Chapitre 4:
Les Acides Nucléiques

SOMMAIRE

- Les glucides
- Les lipides
- Les protéine
- Les acides nucléiques

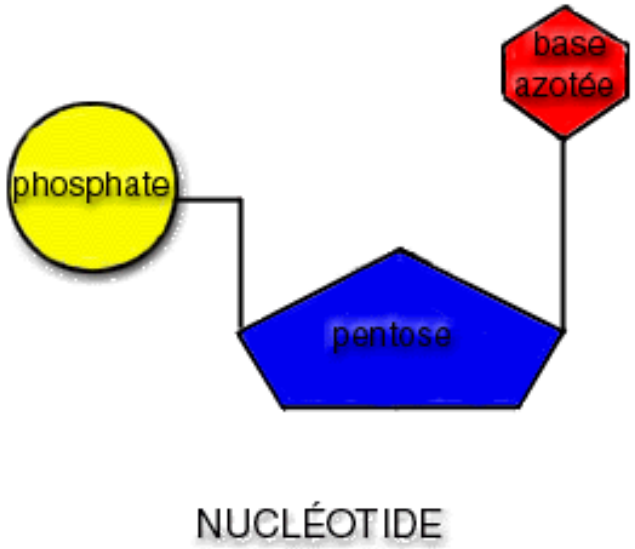
LES ACIDES NUCLÉIQUES

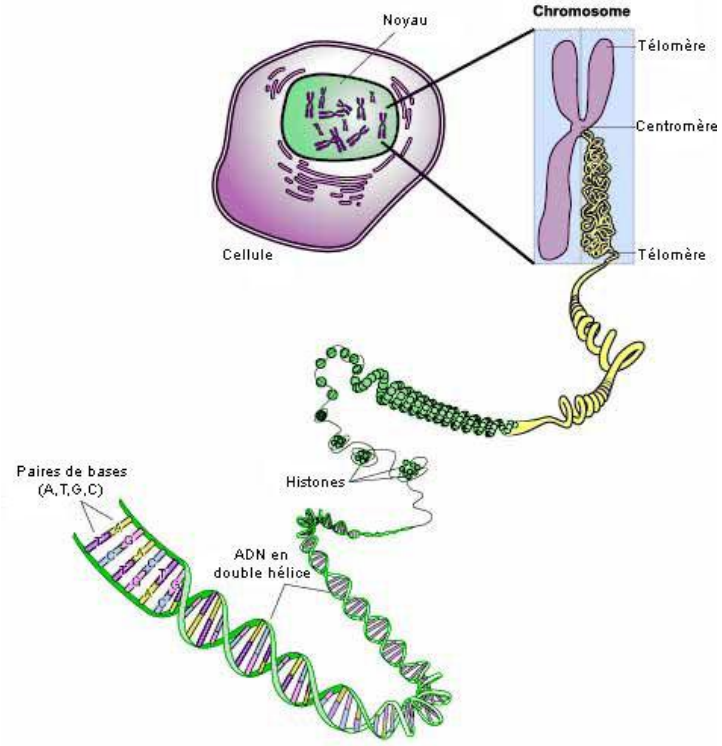
- Introduction
- Organisation structurale
- Comparaison ADN-ARN
- Propriétés physico-chimiques

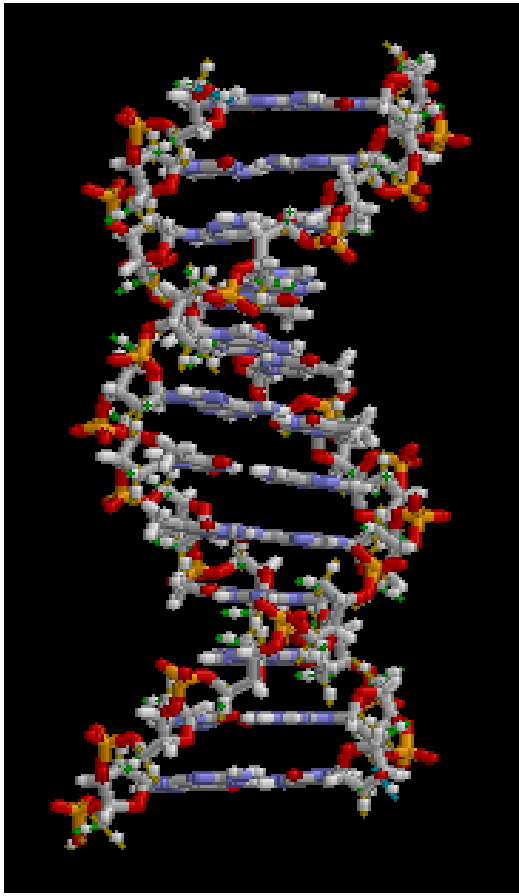
Introduction

Le génome est l'ensemble du matériel génétique contenu dans une cellule. Il est représenté par une longue molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) logée dans le noyau de chaque cellule.

Au niveau moléculaire, l'ADN est un polynucléotide (un polymère de nucléotides). Les acides ribonucléiques (ARN) sont des partenaires de l'ADN dans les processus de transfert d'information génétique. ADN et ARN sont désignés de manière générique par le terme ***acides nucléiques***.







Différents niveaux d'organisation de l'ADN

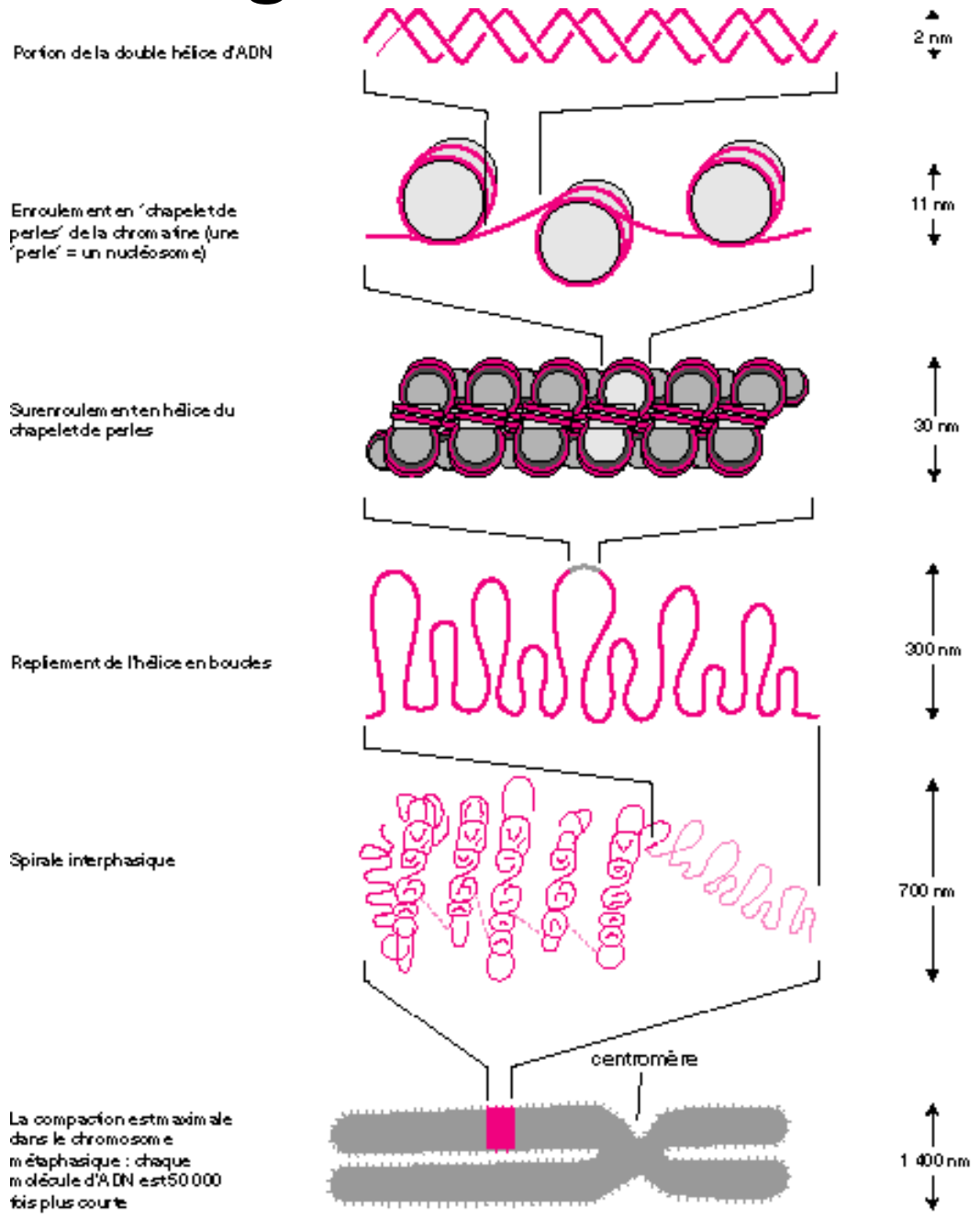
ADN double brin

Nucléosome

Fibre de chromatine

Section d'un chromosome en métaphase

Chromosome entier

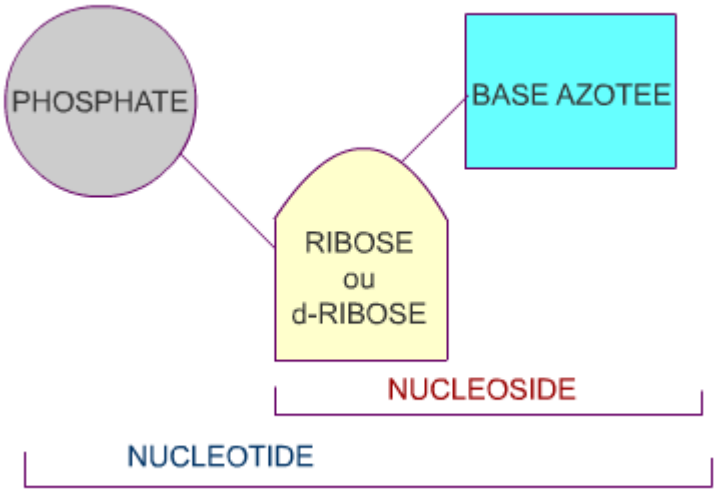


LES ACIDE NUCLÉIQUE

- Introduction
- Organisation structurale
- Comparaison ADN-ARN
- Propriétés physico-chimiques

Nucléosides et nucléotides

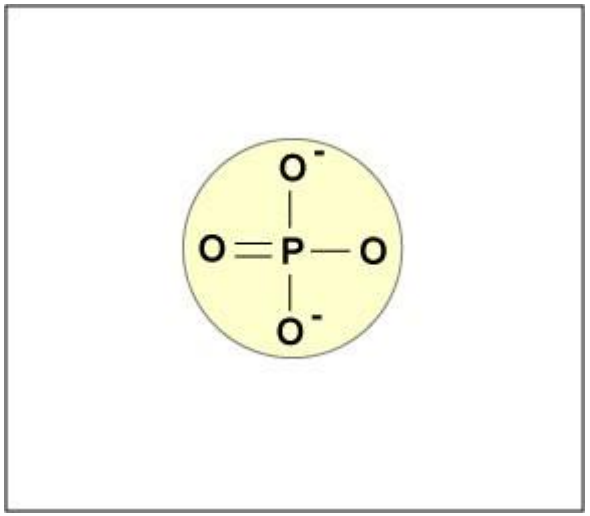
Un **nucléoside** est une molécule formée soit d'un ribose soit d'un désoxy-ribose avec soit une base purique soit une base pyrimidique.
La liaison se fait entre le carbone c1' du pentose (ribose ou désoxy-ribose) et l'azote n9 de la base purique ou n1 de la base pyrimidique.
Le pentose est sous la forme furanose et la liaison osidique est sous la forme β.



Un **nucléotide** (ou nucléoside-monophosphate) est un nucléoside avec un phosphate sur le carbone c5' du pentose, on parle aussi d'ester phosphorique de nucléosides.

L’acide phosphorique : H_3PO^4

L’**acide phosphorique** est un triacide dont une fonction acide est dissociée permettant de donner une charge négative à l’ADN, et dont les deux autres peuvent former des liaisons phosphodiester



pK		équation chimique
pK1	2,1	$H_3PO_4 = H_2PO_4^- + H^+$
pK2	7,2	$H_2PO_4^- = HPO_4^{2-} + H^+$
pK3	**12**	$HPO_4^{2-} = PO_4^{3-} + H^+$

Les dimères et trimères de l'acide phosphorique interviennent dans de nombreux domaines en biologie comme les **transporteurs d'énergie ADP/ATP**, l'ADN et dans les os.

Le pentose

Il diffère selon la catégorie des acides nucléiques :

- le b-D-ribose pour les ARN
- le b-D-2 désoxyribose pour les ADN

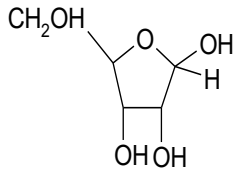
Leurs caractéristiques de configuration :

Série énantiomérique : D

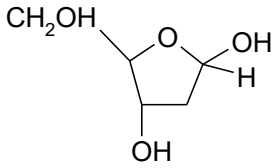
- Cyclisation hémiacétalique : furanose
- Anomérie : b

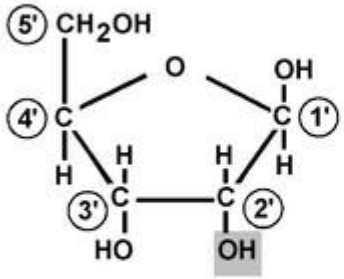
Numérotation des carbones de 1' à 5'.

Formule du β-D-ribofuranose

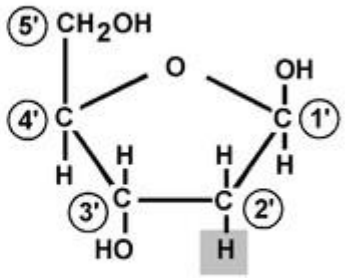


Formule du β-D-2-désoxyribofuranose





Pentose présent dans l'ARN : le ribose



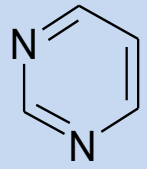
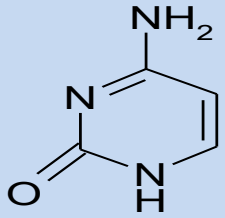
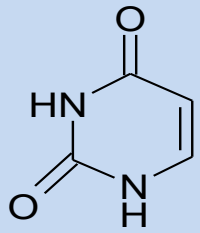
Pentose présent dans l'ADN : le désoxyribose

Les bases azotées

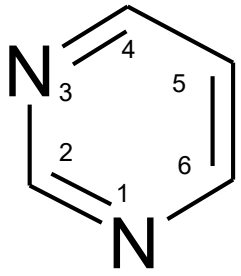
Ce sont des dérivés oxygénés, aminés ou méthylés d'hétérocycles azotés à caractère basique.
Elles dérivent de 2 types d'hétérocycles :

Les bases pyrimidiques

Dérivées de la pyrimidine :

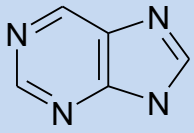
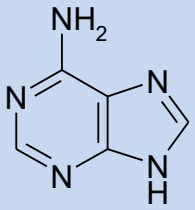
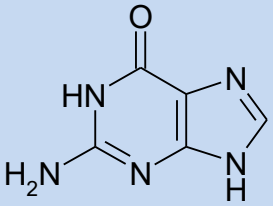
			
pyrimidine	cytosine	uracile	**thymine**
	2-oxy-4-aminopyrimidine	**2,4dioxypyrimidine**	**5-méthyl-2,4dioxypyrimidine**

Numérotation de 1 à 6 des atomes.

