

Biochimie Structurale



Université Mohammed V
Faculté des Sciences
Rabat

ibi
laboratoire de biochimie
immunologie

Recommandations

Etre à l'heure

En cas de retard entrer discrètement sans déranger ses camarades

S'il y a perturbation de l'amphi ou la salle par les retardataires, l'enseignant se verra obliger d'empêcher ces derniers d'entrer

Prendre des notes lors des cours, TD et TP, pour compléter les photocopiés et faciliter la compréhension lors de vos révisions

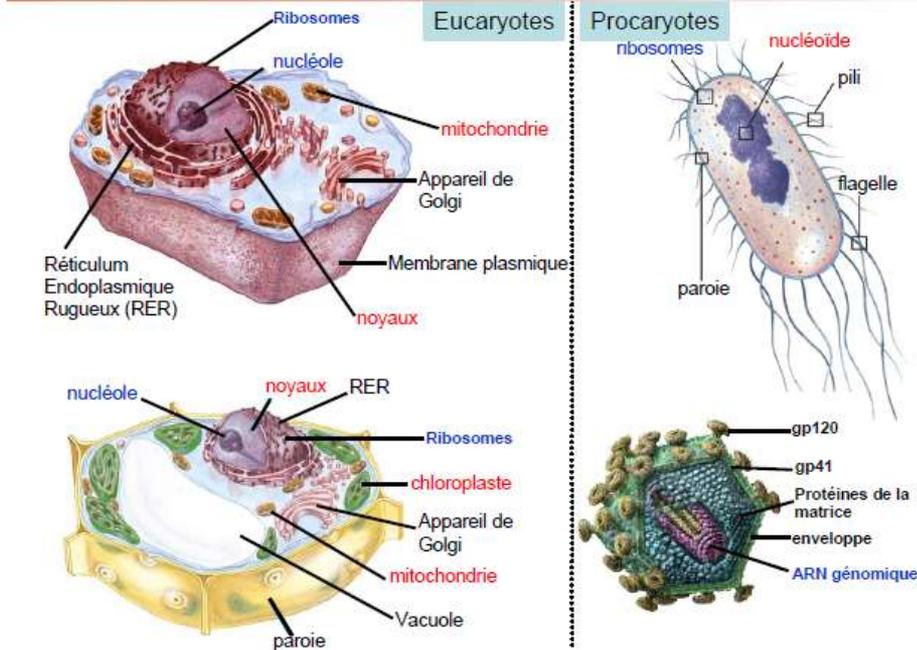
Réviser le cours régulièrement

La présence en TP est obligatoire

Préparer les TD et TP avant la séance



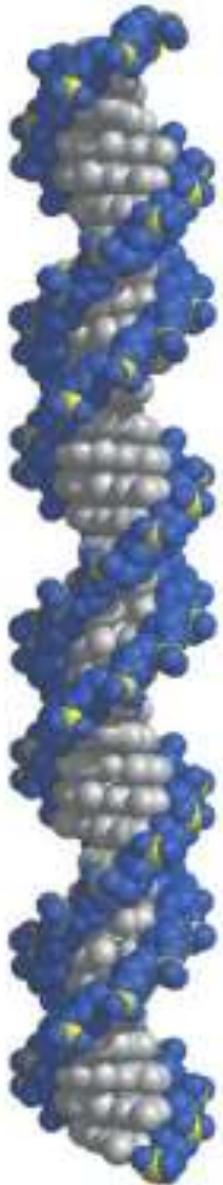
Ojectifs du module



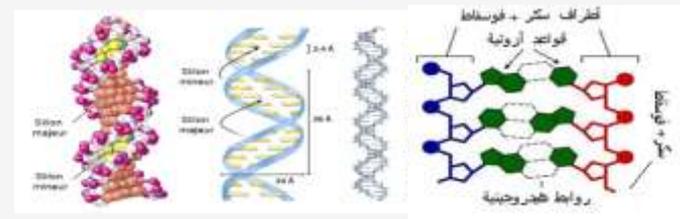
Etude des principaux composants des organismes vivants:

