

Les Acides Nucléiques

Pr. Saaïd AMZAZI

Séance 3

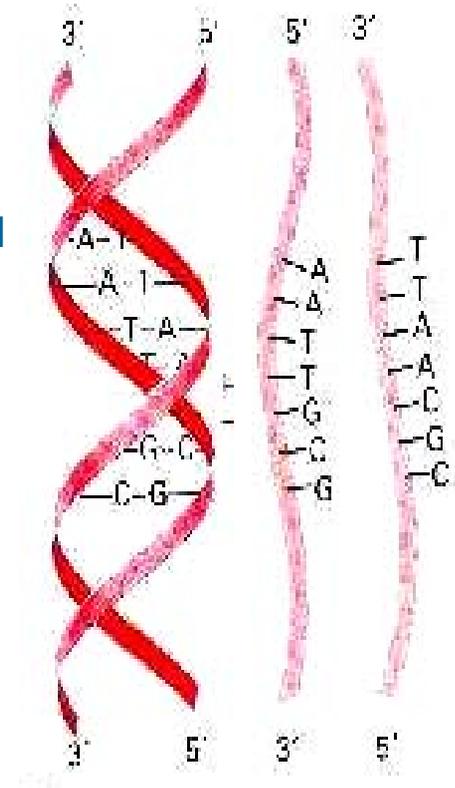
IV- Caractéristiques physicochimiques et fonctionnelles de l'ADN

1. Propriétés physicochimiques de l'ADN

- a- Taille, Densité et nature fibreuse
- b- Charge et propriétés spectrale
- c- Dénaturation et renaturation thermique

2. Méthodes d'études des Acides Nucléiques

- a- Purification et extraction de l'ADN
- b- Hydrolyse chimique et enzymatique
- c- Action d'autres enzymes



Propriétés physico-chimiques de l'ADN

Taille

Taille des molécules d'ADN chez différentes espèces:

Organisme	Nombre de bases (Kb)	Longueur de l'ADN (μm)	Taille du microorganisme ou de la cellule (μm)
Virus			
- SV40	5,1	1,7	0,05
- Bactériophage lambda	48	17	0,135 (corps + queue)
Procaryotes			
- Mycoplasmes	760	260	0,3
- Bactérie E. Coli	4000	1360	2
Eucaryotes			
- Levure	13500	4600	10
- Homme	2 900 000	990000	10-20

Exemple de molécules d'ADN

Organisme	Nb bases (kb)			Nb chromosomes
phage ϕ X174	5,4	simple brin	circulaire	
E. Coli	4000	double brin	circulaire	
Drosophile	~ 137 000	double brin	linéaire	4
Drosophile / Chr 1	27 000	double brin	linéaire	
Homme	~ 3 000 000	double brin	linéaire	23
Homme / Chr9	145 000	double brin	linéaire	

Densité

Mélange de :

- Plasmide bactérien enroulé
- protéines
- ARN bactérien
- ADN chromosomique
- ADN plasmidique relâché

solution de CICs

1 -

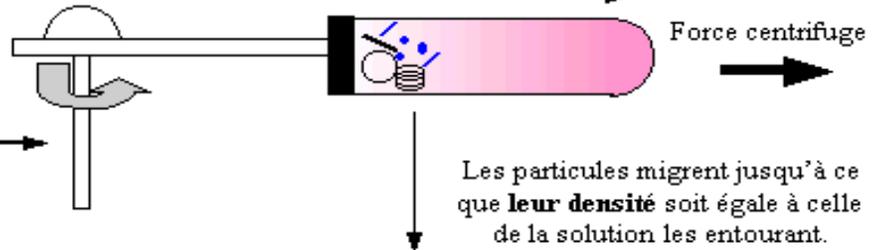


centrifuger

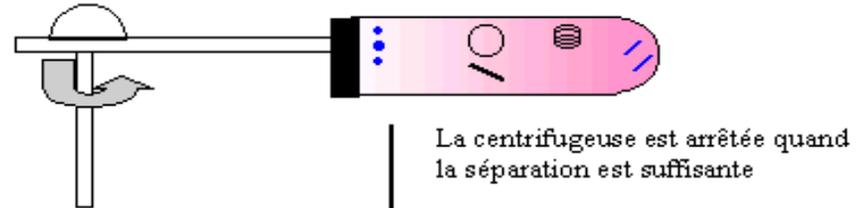
2 -

Le gradient de densité se forme au fur et à mesure de la centrifugation

Gradient continu de CICs



Les particules migrent jusqu'à ce que leur densité soit égale à celle de la solution les entourant.

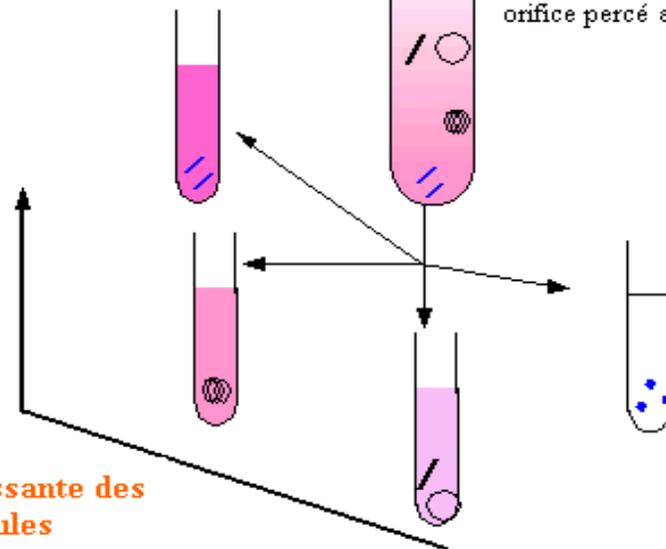


La centrifugeuse est arrêtée quand la séparation est suffisante

3 -



Recueillir les fractions par un orifice percé au fond du tube



La densité des molécules d'ADN est telle qu'on peut les séparer par ultracentrifugation dans des gradients de densité (chlorure de césium)