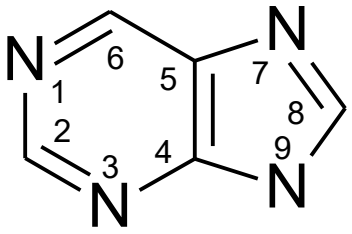


Les bases *puriques*

Dérivées de la purine :

		
purine	adénine	**guanine**
imidazopyrimidine	**6-aminopurine**	**2-amino-6oxypurine**

Numérotation de 1 à 9 des atomes.



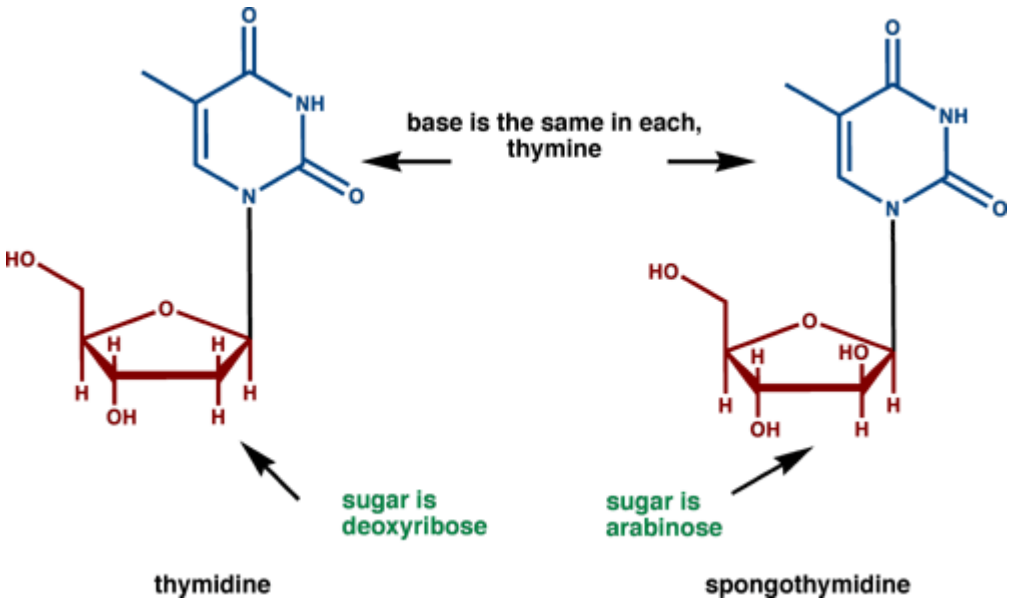
Les produits de condensation de ces constituants

Les nucléosides

Ce sont des hétérosides azotés résultant de l'union d'une base avec un pentose
Cette liaison : de type N-osidique entre :
Le OH hémiacétalique du pentose porté par le C_1,

Le groupement NH de l'hétérocycle de la base soit : N_9 pour les bases puriques
N_1 pour les bases pyrimidiques avec élimination d'une molécule d'eau

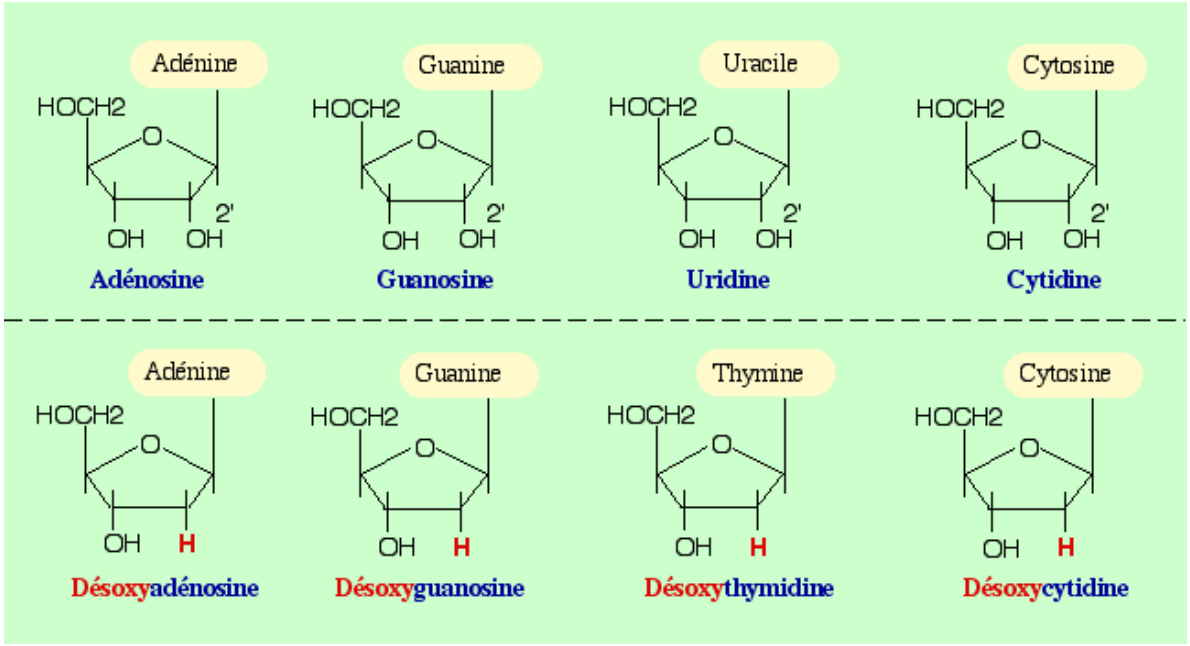
Base + Pentose = Nucléoside + Eau



Nomenclature :

Chaque nucléoside est désigné par un nom commun à terminaison variable avec la base.

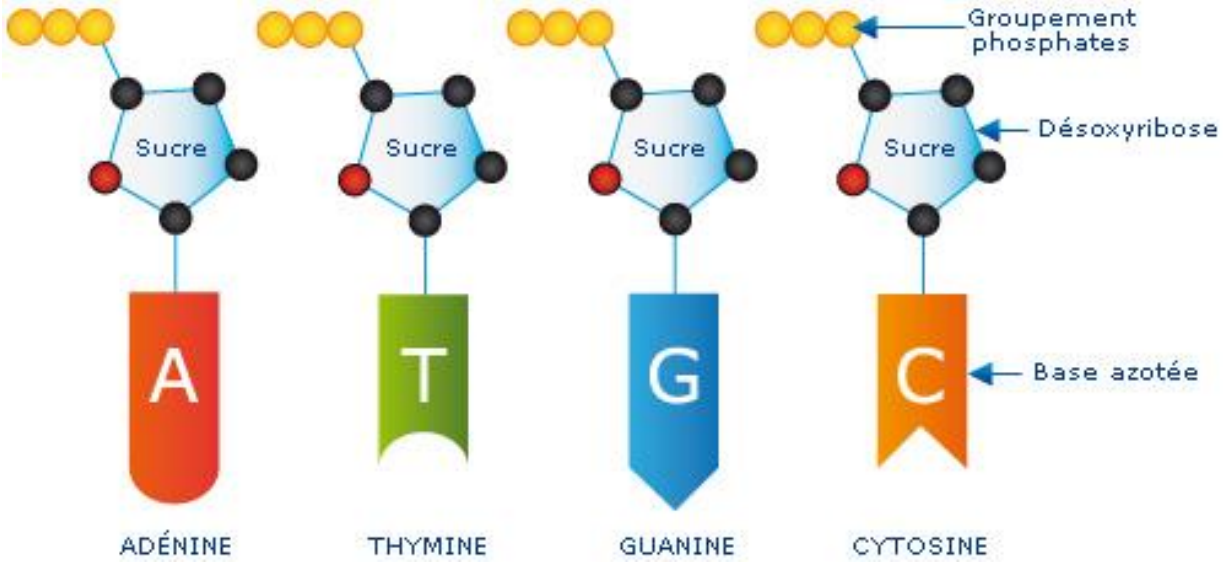
Type de base	Suffixe
purique	osine
pyrimidique	idine



Les nucléotides

Ce sont des **esters phosphoriques de nucléosides**.

Acide phosphorique + Pentose + Base azotée

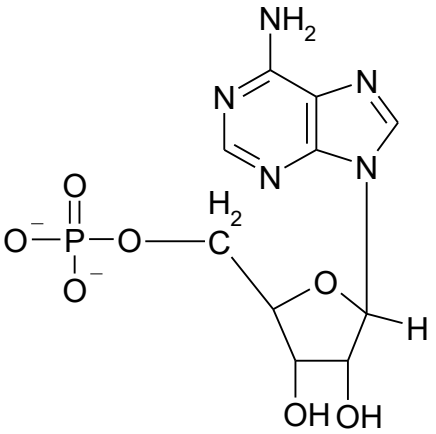
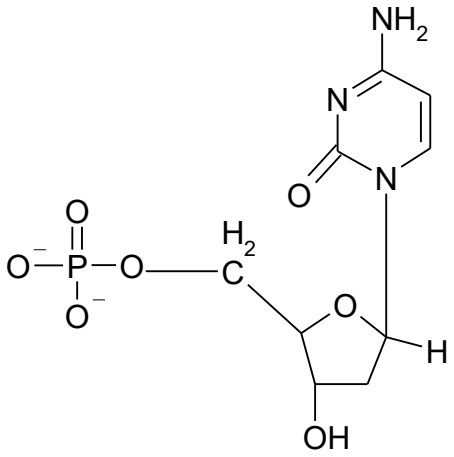


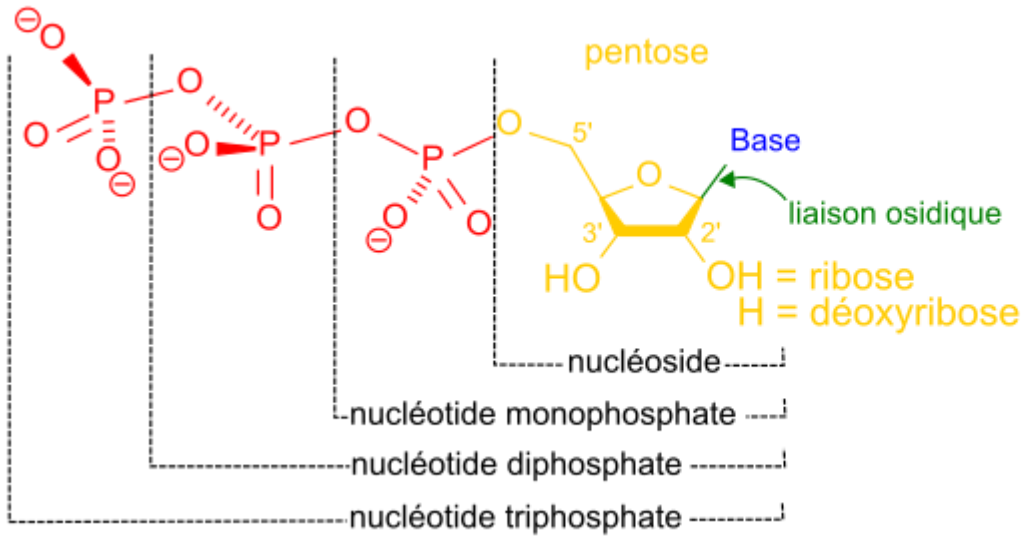
Les mononucléotides

Ce sont les monomères des acides nucléiques.

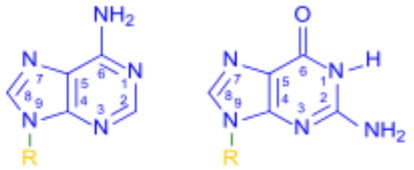
= **Esters de la fonction alcool du C_5, de l'ose**, appelés « esters 5'phosphates », selon :

Exemples :

