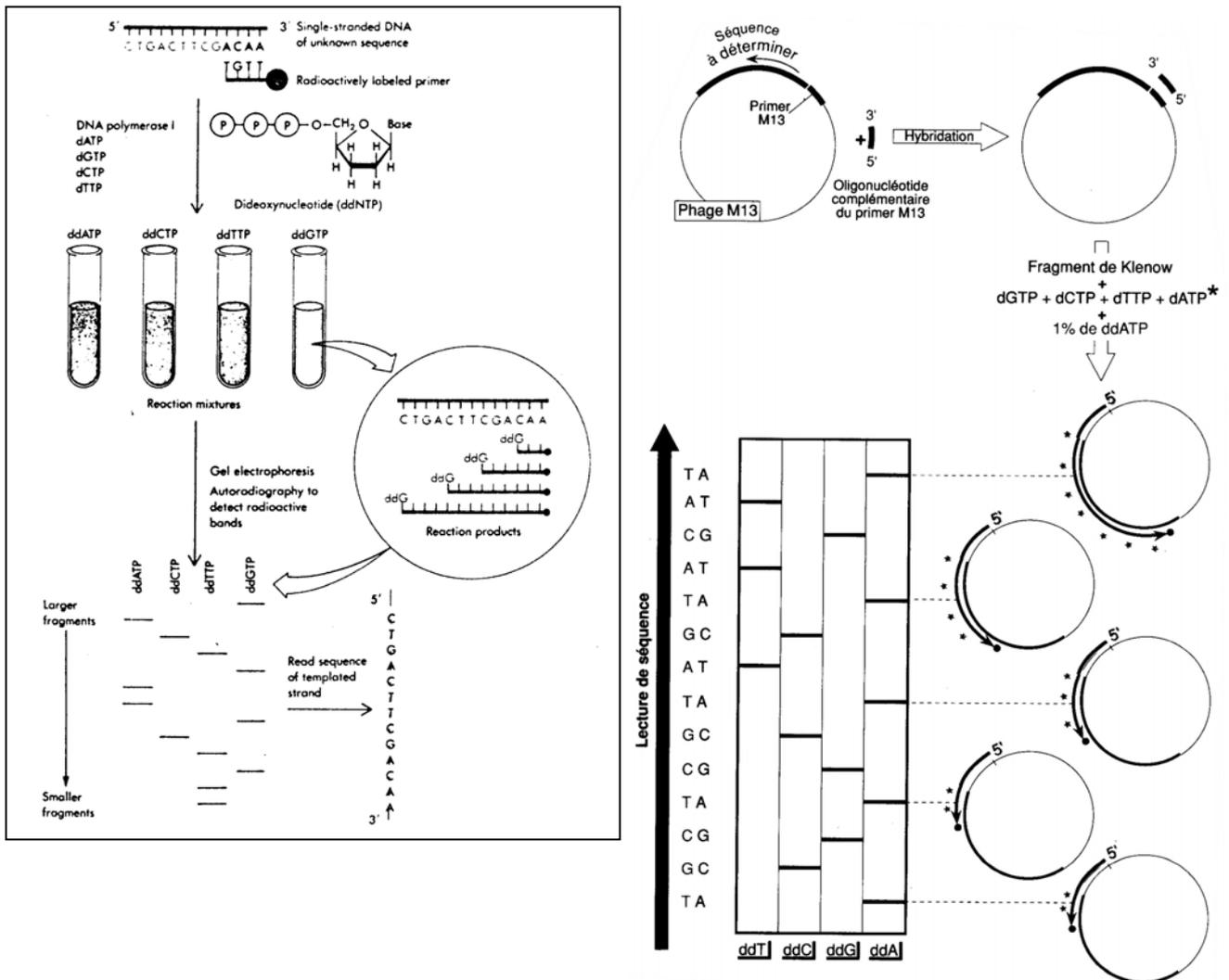
FIGURE 61



F- SEQUENÇAGE « METHODE DE SANGER »

Il existe essentiellement deux méthodes de séquençage du DNA (Une méthode chimique 'Maxam et Gilbert' ou enzymatique 'Sanger'). Les deux techniques impliquent la production d'un ensemble de molécules de tailles séquentiellement différentes ayant toutes la même extrémité. Ces molécules sont ensuite séparées par électrophorèse (PAGE) en conditions dénaturantes pour la lecture de la séquence. Pour une séquence nucléotidique donnée, 4 réactions différentes sont réalisées et analysées simultanément.

FIGURE 62
METHODE ENZYMATIQUE : 'SANGER'



Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