L'ARN est plus dense que l'ADN qui est lui-même plus dense que les protéines

densité croissante des particules

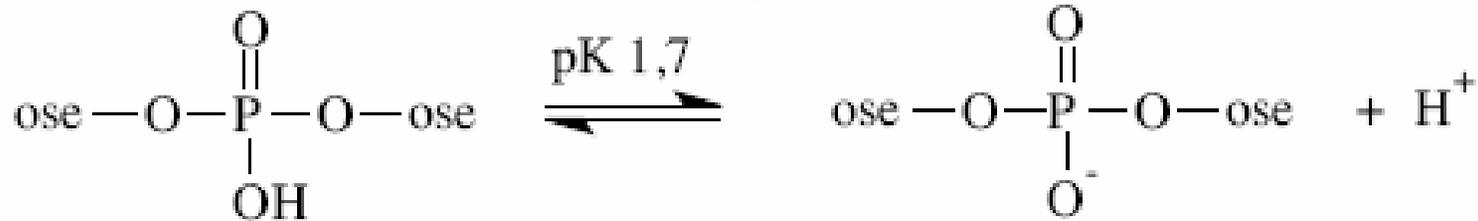
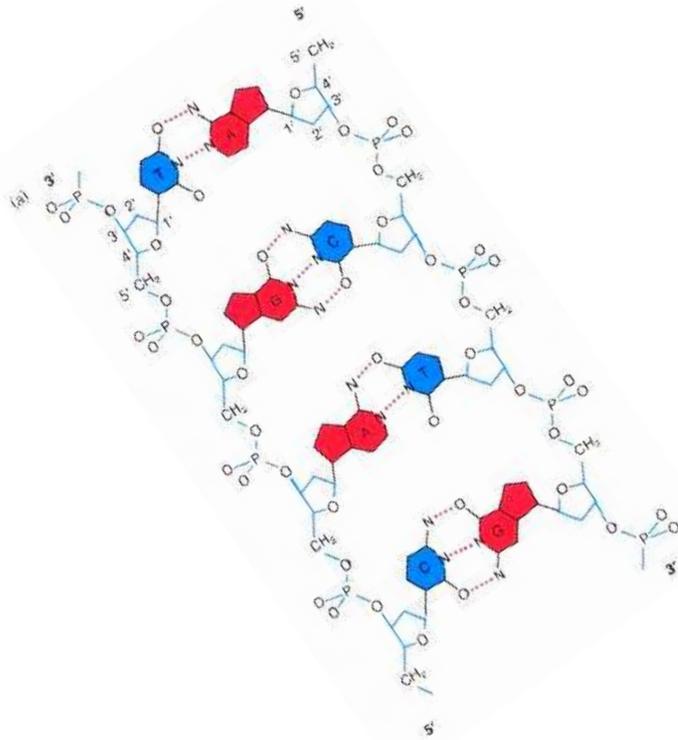
Nature fibreuse

La structure de la double hélice donne une nature fibreuse à la molécule d'ADN dont les propriétés sont exploitées dans de nombreuses expériences de biologie moléculaire :

Les alcools, et en particulier l'éthanol, précipitent les molécules d'ADN sous forme d'agglomérat en longues fibres