Les macromolécules

Acides Nucléiques



Biochimie Structurale
Module M15
SVI-S3
2013-2016



Pr. Latifa HILAL
Université Mohammed
Faculté des Sciences Rabat

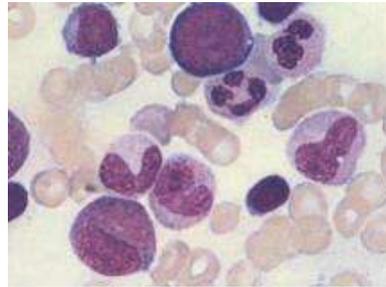
Aperçu sur le cours

- **Bref Historique**
- **Introduction**
- **Chapitre I. Composition des Acides Nucléiques**
- **Chapitre II. Structure et propriétés Physico-chimiques des Acides Nucléiques**

Bref historique

- 1871 : Miescher Mises une substance riche en phosphore qu'il a appelé "nucléine",
- 1882-1940 : Kossel et Levene : détermination de la nature de cette substance et sa composition
- Preuves que l'ADN constitue de matériel génétique
- 1950 : Chargaff : Quantités A+T et C+G rapports A/T et C/G sont constants, égaux et proches de 1.
- 1952 : dimensions modèle hélicoïdale de la molécule d'ADN proposés par Franklin et Wilkins :
- 1953 : Watson et Crick construisent le modèle la double hélice d'ADN et proposent un modèle de la réplication de la molécule d'ADN
- 1975 : nouvel âge d'or de la génétique: le génie génétique.
- 2001-2004: Séquençage complet du génome humain par 20 laboratoires à travers le monde (USA, Angleterre, France, Allemagne, Japon)

Miescher 1871



Mise en évidence d'une substance riche en phosphore appelée "**nucléine**", dans les noyaux de leucocytes de pus.