dénosine-5'-monophosphate = AMP	Désoxycytidine-5'-monophosphate
	

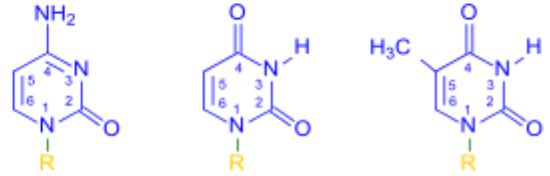


Purines



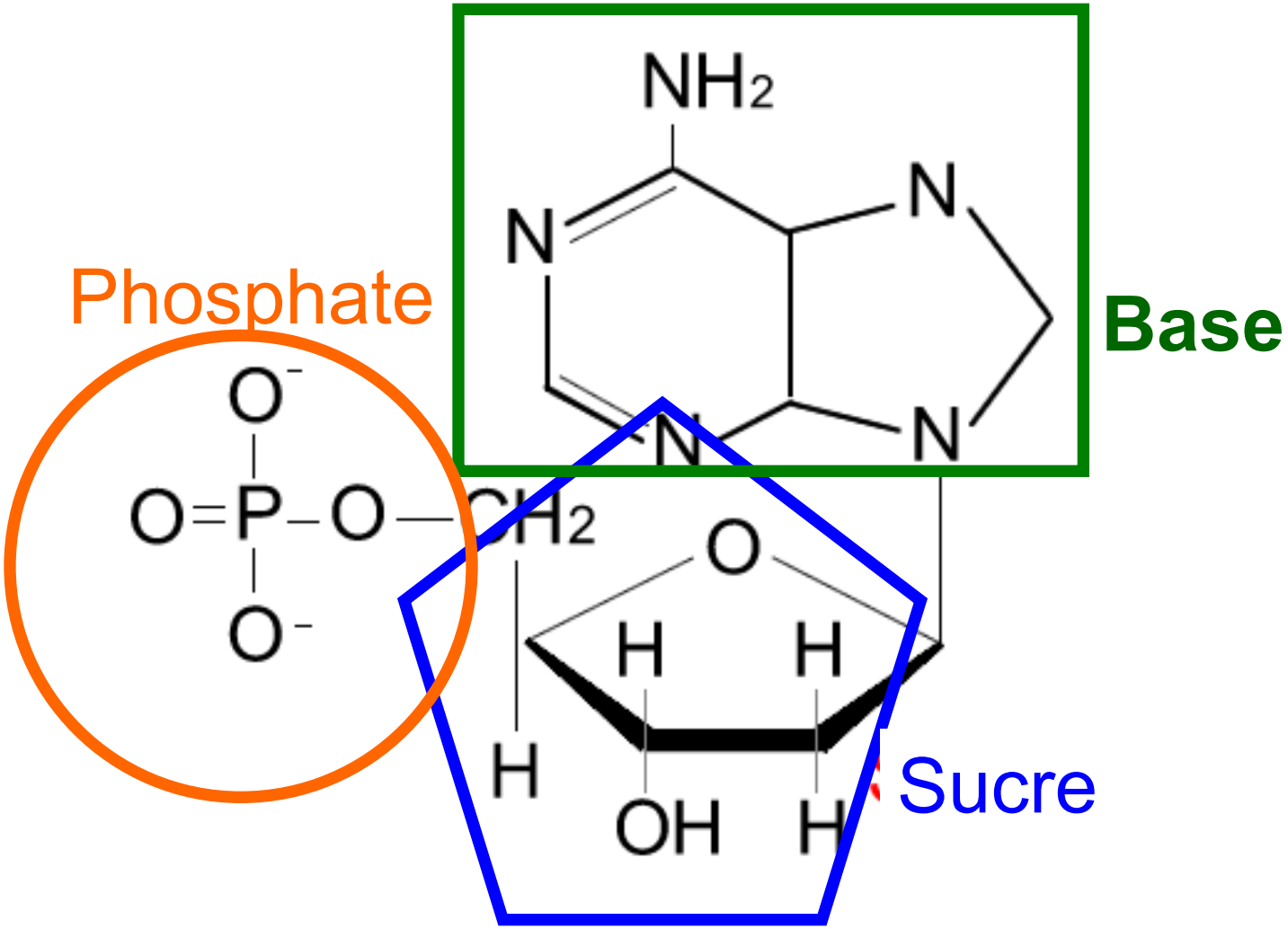
Adénine Guanine

Pyrimidines



Cytosine Uracile Thymine

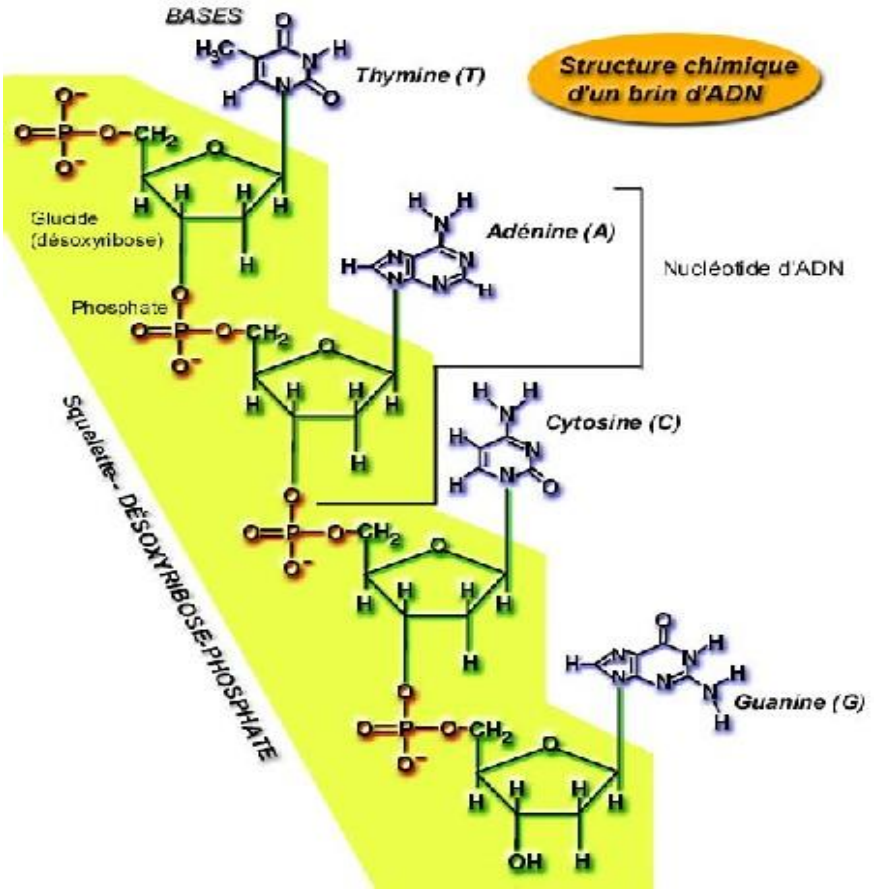
Nucléotide



Les polynucléotides

Ils sont formés de l'enchaînement de nucléosides 5'monophosphates reliés entre eux par des liaisons 3'-5' phosphodiester . Sont mis en jeu :

- **la fonction alcool 3' de l'un**
- la fonction acide phosphorique situé sur l'alcool 5' de l'autre



Il se forme alors un enchaînement de type 5'-3'-5'-3'-… conduisant à des dinucléotides, trinucléotides, …, oligonucléotides,…puis des polynucléotides.

Il se forme ainsi des chaînes polynucléotidiques dont le squelette est une alternance de riboses (ou désoxyribose) et phosphates reliés par des liaisons phosphodiester.

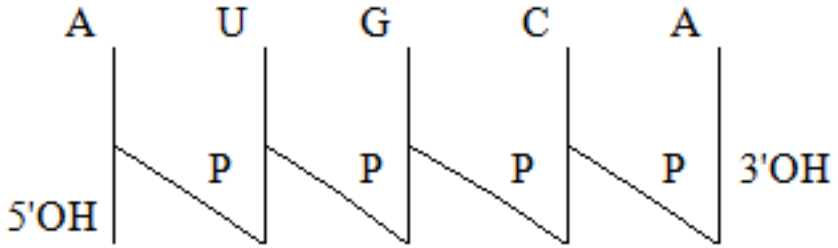
Les bases ne participent pas à cet enchaînement et sont rejetées vers l'extérieur.

La molécule est orientée de 5' vers 3' par rapport au pentose.

Orientation Des Acides Nucléiques

ADN est fait de 2 chaînes ("ADN duplex") ou brins hélicoïdaux dextrogyres (comme un pas de vis), s' enroulant autour d' un axe pour former une double hélice de 20A° diamètre. Les 2 brins sont antiparallèles: leurs orientations 5'->3' sont de direction opposée. L' apparence générale du polymère montre une périodicité de 3.4 A° correspondant à la distance entre 2 bases, et une autre de 34 A° correspondant à 1 tour d' hélice (et à 10 paires de bases).

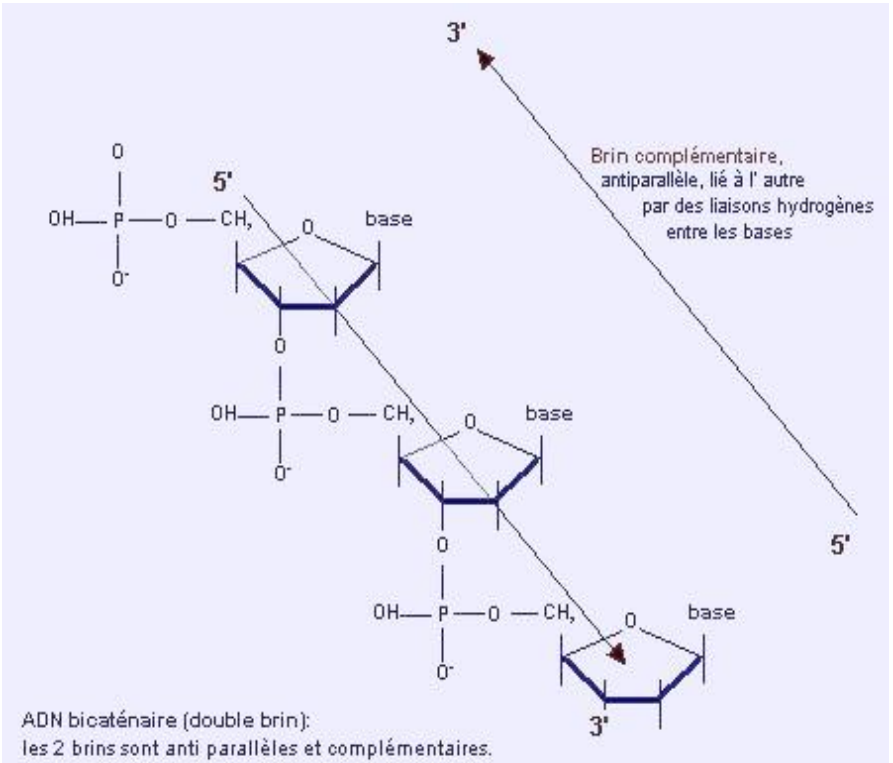
La séquence s'écrit toujours de 5' vers 3'.

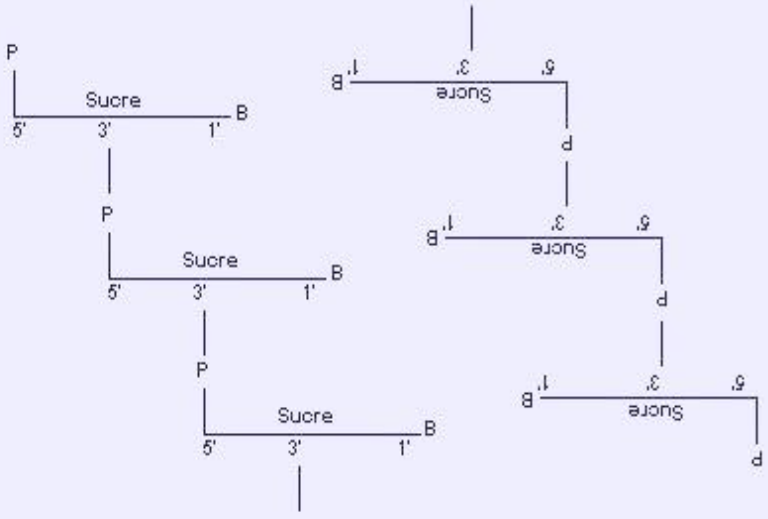


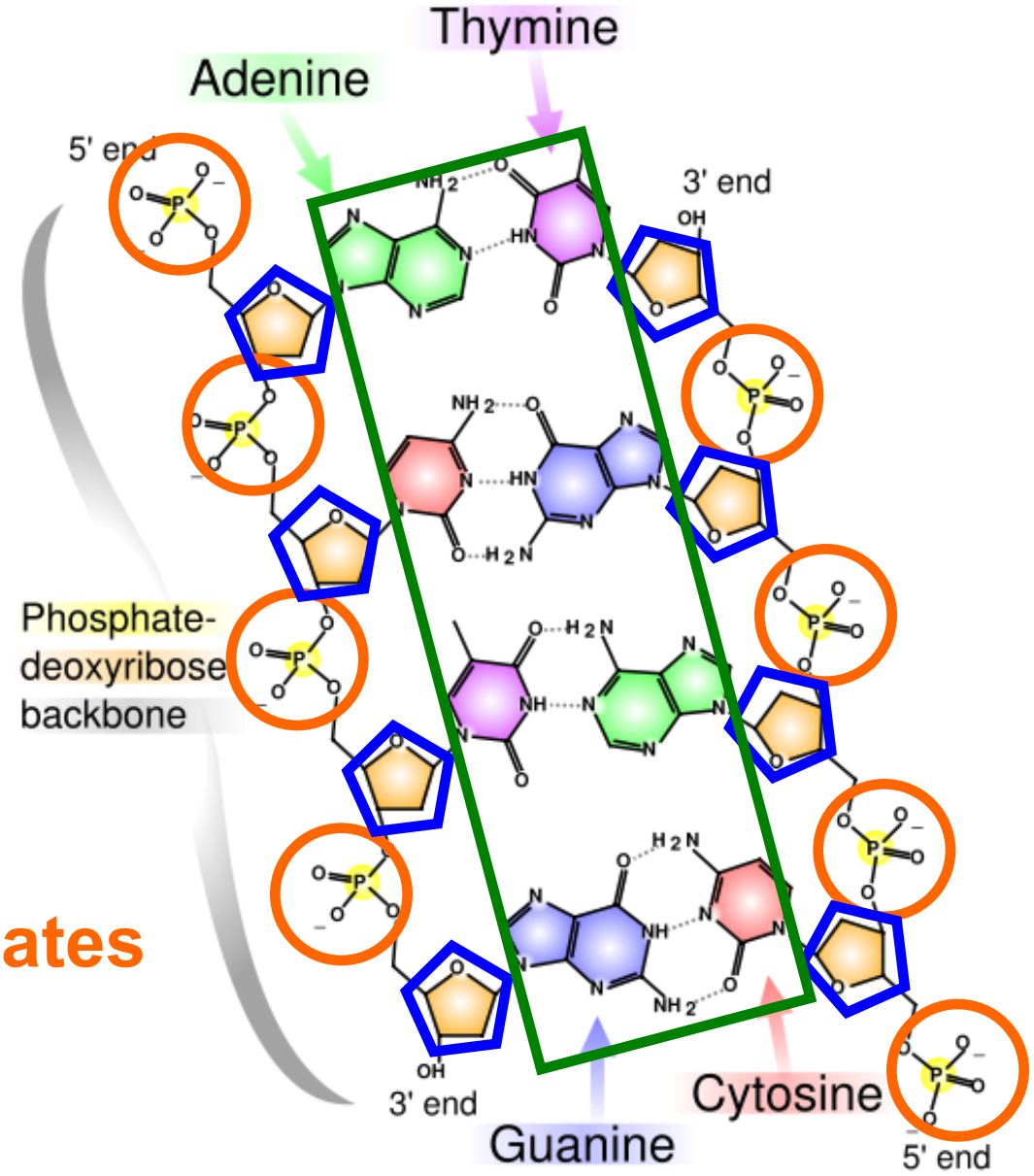
= ApUpGpCpA = AUGCA

- Si extrémité 5' phosphorylée : p AUGCA
- Si extrémité 3' phophorylée : AUGCAp
- Si pentose = 2-désoxyribose : d ATGCA (*T remplace U dans les ADN*)

Les acides nucléiques correspondent à des polynucléotides.