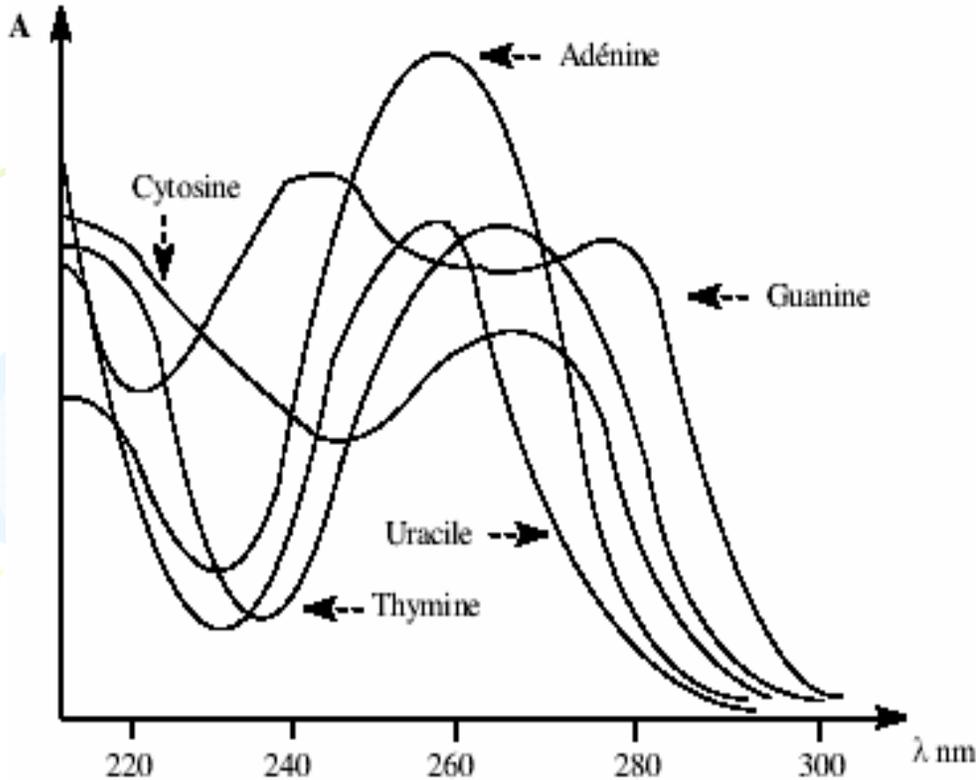
Charge



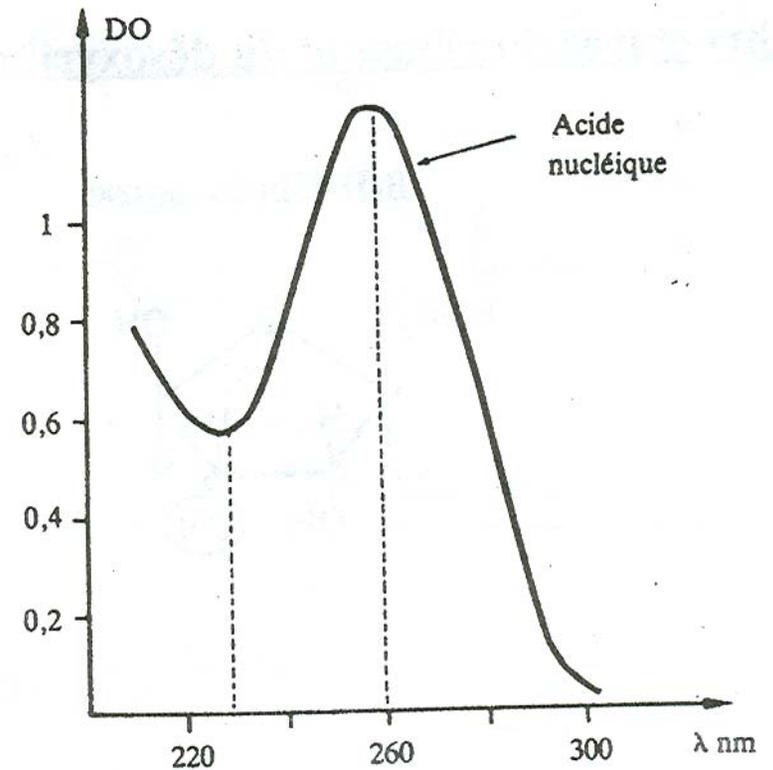
La charge de ces molécules à pH physiologique est négative. Charge dont la contribution est uniquement due aux groupements phosphates (à ce pH, les bases ne portent aucune charge). Cette propriété est utilisée pour les séparer par électrophorèse.

Propriétés spectrales

Spectre d'absorption dans l'ultra-violet (UV) des bases azotées à pH 7



Spectre d'absorption d'un acide nucléique

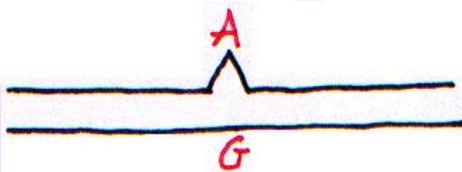
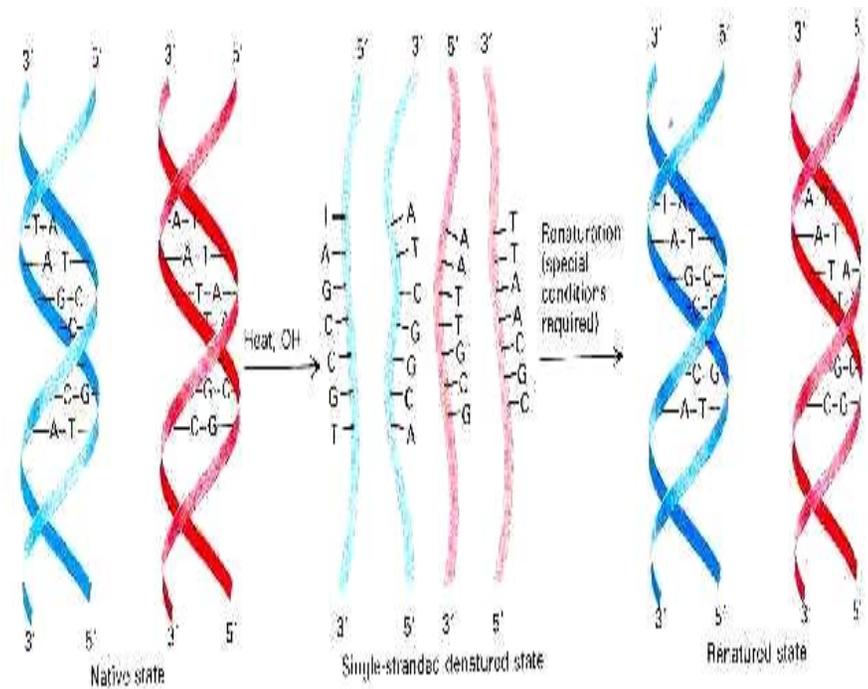
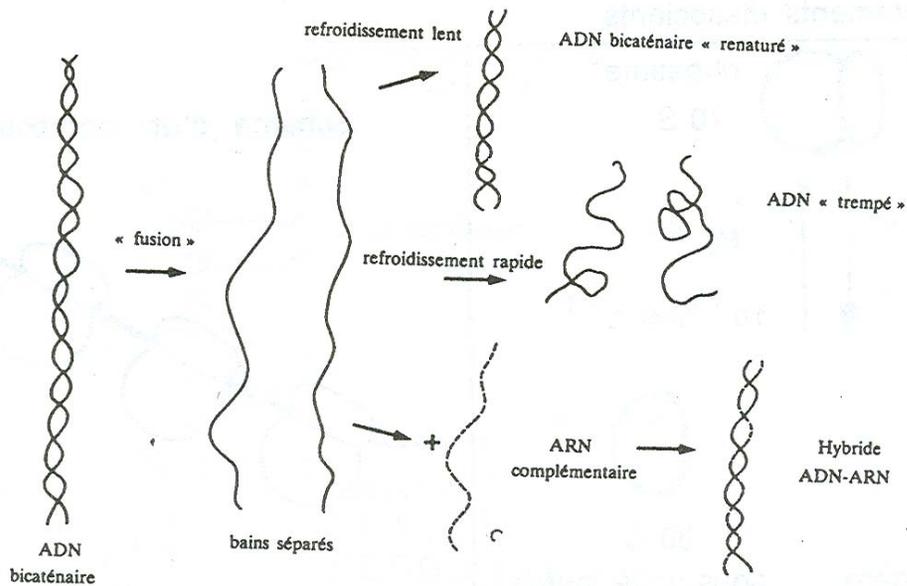