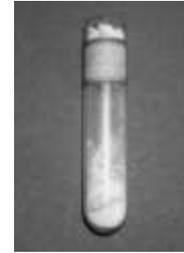
nucléine

Kossel et Levene

1882-1940



nucléine



Protéique

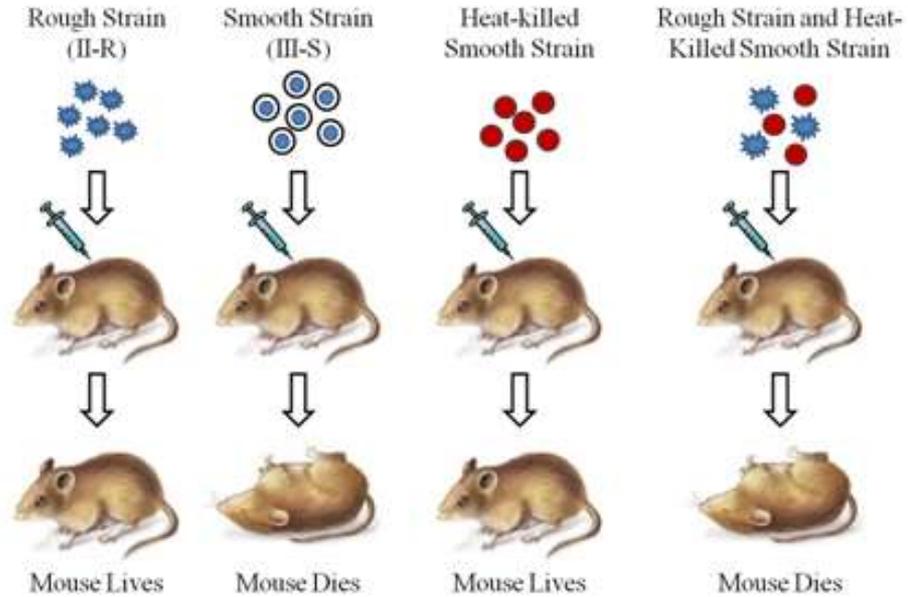
Acide

ADN



Composition de l'ADN

Griffith 1928



Existence d'une information génétique

se reproduit

détermine les
caractères d'une
cellule



Oswald Avery



Colin MacLeod



Maclyn McCarty

Bactérie R + Extrait d'ADN colonies S tuées → Bactéries S



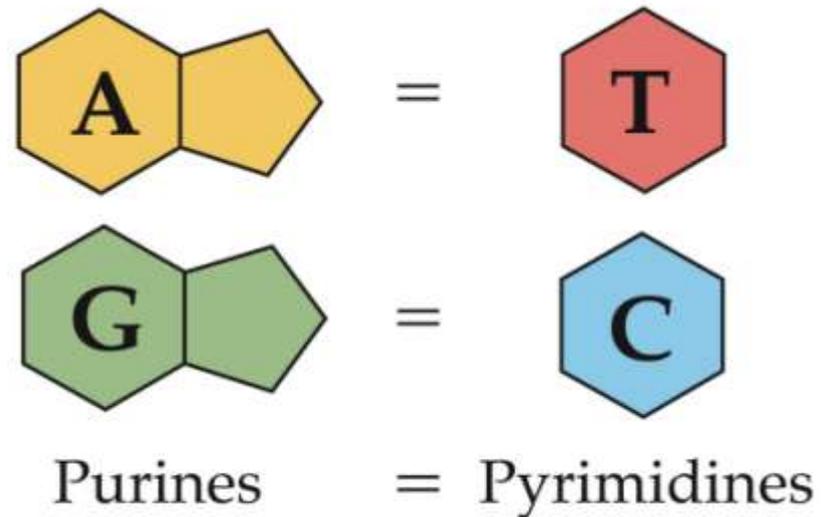
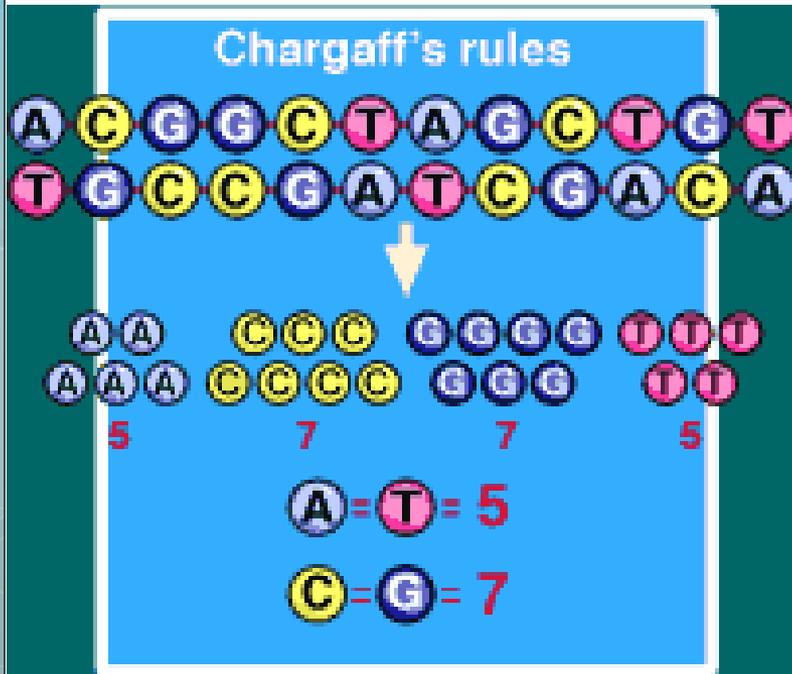
**L'ADN est le support de
l'information génétique
ADN détermine un caractère**

J. Exp Med 1944: 79:137-156





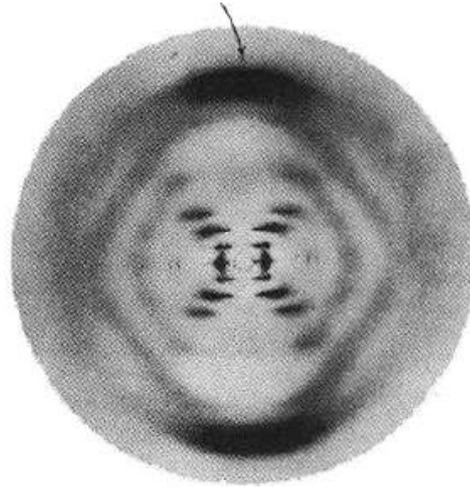
Règles de Chargaff



Rosalind Franklin



Clichés de Diffraction au
Rayons X d'ADN cristallisé



Structure hélicoïdale de l'ADN avec les bases azotées à l'intérieur et le squelette sucre-phosphate à l'extérieur.

Analyse des clichés de R. Franklin



Découverte de la structure physique de l'ADN : la double hélice d'ADN



MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribonucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribonucleic acid (DNA). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey. They kindly made their suggestions available to us in advance of publication. Their model consists of three inter-twined chains, with the phosphates near the bases, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagram is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) None of the two deoxyribose sugars in the model is in the same conformation as in the model.