Phosphates

Sucres

Bases

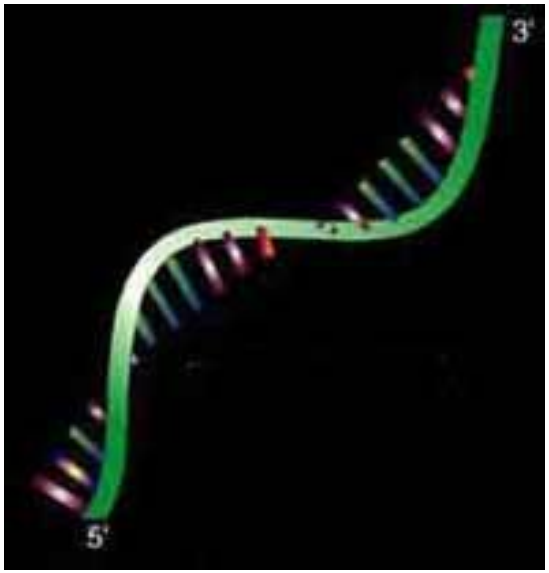
LES ACIDE NUCLÉIQUE

- Introduction
- Organisation structurale
- Comparaison ADN-ARN
- Propriétés physico-chimiques

Acide

Ribo

Nucléique



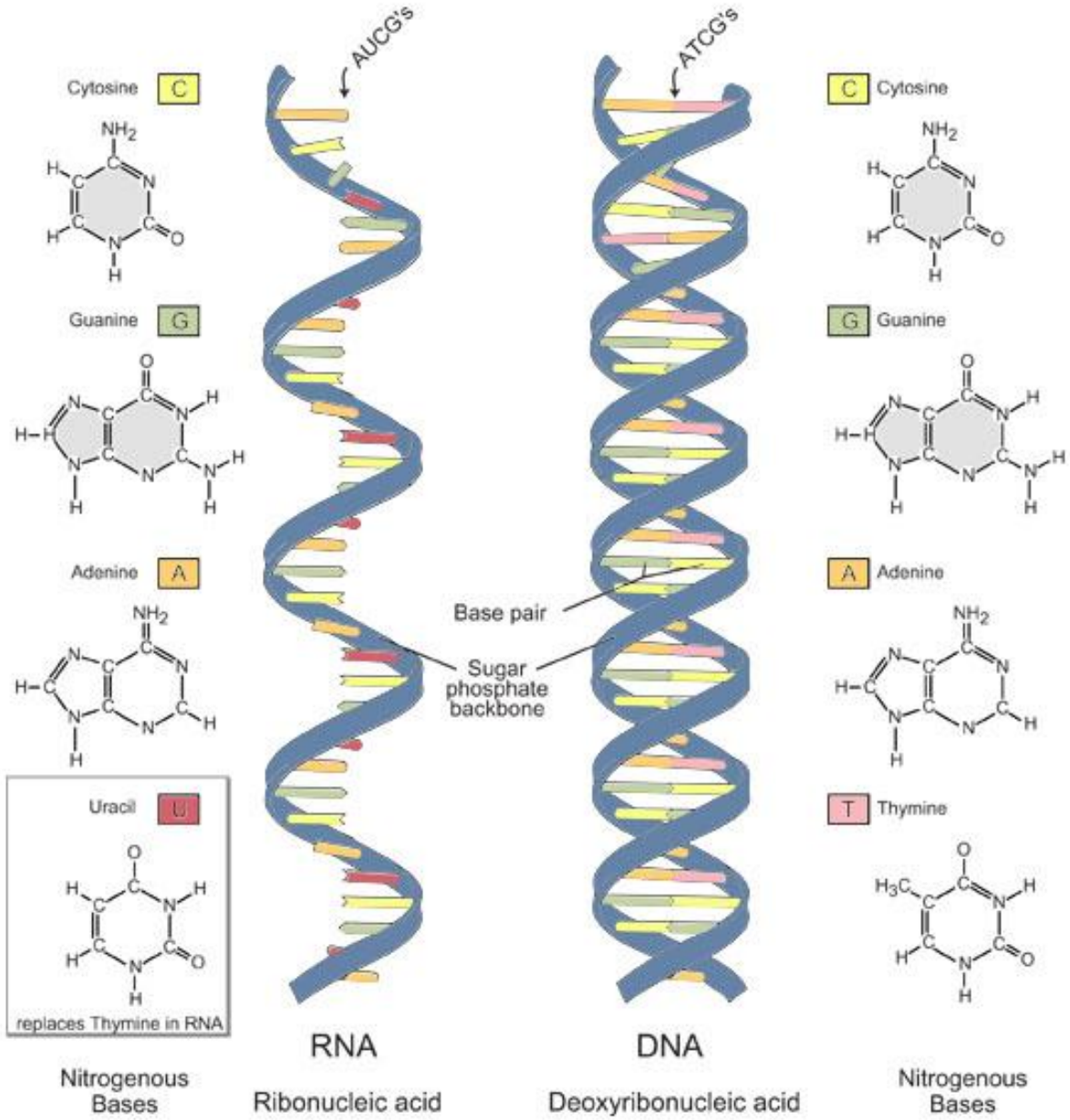


Image adapted from: National Human Genome Research Institute. Talking Glossary of Genetic Terms. Available at: www.genome.gov/Pages/Hyperion//DIR/VIP/Glossary/Illustration/rna.shtml.

Comparaison ADN-ARN

ADN	ARN
deux brins (double hélice)	un brin
désoxyribose	ribose
CGAT	CGAU

Types d'ARN

- Il y a trois principaux types d'ARN
  - L'ARN messager ARNm
  - L'ARN de transfert ARNt
  - L'ARN ribosomal ARNr

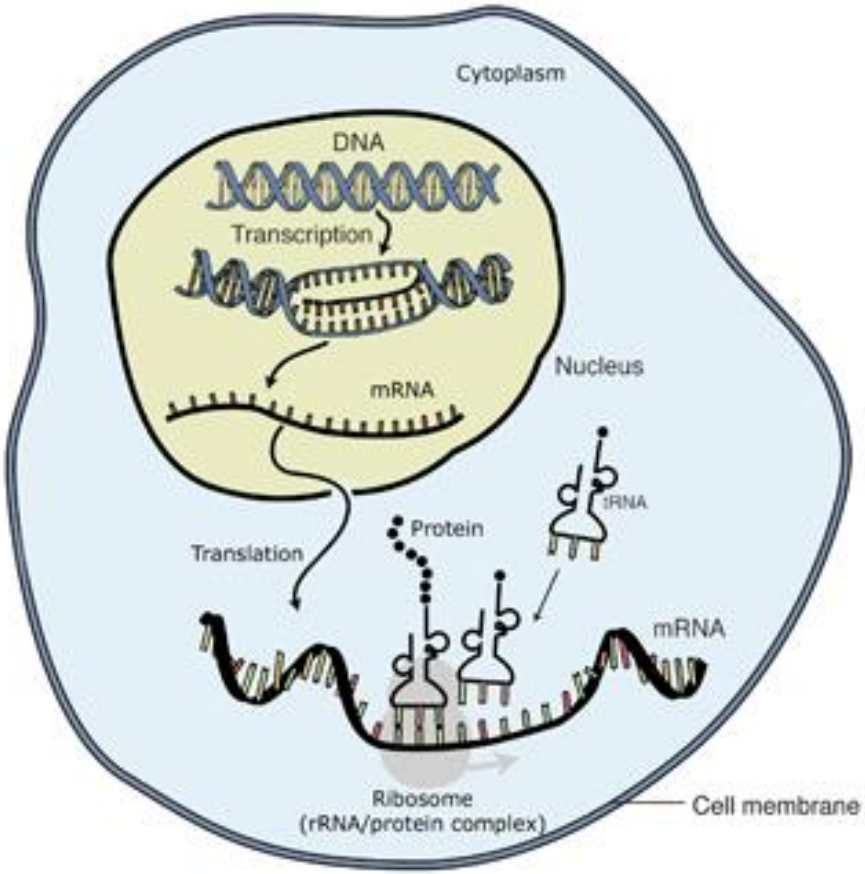
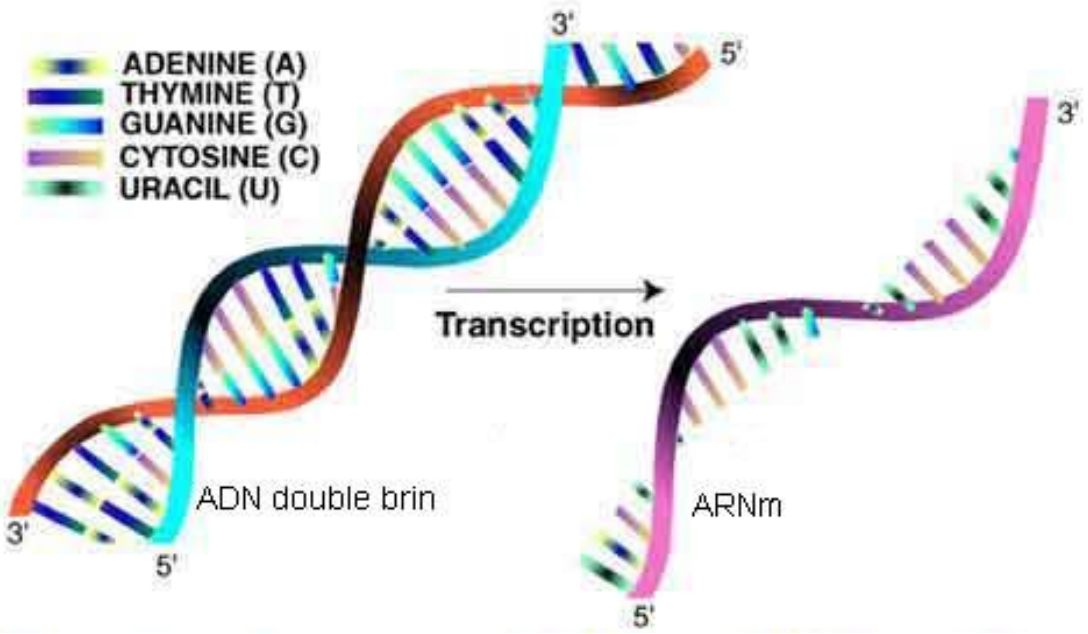


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

ARN messager (ARNm)

Les ARN-messagers correspondent aux séquences complémentaires et antiparallèles du **brin matriciel** (ou brin **anti-codant**) de l'ADN qui lui sert, comme son nom l'indique, de matrice, c'est-à-dire de modèle, mis à part que les thymines sont remplacées par les uraciles. Le brin d'ADN complémentaire du brin matriciel est appelé **brin codant** qui a la même séquence que l'ARN messager avec la même distinction (T devient U) que précédemment.
Le cycle cellulaire procaryote est très court, le cycle eucaryote est beaucoup plus long et nécessite ainsi une demi-vie de l'ARNm plus longue, celle-ci permise par l'addition de la coiffe, la poly-adénilation et l'épissage (*cf. maturation du transcrit primaire* dans le chapitre *Transcription de l'ADN*).



Types d'ARN

- Il y a trois principaux types d'ARN
  - L'ARN messager ARNm
  - L'ARN de transfert ARNt
  - L'ARN ribosomal ARNr

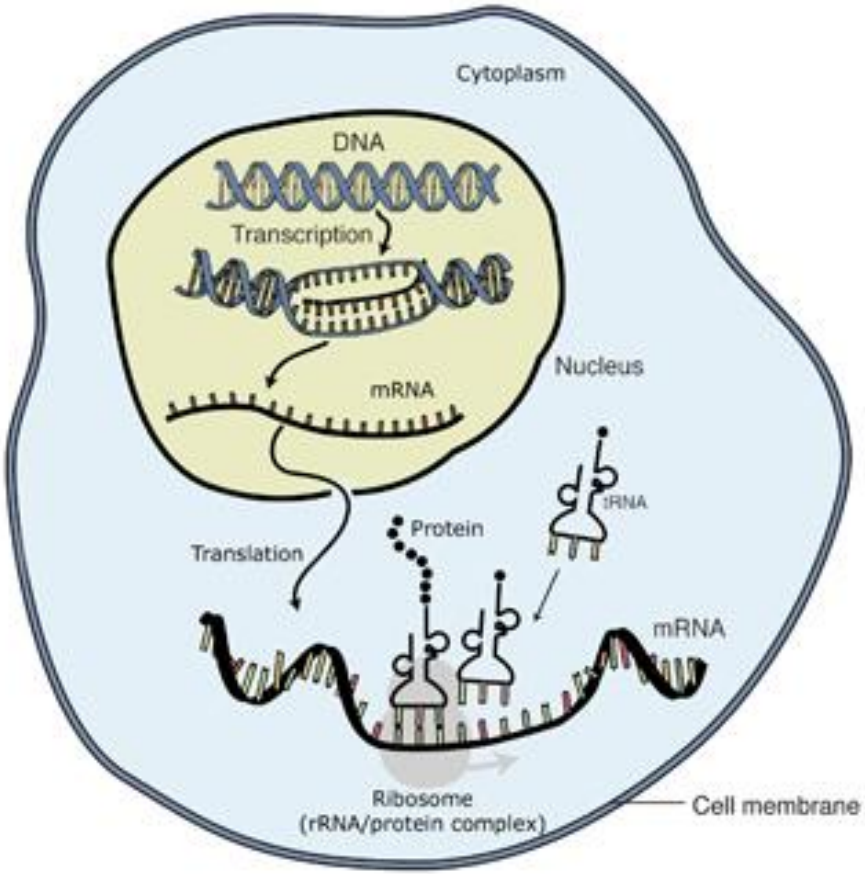
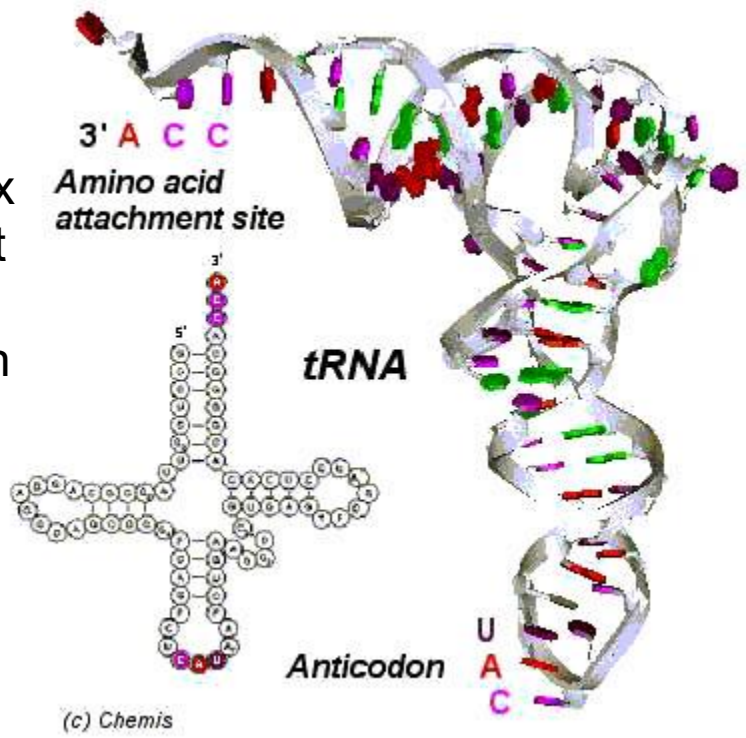


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

ARN de transfert (ARNt)

ARN de transfert

Ce sont de petits ARN (de 73 à 93 b).Il en existe61 sortes (autant que de codons utilisables. Suivant les organismes certains peuvent manquer. Pour tous ceux qui sont représentés, il y a plusieurs gènes qui codent exactement le même aa ARNt : Chez la levure on a dénombré 274 ARNt et dans le génome humain il y en a de l'ordre de 1300.



nombre de gènes	type d'ARNt (tous codons confondus)	nombre de gènes	type d'ARNt (tous codons confondus)
16	tRNA-Ala	21	tRNA-Leu
19	tRNA-Arg	21	tRNA-Lys
10	tRNA-Asn	10	tRNA-Met
15	tRNA-Asp	10	tRNA-Phe
4	tRNA-Cys	12	tRNA-Pro
10	tRNA-Gln	17	tRNA-Ser
16	tRNA-Glu	16	tRNA-Thr
21	tRNA-Gly	6	tRNA-Trp
7	tRNA-His	8	tRNA-Tyr
15	tRNA-Ile	17	tRNA-Val

Les 274 ARNt de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Types d'ARN

- Il y a trois principaux types d'ARN
  - L'ARN messager ARNm
  - L'ARN de transfert ARNt
  - L'ARN ribosomal ARNr