Coefficients d'absorption molaire des nucléotides à 260 nm

AMP	GMP	CMP	UMP	dTMP
15400	11700	7500	9900	9200

Dénaturation et renaturation: hybridation des brins de la double hélice

Dénaturation thermique



Mis-appariement

L'effet Hyperchrome



ADN simple brin

ADN double brin

Température de fusion : Tm

Calcul de la Tm

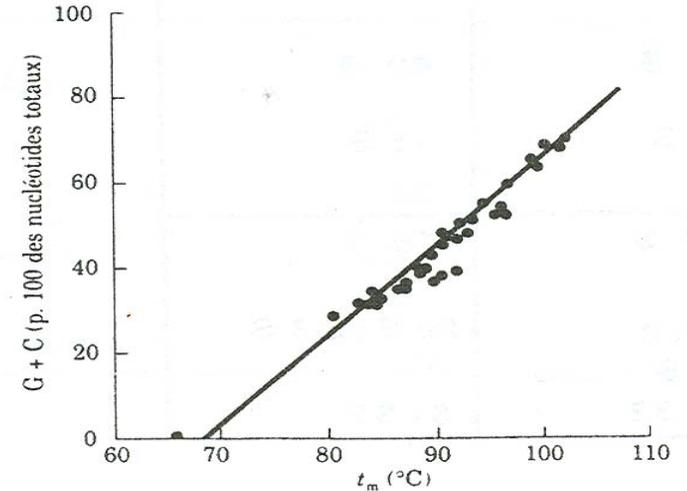
• Oligonucléotide inférieur à 20 nt

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

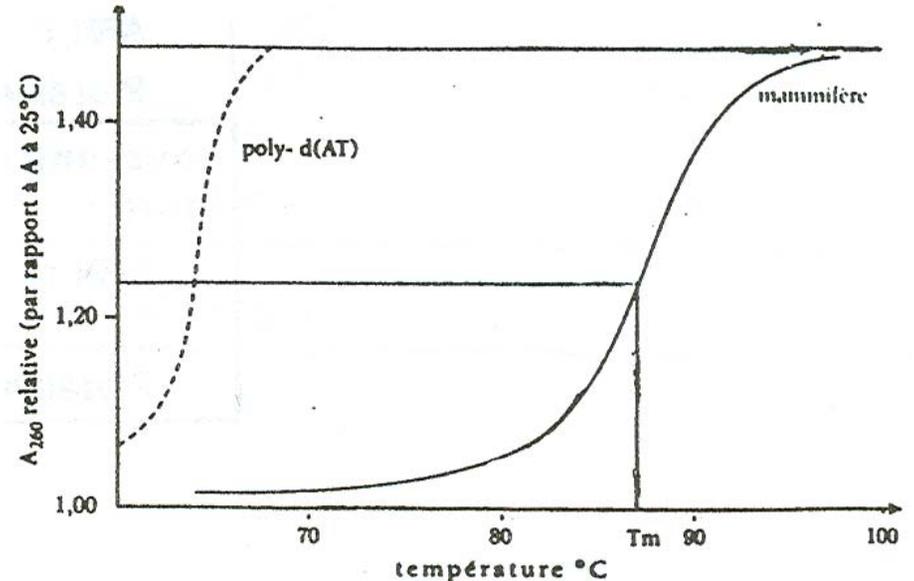
• Oligonucléotide supérieur à 20 nt

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

Variation du Tm en fonction du contenu en (G + C)