Another three-chain structure has also been suggested by Finlay (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure, as described in paper submitted, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribonucleic acid. This structure has two helical chains each with a central axis and the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, assuming that each chain consists of phosphate diester groups joining 3'-deoxy-ribonucleoside residues with 5' hydrogens. The two chains do not, as they have been related by a spiral perpendicular to the chain axes. Both chains follow right-handed helices, but owing to the twist the segments of the chains in the two chains run in opposite directions. Each chain locally resembles Finlay's model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Finlay's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the stretched base. There

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the positive and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with substantial 2-complementarity. One of the pair must be a pyrimidic and the other a purimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: pyrimidine position 1 is pyrimidine position 6; purine position 6 is pyrimidine position 4.

It is assumed that the bases only come in the structure in the most planar configuration forms about it, with the base rather than the acid configuration. It is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine paired with thymine (pyrimidine), and guanine paired with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on the same sequence the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases are to be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

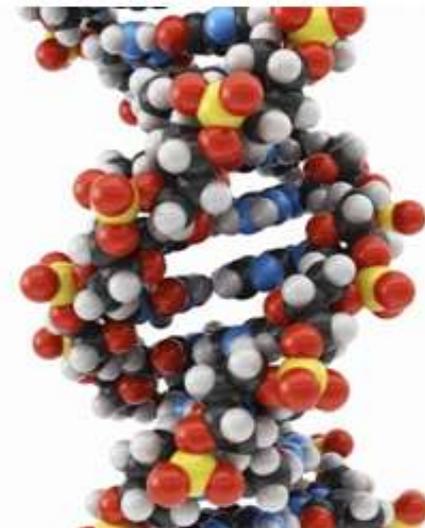
It has been found experimentally that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribonucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atoms would make two chains a unit for the Watson model.

The previously published X-ray data¹ on deoxyribonucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact methods. Some of these are given in the following observations. We were not aware of the details of the results presented there when we derived our structure, which runs mainly though not entirely on published experimental data and theoretical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material. Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of 30-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on inter-sugar distances. We have also been indebted for a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. S. R. Pleschke and their co-workers at



Publication de la structure de la double hélice dans la revue « Nature », 1953

Prix Nobel pour Watson et Crick, 1962

Acides nucléiques

```
graph TD; A[Acides nucléiques] --> B[Acides désoxyribonucléiques (ADN ou DNA)]; A --> C[Acides ribonucléiques (ARN ou RNA)];
```

Reproduction (réplication)

Information génétique
(développement, fonctionnement)

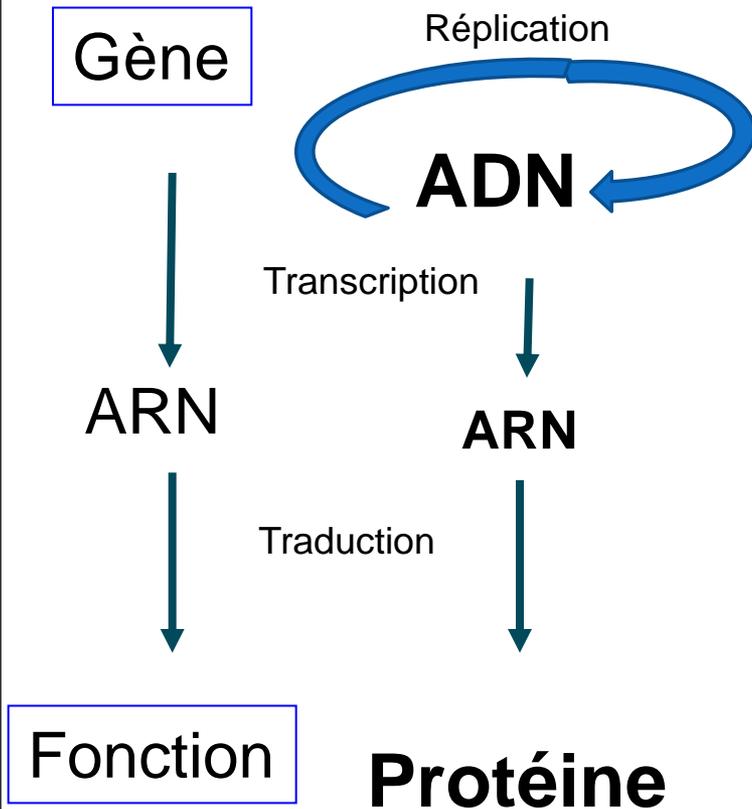
Détermination et transmission des caractères