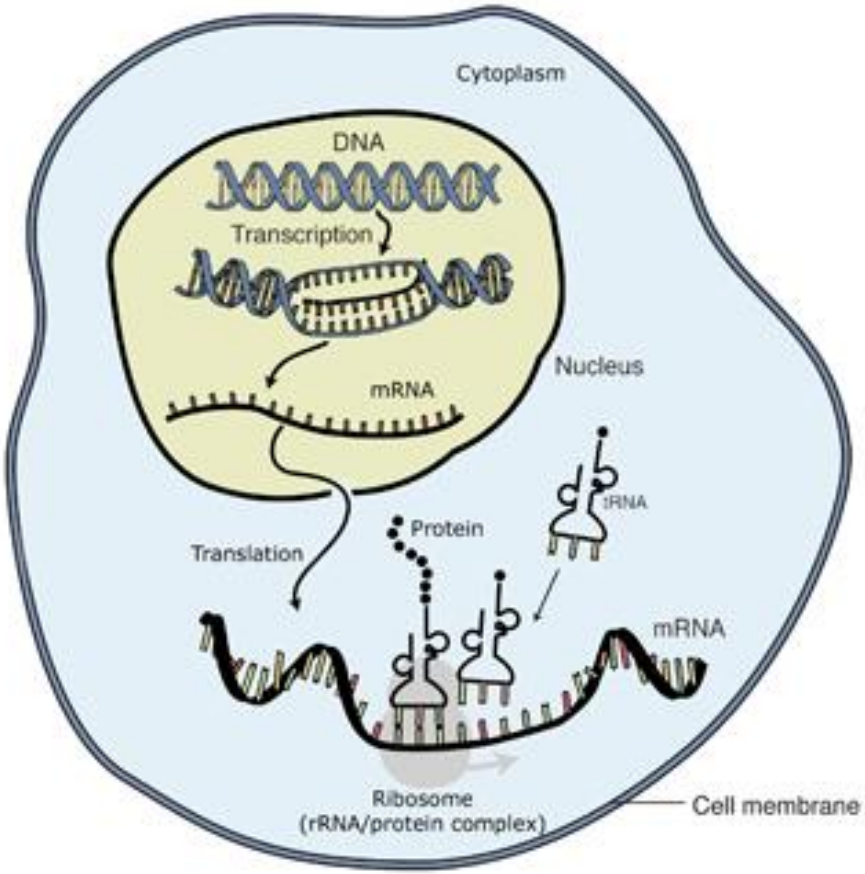


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

ARN ribosomal (ARNr)

Les ARN-ribosomiques rentrent dans la constitution des ribosomes, dans lesquels ils sont associés à des protéines. Leur taille est définie en unité Svedberg. Les procaryotes ont trois ARNr (ARN 5s, 16s et 23s) et les eucaryotes ont quatre ARNr (5s, 5,8s, 18s et 28s) :

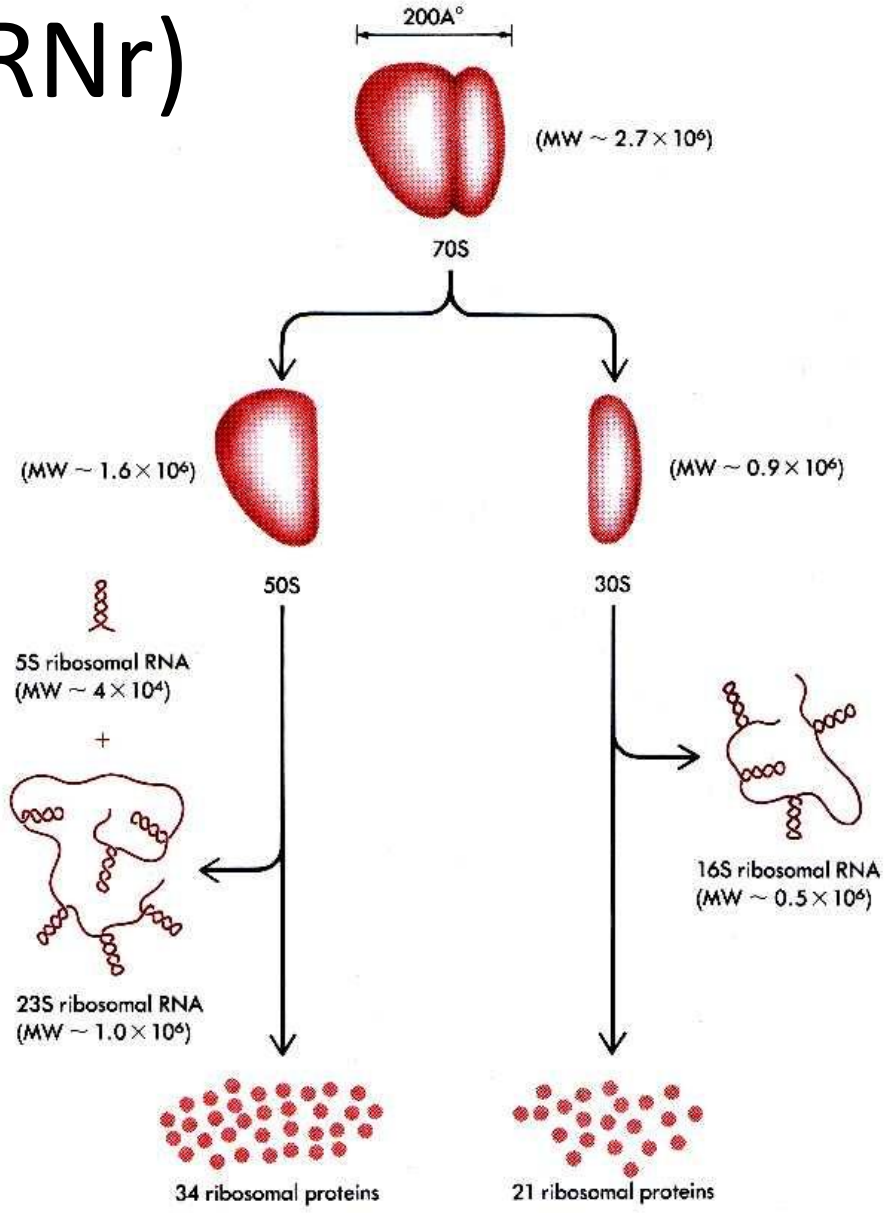
Les ribosomes procaryotes (70S) sont constitués d'une petite sous-unité 30S et d'une grande sous-unité 50S.

- La sous-unité 30S est constituée d'un ARNr 16S (1541 nucléotides) et de 21 protéines.
- La sous-unité 50S est constituée des ARNr 23S (2904 nucléotides) et 5S (120 nucléotides) ainsi que de 34 protéines.

Les ribosomes eucaryotes (80S) sont constitués d'une petite sous-unité 40S et d'une grande sous-unité 60S.

- La sous-unité 40S est constituée d'un ARNr 18S (1870 nucléotides) et de 33 protéines.
- La sous-unité 60S est constituée des ARNr 28S (5030 nucléotides), 5,8S (160 nucléotides) et 5S (150 nucléotides) ainsi que de 49 protéines.

Le ribosome (ARN-ribosomiques et protéines) catalyse la formation de la liaison peptidique qui relie les acide-aminés entre eux, permettant ainsi la formation de protéines.



LES ACIDE NUCLÉIQUE

- Introduction
- Organisation structurale
- Comparaison ADN-ARN
- Propriétés physico-chimiques

Propriétés physico-chimiques

1. Taille et masse :

- ADN

ADN d'une cellule

	taille	masse	longueur
adénovirus	≈ 35 10^3 pb	≈ 10^7 Da	≈ 1,1 10^{-6} m
E. coli	≈ 3,5 10^6 pb	≈ 10^9 Da	≈ 1,3 10^{-3} m
homme	≈ 2 x 3 10^9 pb	≈ 10^{12} Da	≈ 2 m

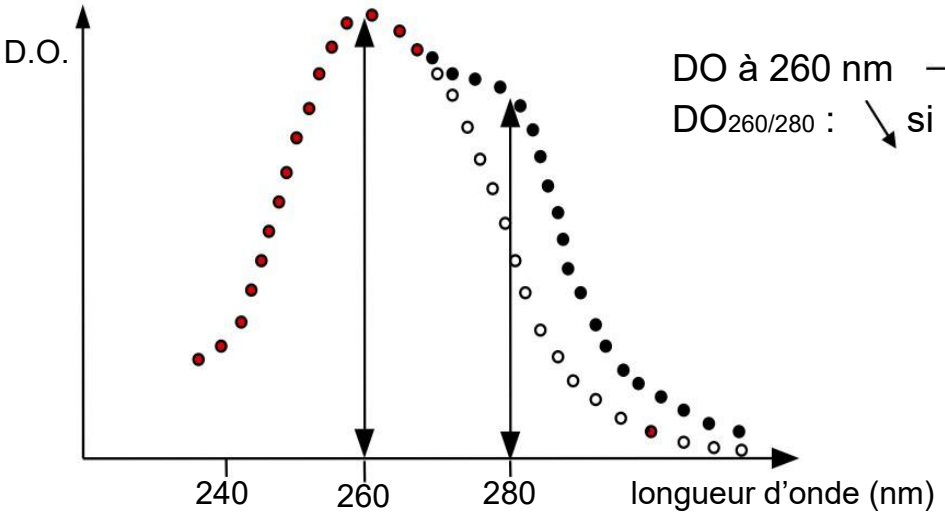
1 kpb = 1000 pb, 1 Mpb = 1 000 000 pb…

- ARN : de 15-20 nucléotides à quelques milliers de nucléotides

2. Densité : fonction de la nature des nucléotides

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

4. Absorption : les bases A, T, G, C, U ont une absorption maximale à ≈ 260 nm

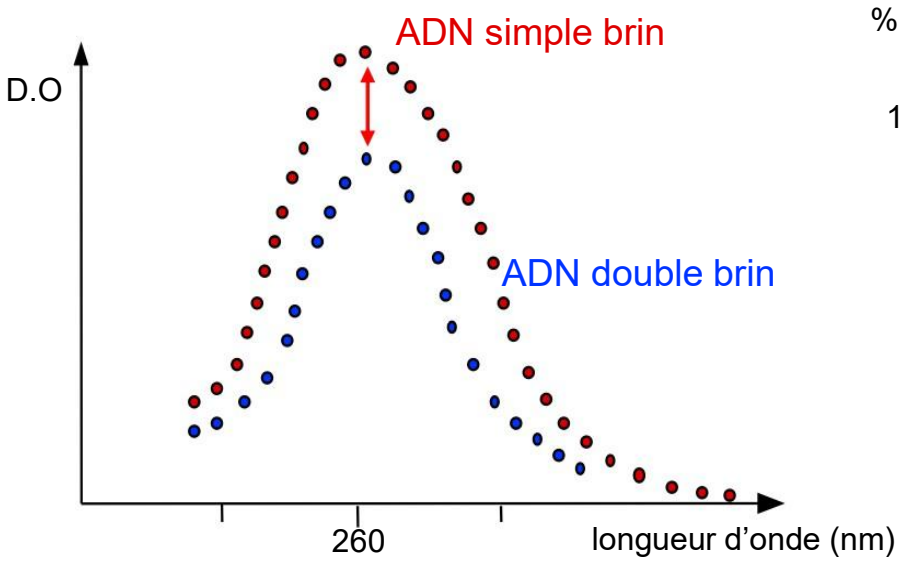


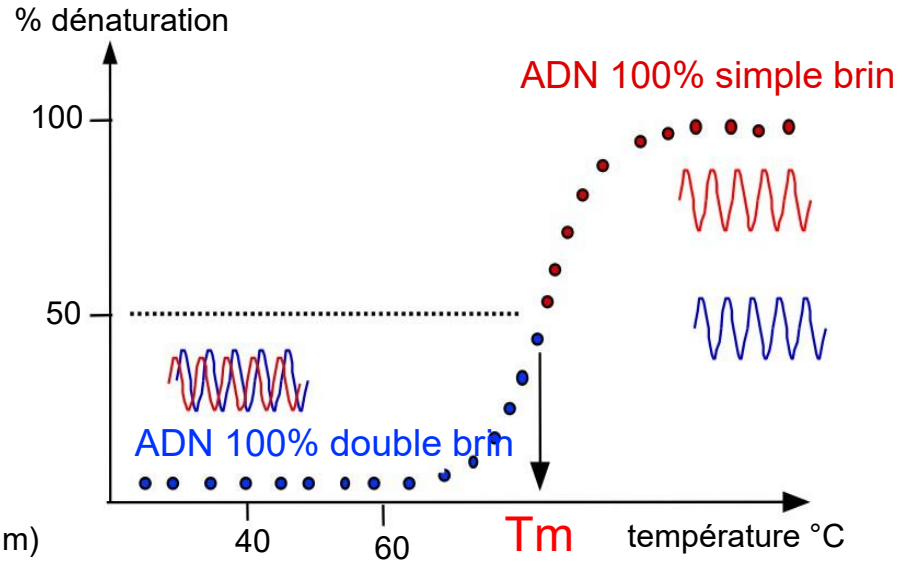
DO à 260 nm → concentration en ADN

$DO_{260/280}$: ↘ si protéines présentes

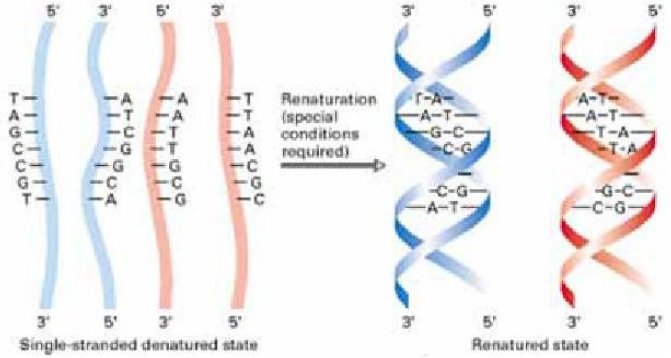
5. Dénaturation - renaturation

 Dénaturation : - température, pH, agents chaotropes
- modulée par taille du fragment, % GC, force ionique du milieu
- effet hyperchrome, température de fusion