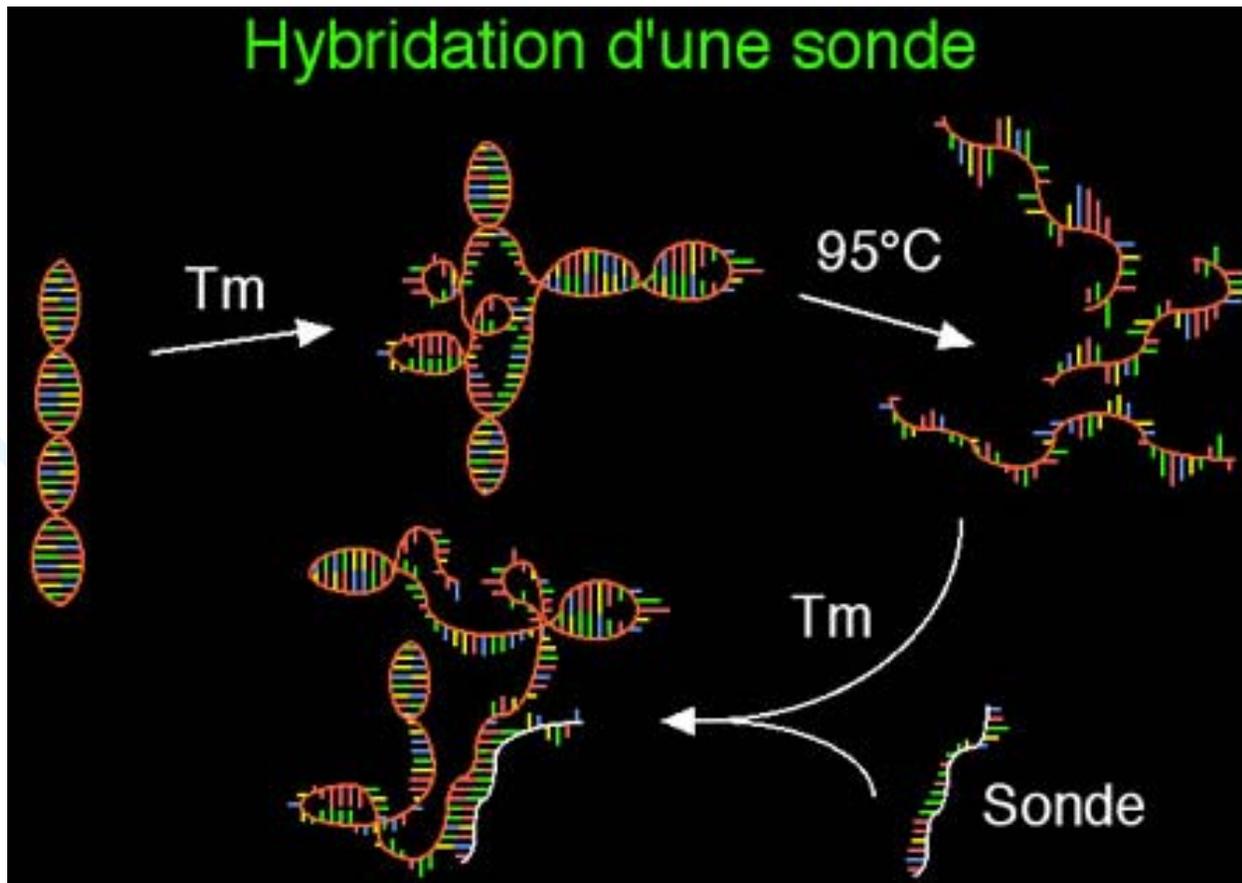
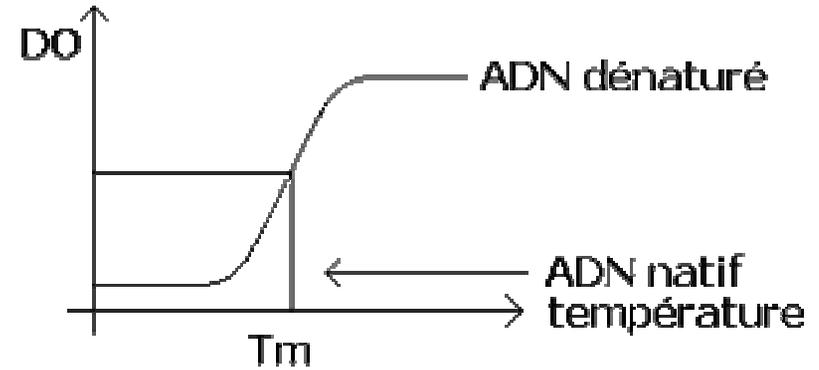
polynucléotide ou ADN	G+C (% du contenu total)	T _m (°C)
polyd(AT)	0	65
mammifère	40	87
<i>Escherichia coli</i>	50	92
<i>Micrococcus phlei</i>	~ 70	> 98
polyd(CG)	100	105