Acides
désoxyribonucléiques
(ADN ou DNA)

Acides ribonucléiques
(ARN ou RNA)

Le "dogme central" de la biologie moléculaire

1953

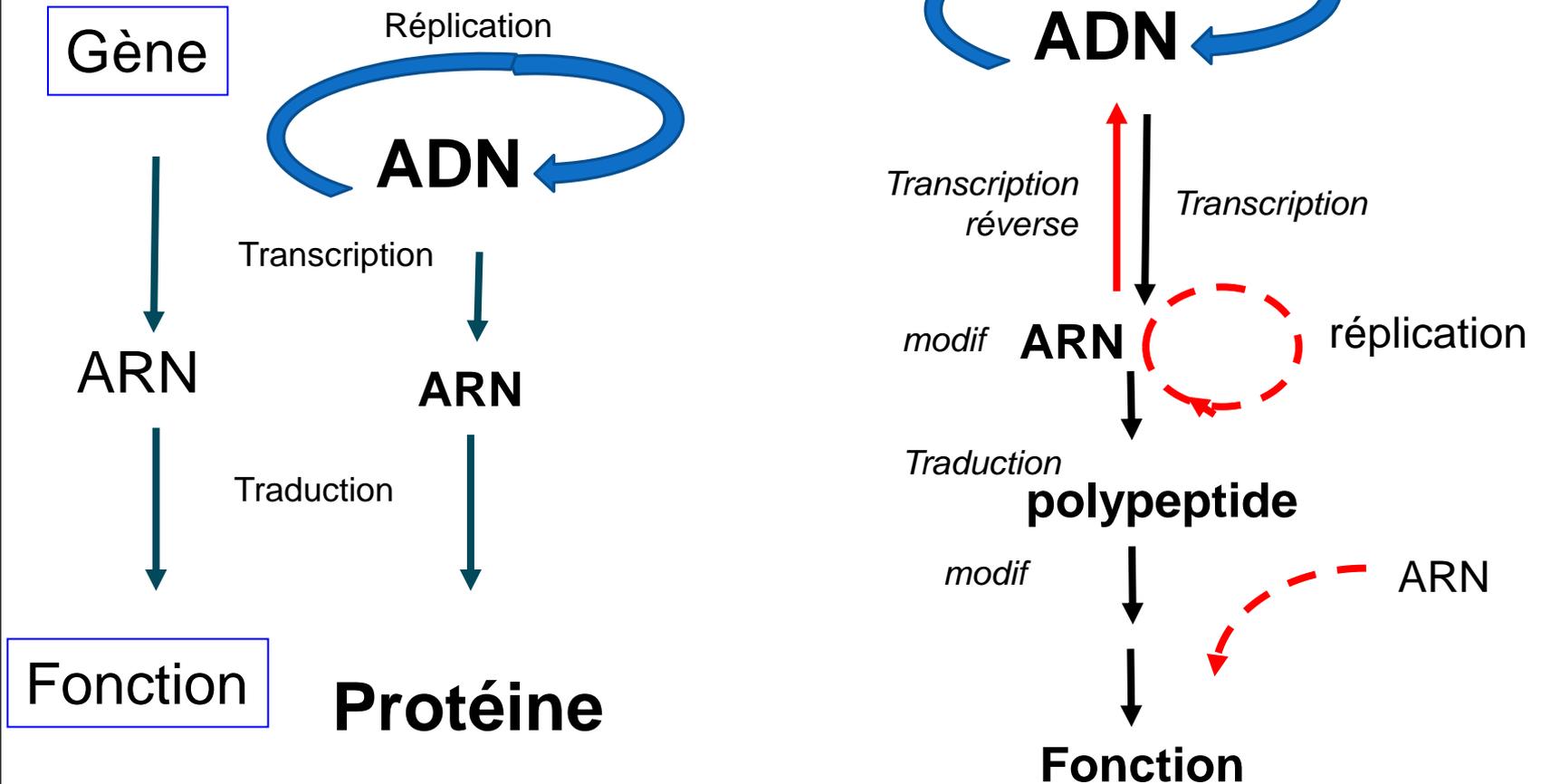


- Flux de l'information unidirectionnel
- Fonction principale de l'information génétique : diriger la synthèse des protéines.
- Une protéine assure une fonction par l'intermédiaire de l'ARN