 Renaturation : réappariement spontané des 2 brins complémentaires d 'ADN

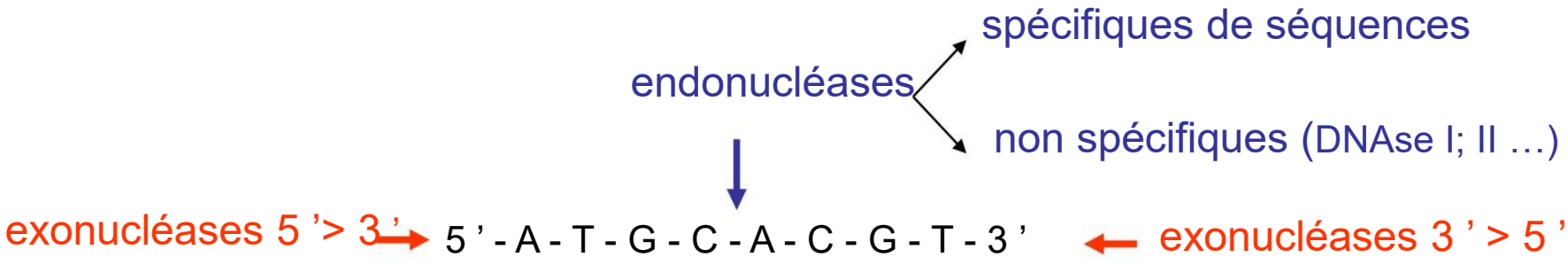


COT (concentration over time)
paramètre définissant la renaturation

6. Dégradation :

1. Clivage chimique

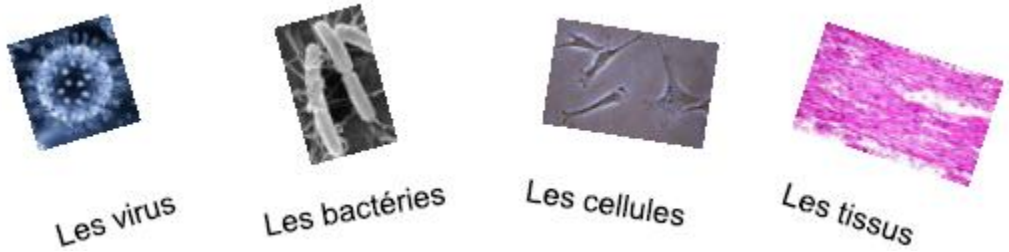
2. Coupures enzymatiques



ANALYSE D’ADN

Extraction et purification des acides nucléiques

Il existe différents protocoles expérimentaux pour extraire les acides nucléiques qui suivent approximativement le même schéma général:



-Lyse des cellules

↓

-Elimination des protéines et lipides

↓

-Elimination d'un acide nucléique donné
(un extrait d'acides nucléiques contient un mélange ARN, ADN génomique et ADN plasmidique pour les bactéries)

Amplification DE L’ADN

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR

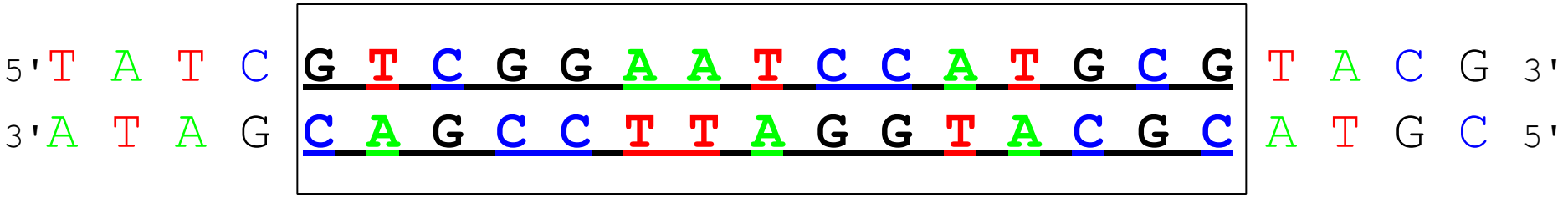
- Amplification du fragment d'ADN d'intérêt (gène entier ou tronqué) par **PCR** : *Polymerase Chain Reaction*

- La PCR est une réaction de polymérisation en chaîne à partir d'amorces spécifiques de l'ADN d'intérêt, grâce à l'action d'une enzyme, l'ADN polymérase dans un milieu contenant des nucléotides



www.dnalc.org

2) Amplification du fragment d’ADN d'intérêt :la PCR

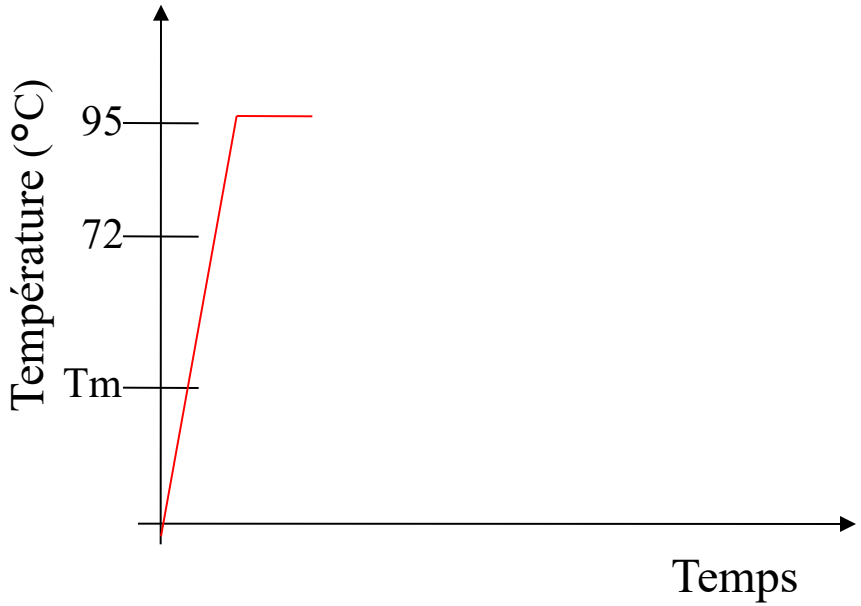


Séquence à amplifier

2) Amplification du fragment d'ADN : la PCR

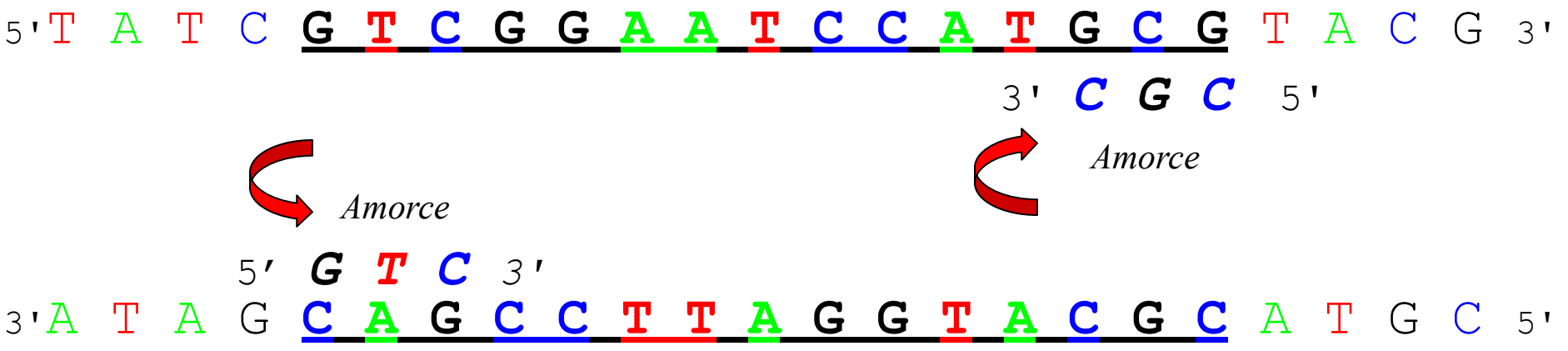
5'T A T C **G T C G G A A T C C A T G C G** T A C G 3'

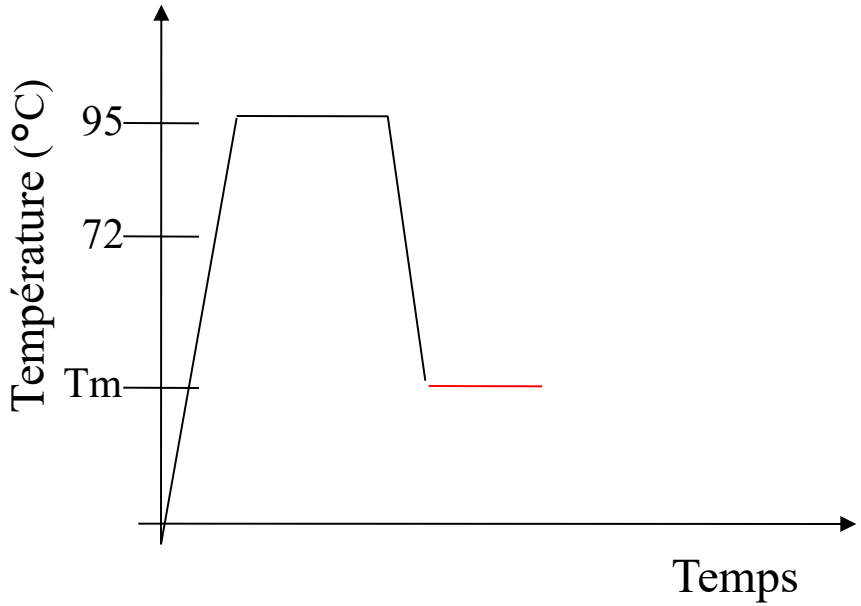
3'A T A G **C A G C C T T A G G T A C G C** A T G C 5'



1ère étape : **dénaturation de l'ADN** à 95°C (séparation des brins complémentaires)

Amplification du fragment d'ADN : la PCR

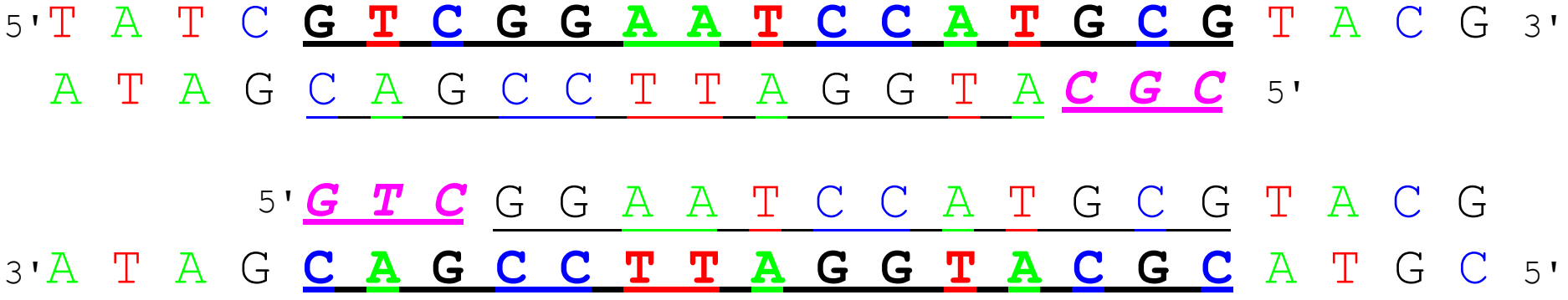


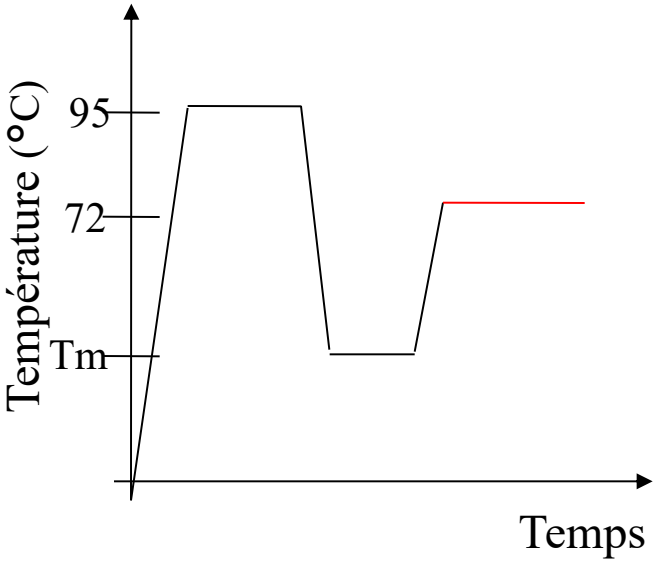


2ème étape : **hybridation des amorces** (séquence de nucléotides complémentaires de l'extrêmité de la région à amplifier) à une température Tm (spécifique de l'amorce)

(en général amorces de 15-25 nucléotides)

Amplification du fragment d'ADN : la PCR



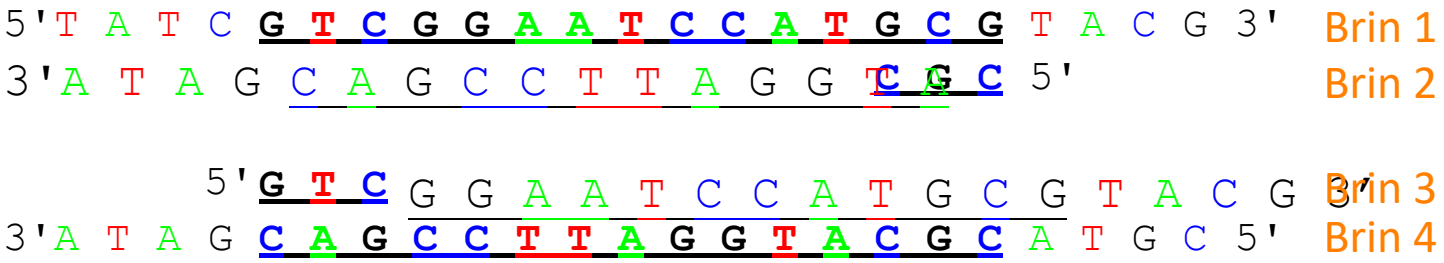


3ème étape : **élongation** (synthèse du brin complémentaire à partir des amorces grâce à l'enzyme *ADN polymérase* et aux *nucléotides* présents dans le milieu réactionnel). Fonctionnement de l'enzyme à 72°C.

Fin du premier cycle de PCR : aucune molécule obtenue ne correspond au produit désiré (souligné). Un nouveau cycle de PCR (dénaturation-hybridation-élongation) commence.