Propriétés physico-chimiques des AN

Dénaturation / renaturation de l'ADN

Hybridation



Méthodes d'étude des acides nucléiques

Purification et extraction



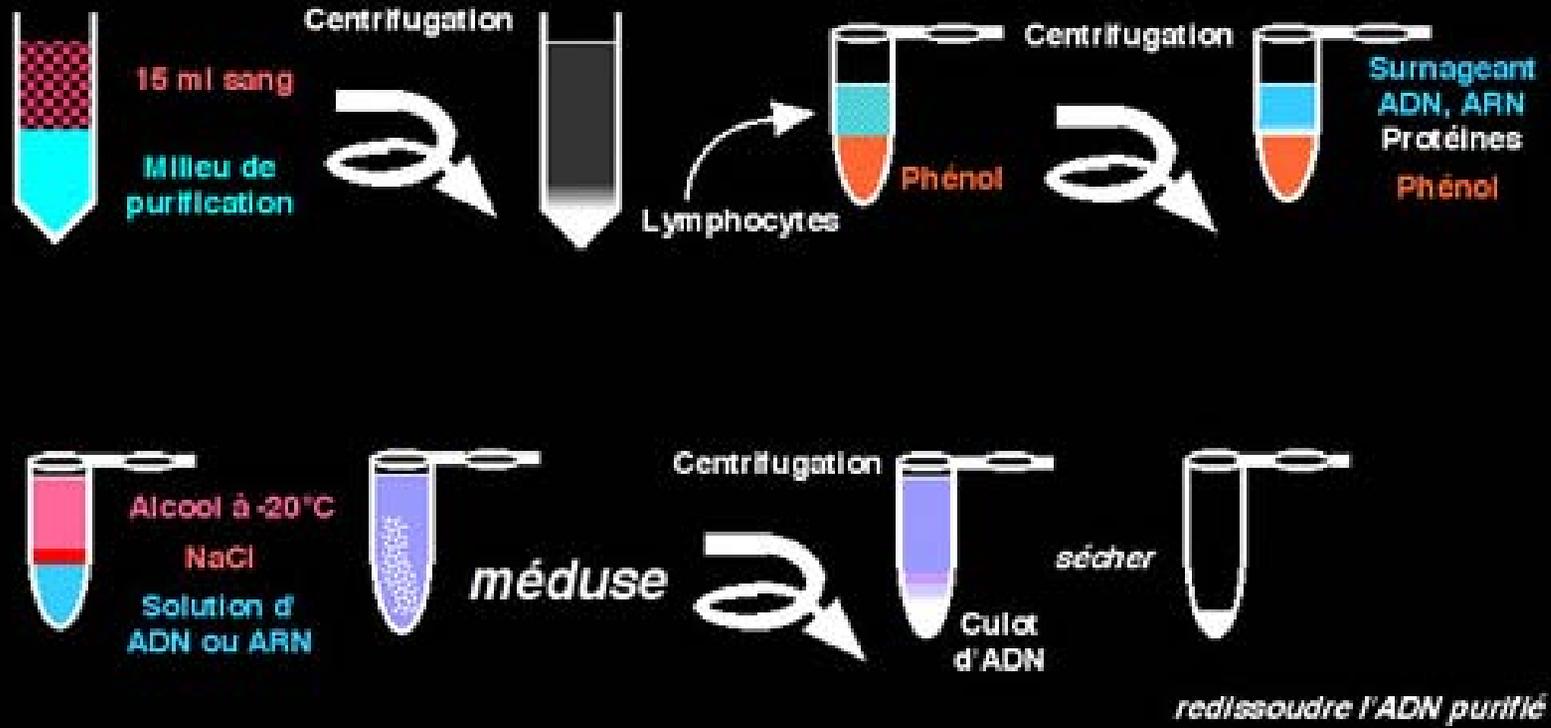
Extraction:

Destruction des structures tissulaires et de la membrane cellulaire

Purification:

- Isolement des protéines auxquelles l'ADN est associé
- Précipitation sélective de l'ADN

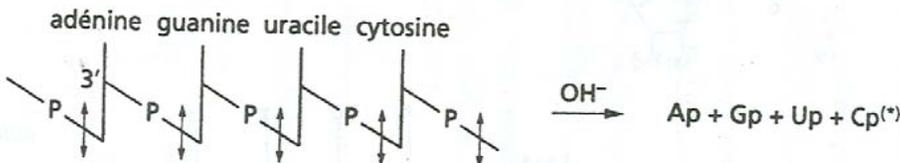
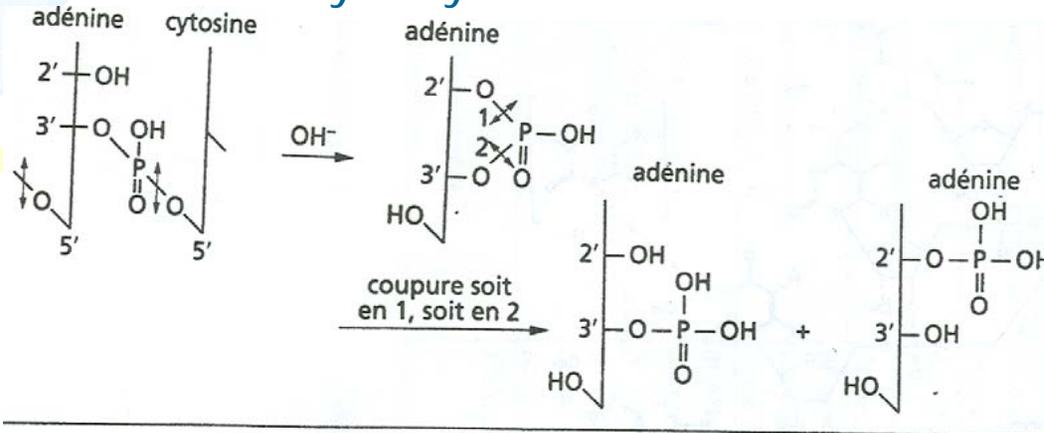
Extraction et purification du DNA



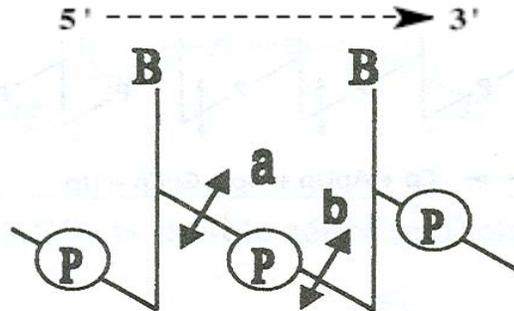
Hydrolyse chimique des Acides Nucléiques