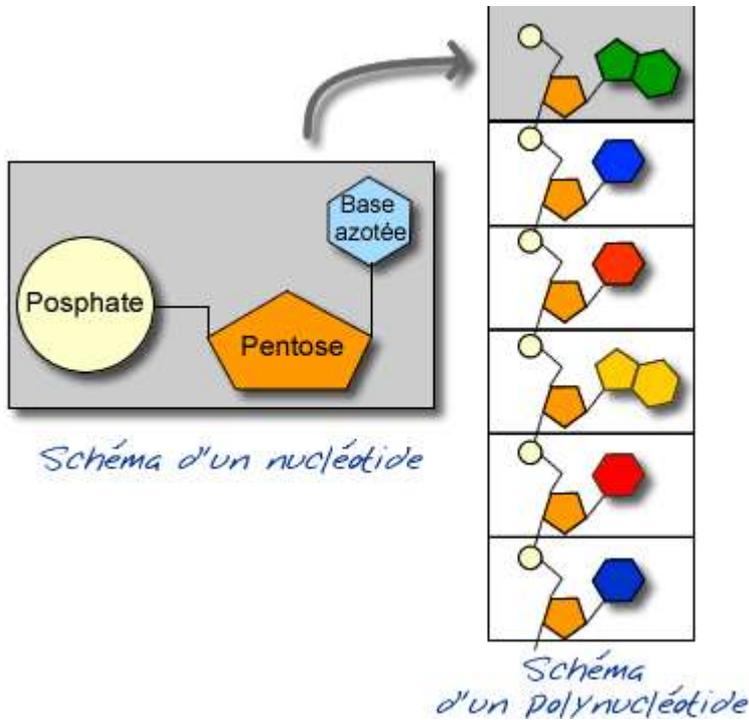
Le "dogme central" de la biologie moléculaire