Amplification du fragment d'ADN : la PCR

Produits du 1er cycle de PCR :

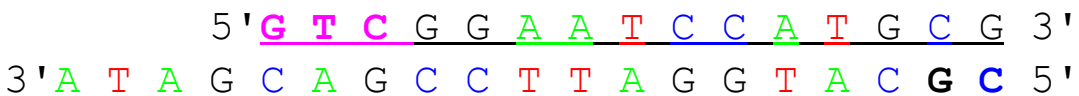


Produits du 2ème cycle de PCR : (les amorces sont en magenta)

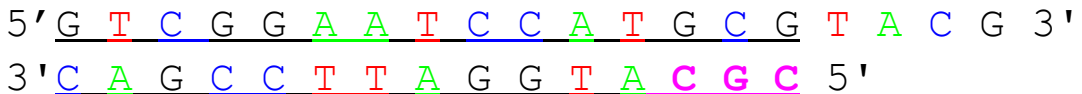
Produit PCR formé à partir du brin 1



Produit PCR formé à partir du brin 2



Produit PCR formé à partir du brin 3



Produit PCR formé à partir du brin 4



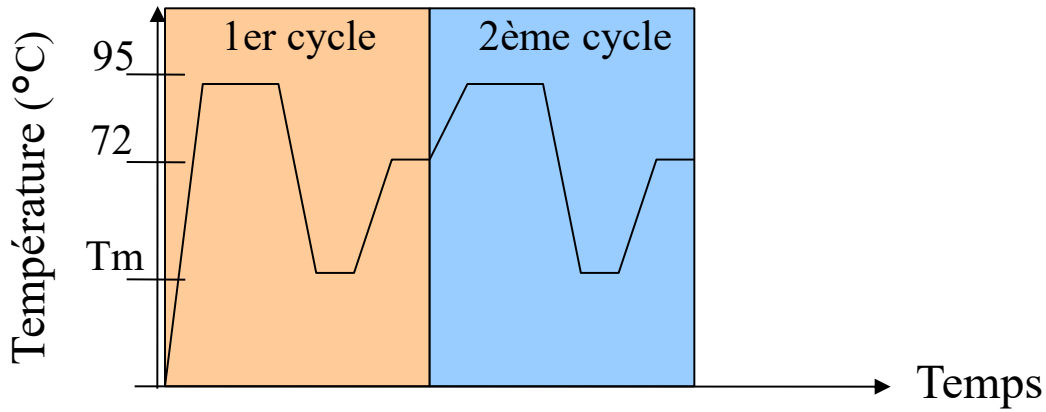
Amplification du fragment d'ADN : la PCR

5'T A T C **G T C G G A A T C C A T G C G** T A C G 3'
3'A T A G C A G C C T T A G G T A C **G C** 5'

5' G T C G G A A T C C A T G C G 3'
3'A T A G C A G C C T T A G G T A C **G C** 5'

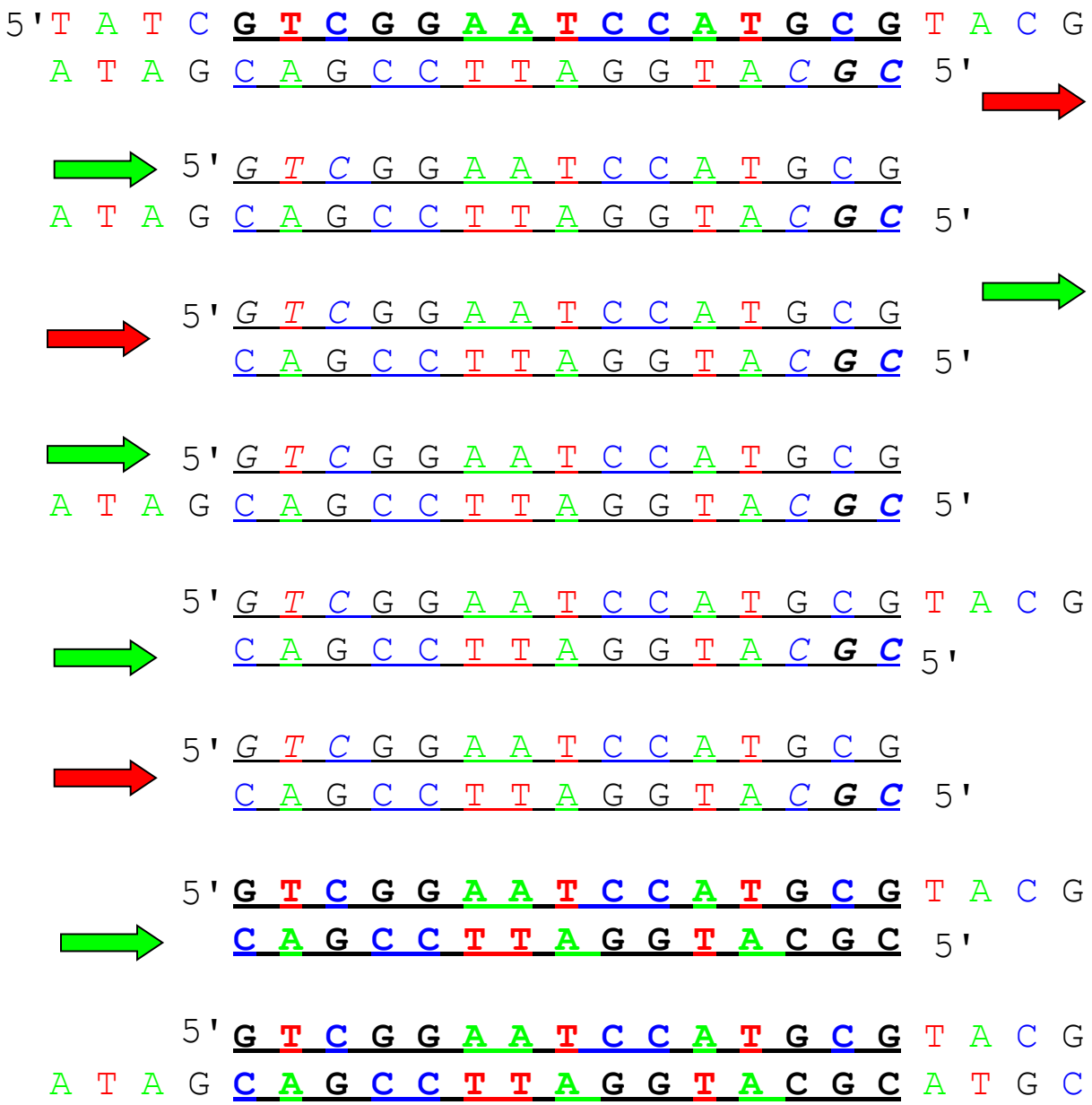
5'G T C G G A A T C C A T G C G T A C G 3'
3' C A G C C T T A G G T A C **G C** 5'

5' **G T C G G A A T C C A T G C G** T A C G 3'
3'A T A G **C A G C C T T A G G T A C G C** A T G C 5'



Molécules obtenues à la fin du second cycle de PCR. Aucune ne représente le produit d'intérêt (souligné).

Amplification du fragment d'ADN : la PCR



Les deux molécules d'intérêt obtenues au 3ème cycle donnent chacune deux molécules d'ADN d'intérêt au 4ème cycle.

4 fragments simple brin des autres molécules pourront donner un produit PCR souhaité au 4ème cycle.

<u>Quatrième cycle de PCR :</u>

8 fragments d'ADN d'intérêt

<u>Cinquième cycle de PCR :</u>

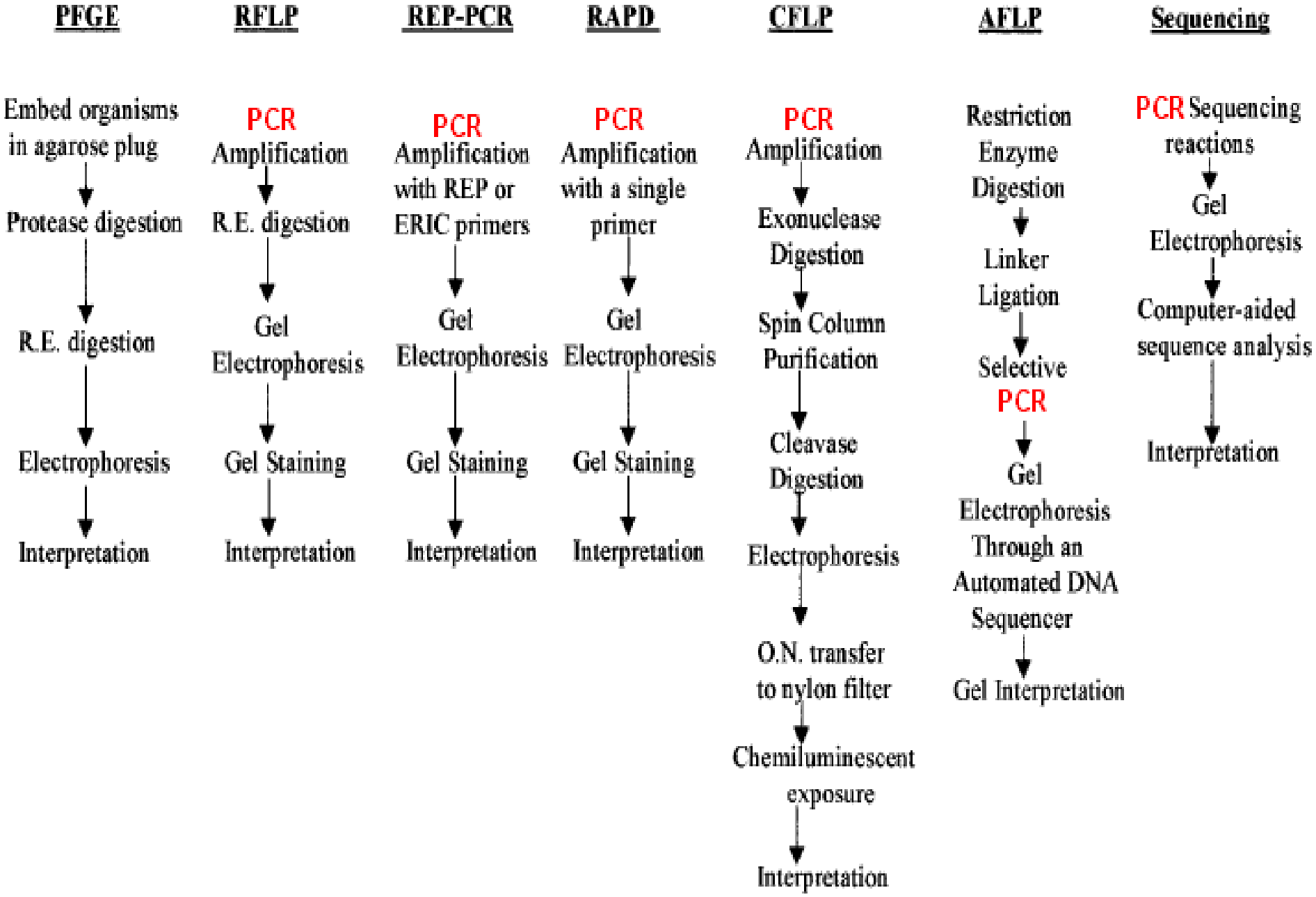
22 fragments d'intérêt

Amplification du fragment d'ADN : la PCR

- Répétition des 3 étapes : dénaturation-hybridation-élongation (la machine à PCR fait des cycles de température) => Amplification du fragment d'intérêt de façon exponentielle à partir du troisième cycle

- L'enzyme ADN polymérase ne doit pas être dénaturée à 95°C : utilisation de l'ADN polymérase de bactéries thermophiles (par exemple la Taq polymérase provient de Thermophilus aquaticus, microorganisme vivant près des sources d'eaux chaudes (50 à 80°C) ; la Pfu polymérase provient de Pyrococcus furiosus)

- Différentes enzymes peuvent être utilisées selon le degré de fidélité souhaité pour l'amplification du fragment (la Pfu est beaucoup plus fidèle mais plus lente pour l'amplification par exemple)


PFGE
Embed organisms in agarose plug
Protease digestion
R.E. digestion
Electrophoresis
Interpretation
RFLP
PCR
Amplification
R.E. digestion
Gel Electrophoresis
Gel Staining
Interpretation
REP-PCR
PCR
Amplification with REP or ERIC primers
Gel Electrophoresis
Gel Staining
Interpretation
RAPD
PCR
Amplification with a single primer
Gel Electrophoresis
Gel Staining
Interpretation
CFLP
PCR
Amplification
Exonuclease Digestion
Spin Column Purification
Cleavase Digestion
Electrophoresis
O.N. transfer to nylon filter
Chemiluminescent exposure
Interpretation
AFLP
Restriction Enzyme Digestion
Linker Ligation
Selective PCR
Gel Electrophoresis Through an Automated DNA Sequencer
Gel Interpretation
Sequencing
PCR Sequencing reactions
Gel Electrophoresis
Computer-aided sequence analysis
Interpretation

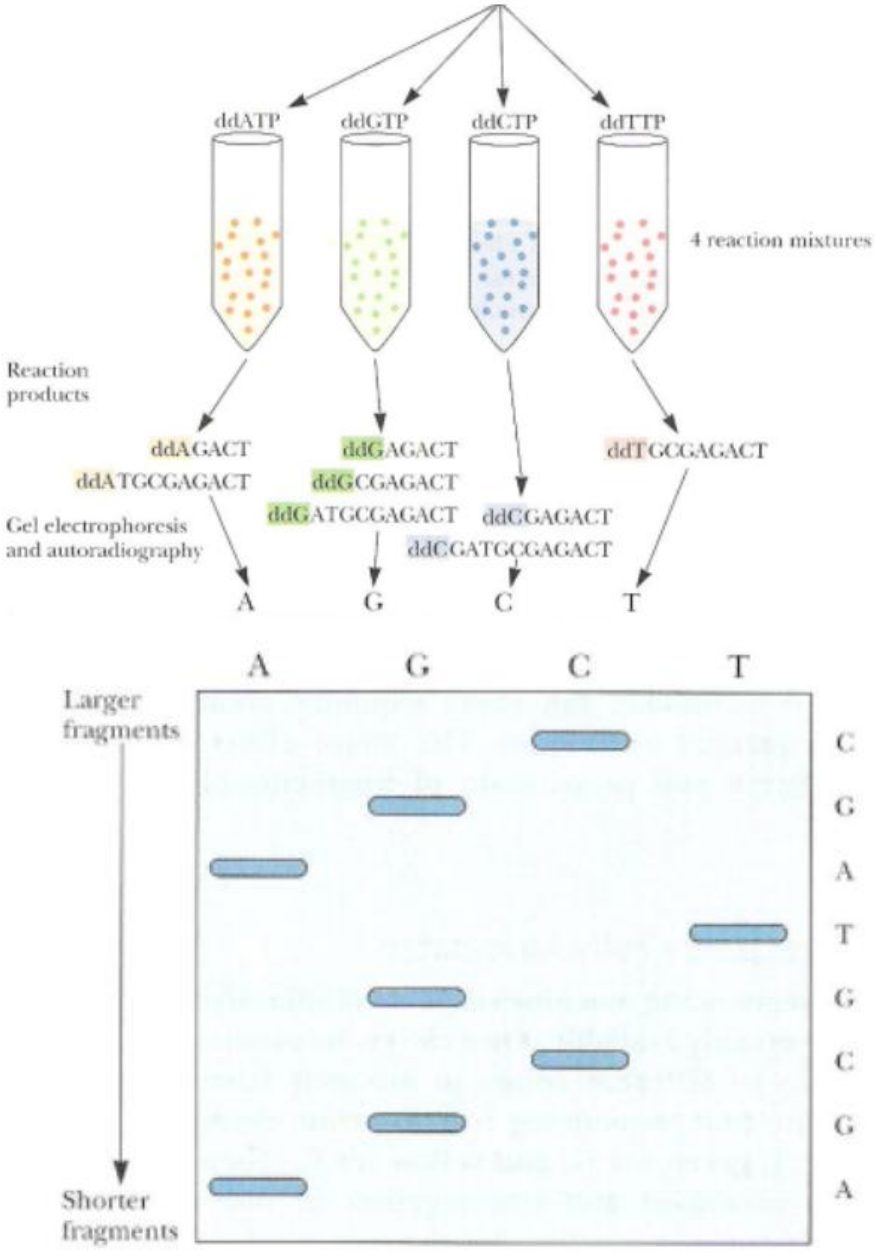
SÉQUENÇAGE D’ADN

MÉTHODE DE SANGER

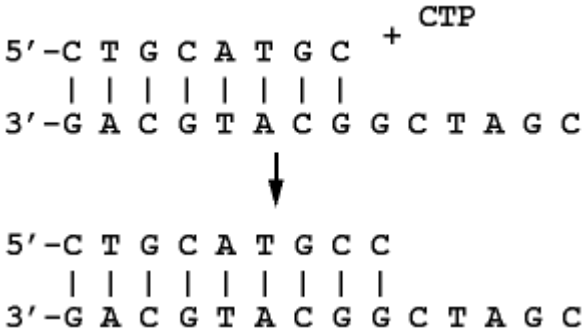
- méthode biochimique

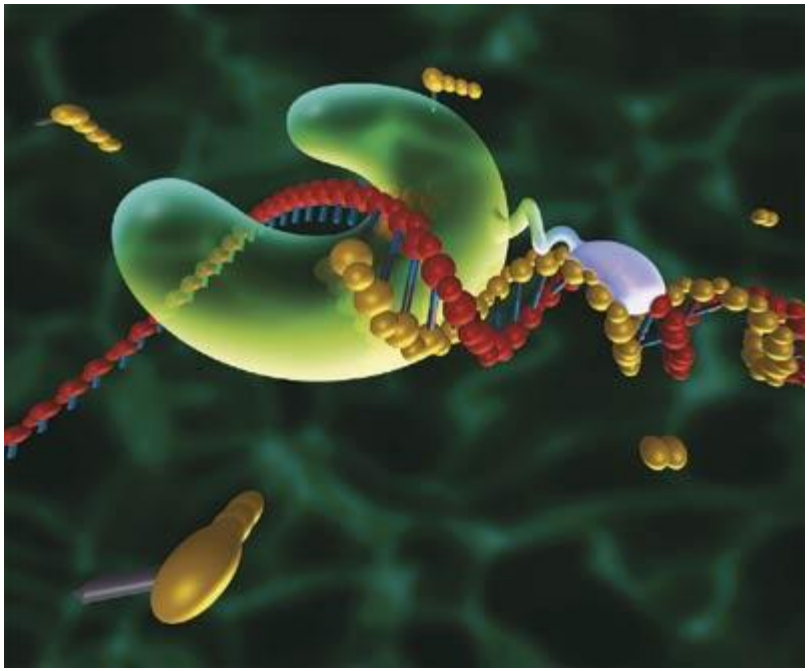
- aussi appelée séquençage par terminaison de chaîne ou aux dideoxy.