Type d'hydrolyse chimique	Produits d'hydrolyse	
	ARN	ADN
<i>alcaline</i>	Nucléosides monophosphate (2' et 3')	_____
<i>acide</i> - pH 1 + chauffage - pH 4	Pentoses + phosphates + bases Bases puriques + acides nucléiques apuriniques	

Hydrolyse alcaline des ARN



Hydrolyse enzymatique des Acides Nucléiques



Types de coupures (a, b) d'un pont phosphodiester

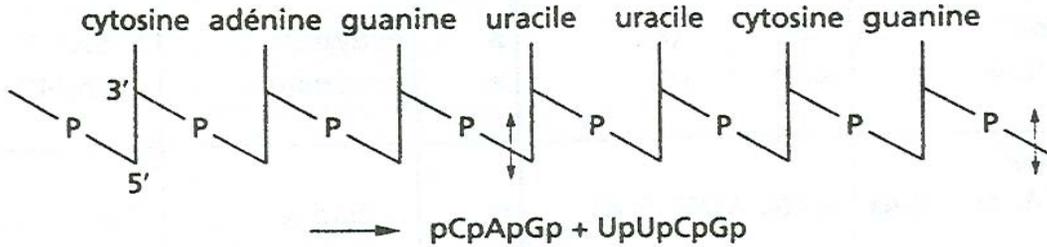
Exemple de nucléases avec leurs spécificités

Nucléases	Substrats	Coupure		Produits
		type	spécificité	
Exonucléases				
- Phosphodiesterase de venin de serpent	ARN, ADN (s)	a	extrémité 3'	5'-NMP , 5'-dNMP
- Phosphodiesterase de la rate	ARN, ADN (s)	b	extrémité 5'	3'-NMP , 3'-dNMP
- Exonucléase I d' <i>E. Coli</i>	ADN (s)	a	extrémité 3'	5'-dNMP
- Exonucléase III d' <i>E. Coli</i>	ADN (d)	a	extrémité 3'	5'-dNMP + ADN (s)
Endonucléases				
- Endonucléase S1 d' <i>Aspergillus oryzae</i>	ARN, ADN (s,d)	a	Aléatoire	5'-NMP + oligonucléotides 5'-P 5'-dNMP + oligonucléotides 5'-P
- Ribonucléase T1 d' <i>A. oryzae</i>	ARN (s)	b	-G↓N-	3'-NMP + oligonucléotide 3'-P
- Ribonucléase de pancréas	ARN (s)	b	Pyr↓N-	3'-NMP + oligonucléotides 3'-P
- DNase II de thymus	ADN (s)	b	dPyr↓dPur	désoxyoligonucléotides 3'-P

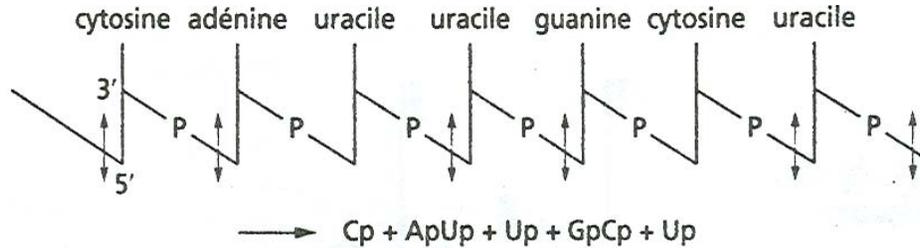
(S): simple brin, (d): double brin, N: nucléotide, NMP: nucléosides monophosphate, dNMP: désoxynucléosides monophosphates

Coupure de l'ARN par les nucléases

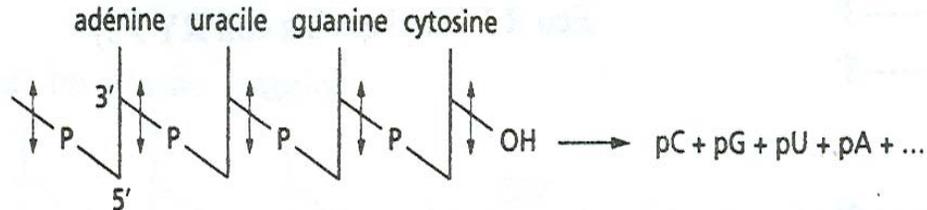
Hydrolyse par la ribonucléase T1



Hydrolyse par la ribonucléase pancréatique



Hydrolyse par la phosphodiesterase de venin de serpent

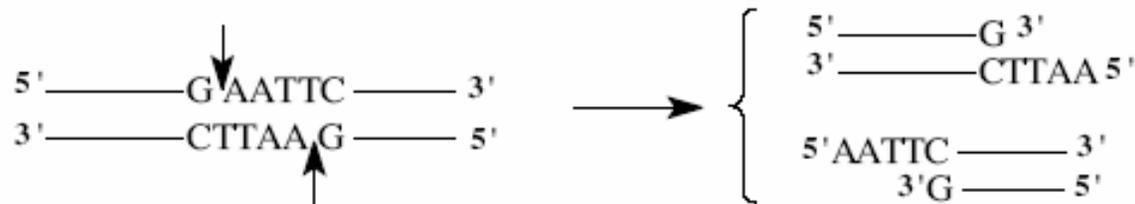


Coupure de l'ADN par les enzymes de restriction

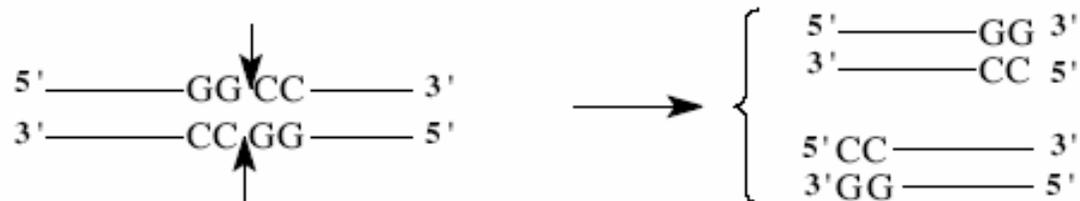
5'-----ACGCGT-----3'
palindromique
3'-----TGCGCA-----5'

ADN double brin : site

Voici deux exemples d'enzymes de restriction :



Hydrolyse par l'enzyme de restriction : EcoRI
site : GAATTC (coupure débordante)



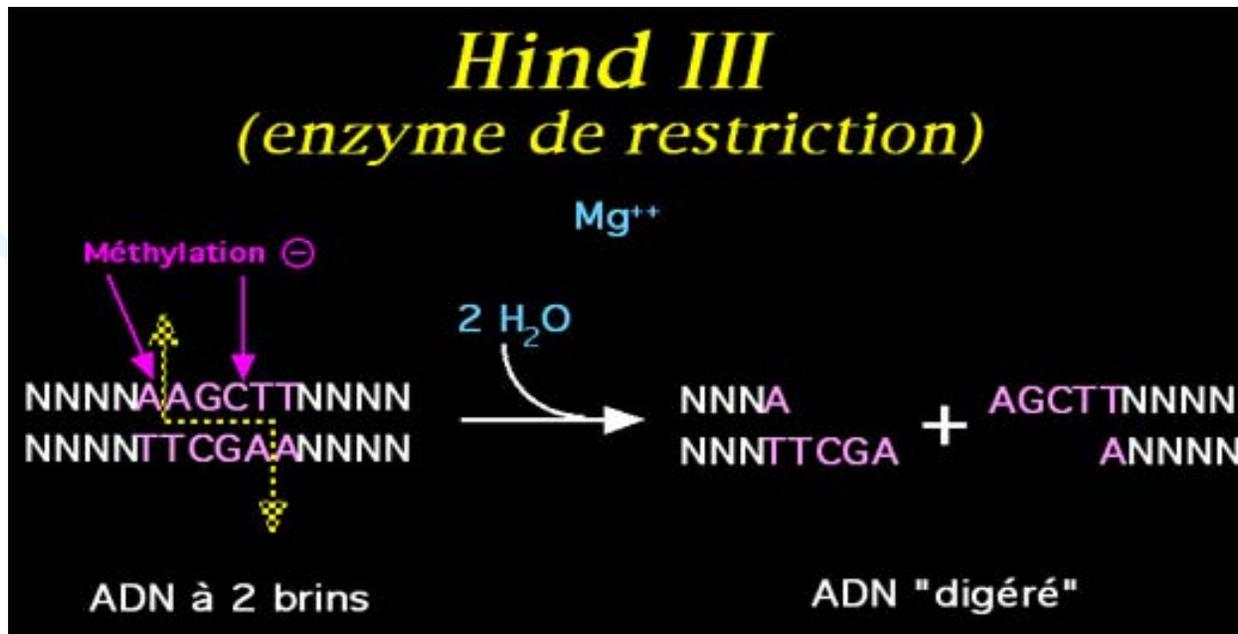
Hydrolyse par l'enzyme de restriction : HaeIII
site : GGCC (coupure franche)

Exemples d'enzymes de restriction et des séquences palindromiques de coupure :

- Eco RI : bouts cohésifs (collants)



- Sma I bouts non cohésifs (blunt ends) (francs)



Utilisation des enzymes de restriction

Exemple: Les enzymes Bam HI (G / GATCC) et Mbo I (/ GATC): Enzymes de restriction compatibles

Après action de Bam HI:

Premier fragment avant clivage par Bam HI:



Après clivage par Bam HI:



Après action de Mbo I:

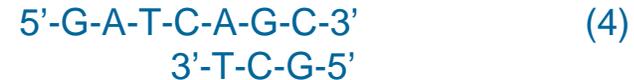
Second fragment avant clivage par Mbo I:



Après clivage par Mbo I



+



Ligatures: 1+4 et 2+3



Action d'autres enzymes sur l'ADN et l'ARN

Enzymes assurant la ligature

Ligases

Ligature par liaison ester d'un fragment avec un groupement phosphate en 5' et OH en 3' en présence d'ATP

Enzymes ajoutant ou enlevant des groupes phosphates

Kinases

Fixe un groupement phosphate à l'extrémité 5' en présence d'ATP

Phosphatases

Enlève le groupement phosphate situé à l'extrémité 5' d'une chaîne d'ADN

Enzymes recopiant les acides nucléiques

ADN Polymérase I

Synthèse d'un brin nouveau d'ADN en présence d'une amorce dans le sens 5'-3'. Elles possèdent des propriétés exonucléasiques 3'-5' (fonction d'édition).

Séquenase

Utilisée pour le séquençage d'ADN

Taq polymérase

Utilisée pour l'amplification de l'ADN

Transcriptase inverse

Synthétise, à partir d'un ARNm un ADN complémentaire

ARN polymérase

Réalisent des transcriptions de l'un des 2 brins d'ADN en un brin d'ARN