- basée sur l'incorporation d'un dideoxynucléotide à l'extrémité d'une molécule d'ADN en cours de synthèse.

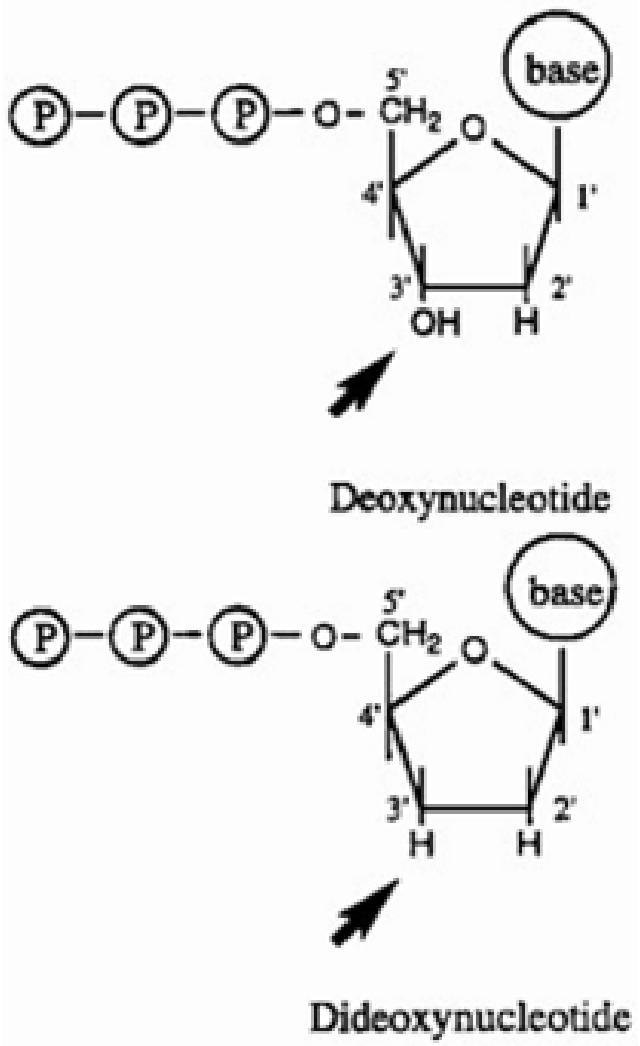


Méthode de Sanger



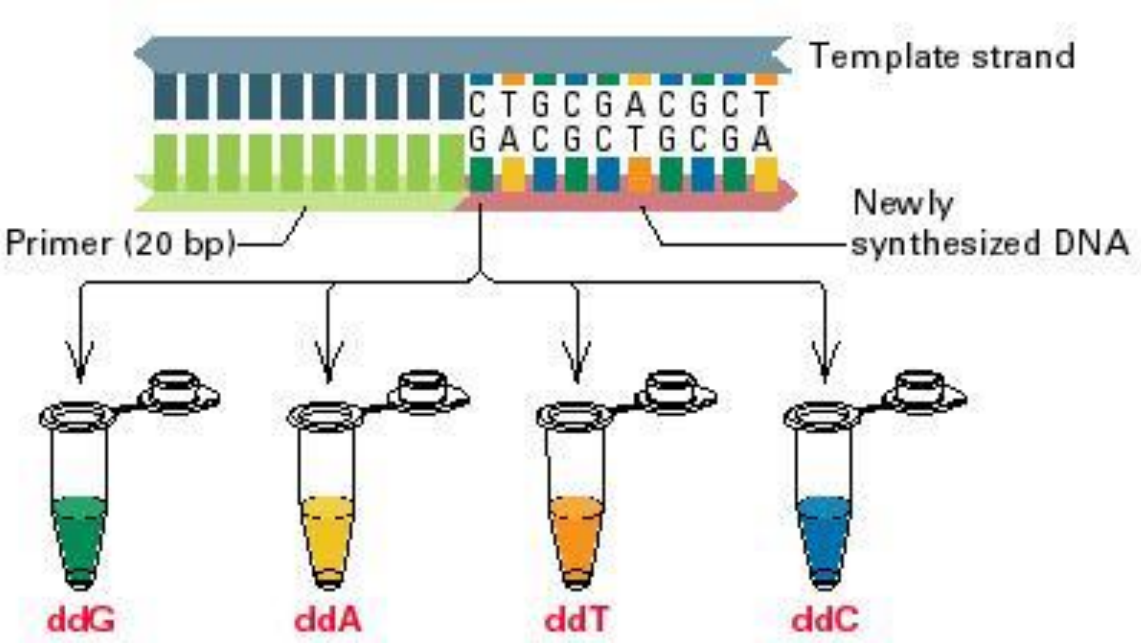


http://www.finnzymes.fi/products/pcr/phusion_high_fidelity_dna_polymerase.htm

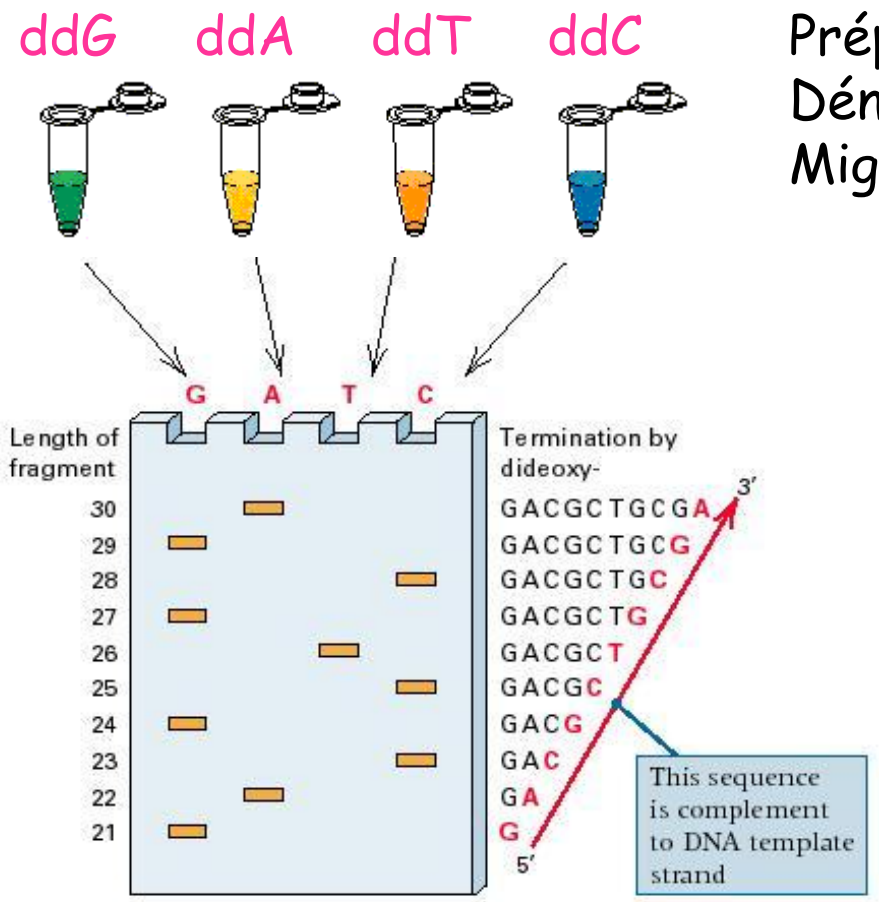


Méthode de Sanger

Preparations d'une grande quantité d'ADN (~1mg via miniprep)
Dénaturation et ajoût de l'amorce, des 4 dNTP (dont 1 radioactif, S^{35} ou P^{32}) et de l'ADN polymérase
Faire 4 aliquots et mettre un peu de ddNTP dans chaque tube
Elongation et terminaison par incorporation de didéoxynucléotides spécifiques



Méthode de Sanger



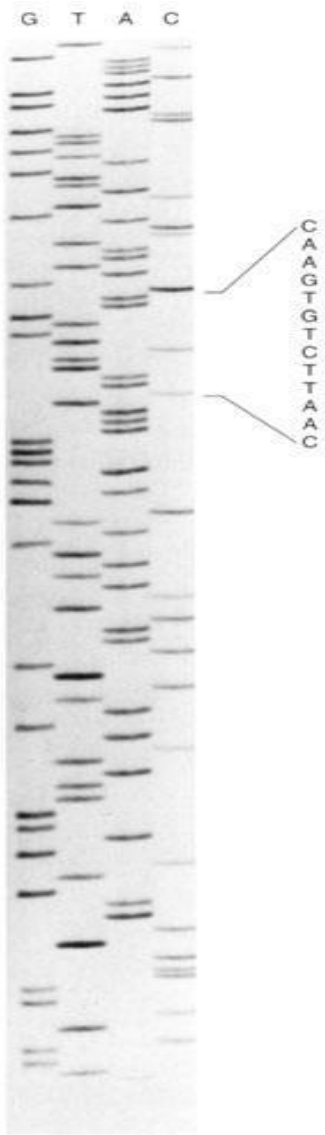
Préparation du gel du polyacrylamide
Dénaturation et dépôt sur gel
Migration par électrophorèse

Méthode de Sanger

Transfert du gel sur papier filtre (Whatman 3MM)
Séchage du gel
Cassette autoradiographique (+ écran amplificateur)
Développement du film autoradiographique
Lecture sur table lumineuse
Saisie sur ordinateur

Longueur typique de lecture : 400 nucléotides

Durée totale de l'expérience : environ 3 jours



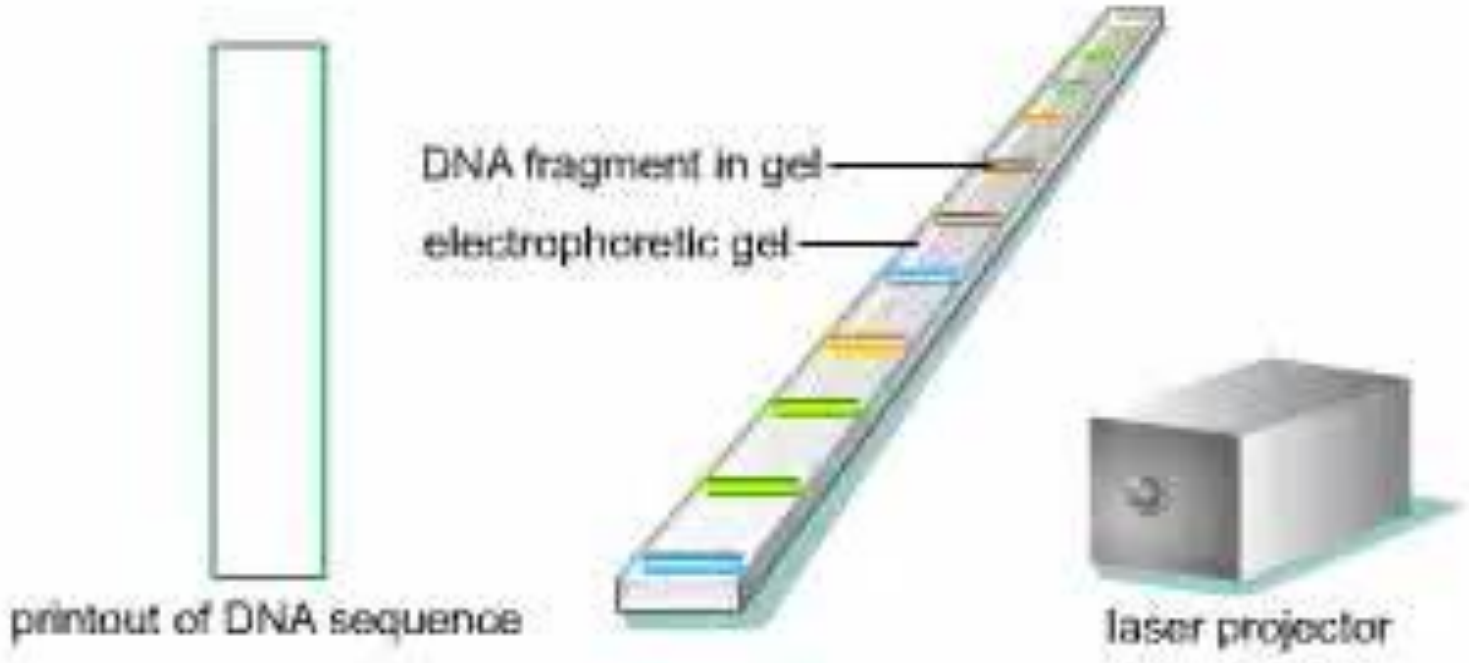
DNA Sequencing

SÉQUENÇAGE D'ADN AUTOMATISÉ

- **procédure de séquençage basique en cycle**
  - **hybridation du primer sur la matrice sous forme simple brin**
  - **extension du primer lors d'une réaction limitante en ddNTP fluorescent et en excès de dNTP (rapport 1/100).**
  - **dénaturation et redémarrage d'un nouveau cycle**

- **détection par émission de fluorescence après stimulation du colorant fluorescent; couleur et position sont enregistrée dans un fichier séquence.**

- **format de sortie du fichier: chromatogramme ou fichier de séquence**


DNA fragment in gel
electrophoretic gel
printout of DNA sequence
laser projector