1953

1970-1980

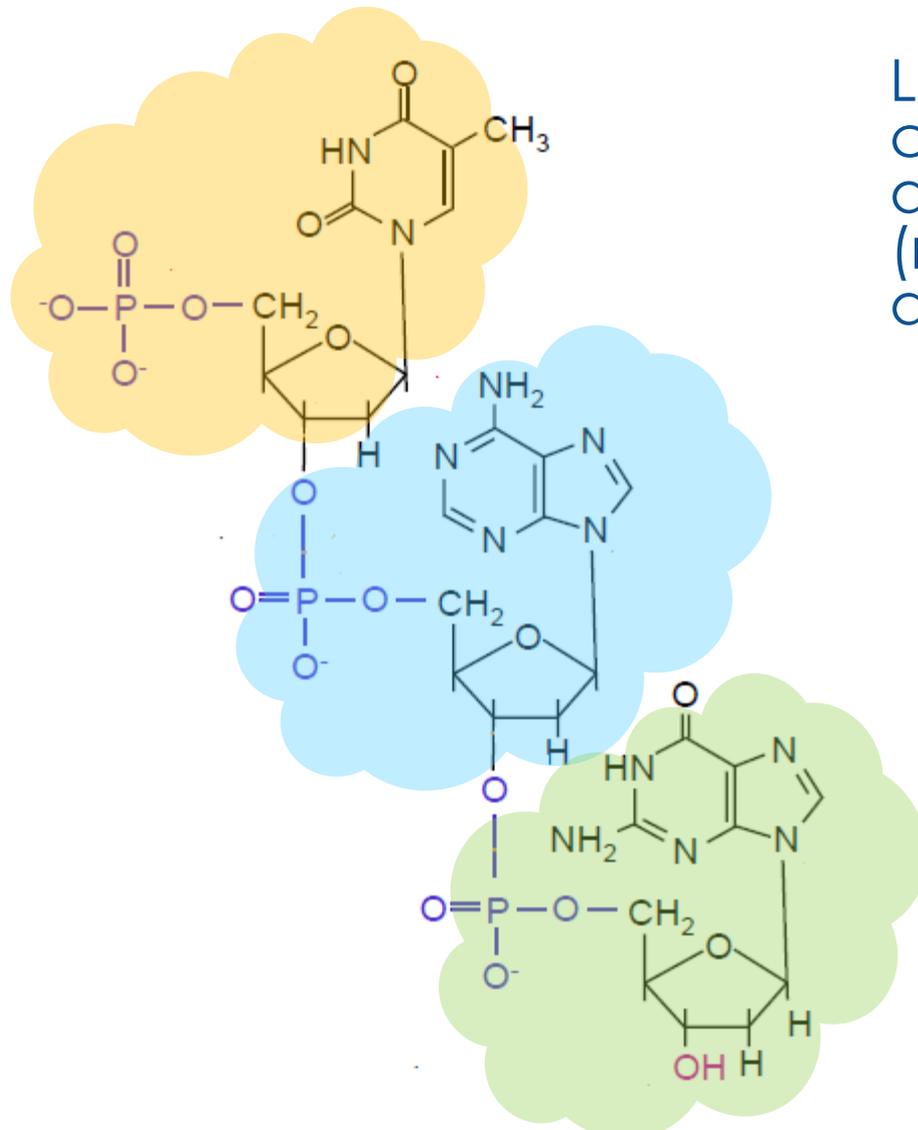


Chapitre I. Composition des Acides Nucléiques



1. Phosphates
2. Sucres
3. Bases Azotées
4. Nucléoside
5. Nucléotide
6. Nomenclature

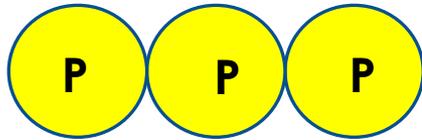
Composition des Acides Nucléiques



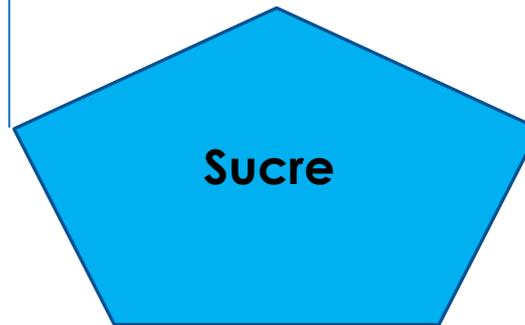
Les acides nucléiques sont constitués d'un polymère d'unités monomériques (molécules de bases) appelées **nucléotides**.

Nucléotide

un à trois résidus
d'acide
phosphorique



Purine ou pyrimidine

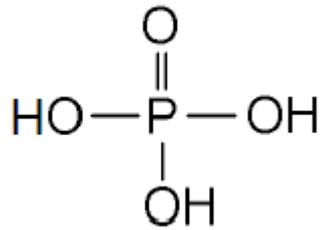


Sucre

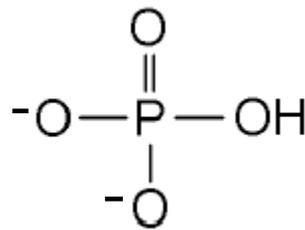
ribose ou désoxyribose

Les nucléotides sont synthétisés dans la cellule à partir de molécules précurseurs plus petites

1. Phosphates

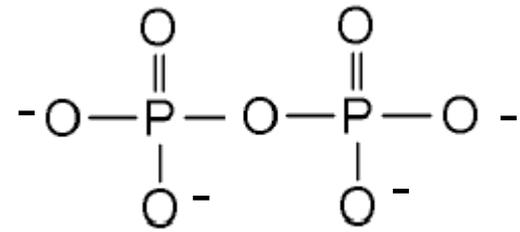


Acide phosphorique

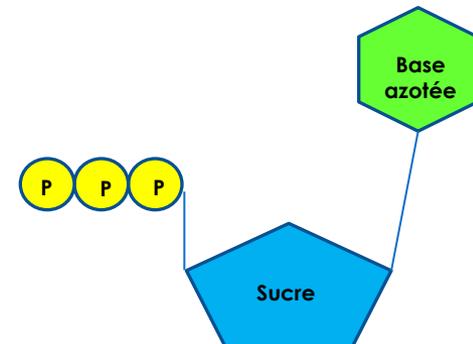


Phosphate

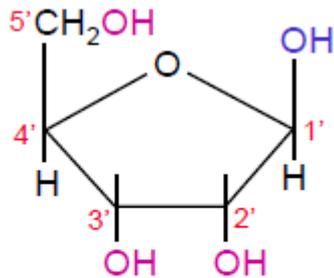
Forme majoritaire à pH
physiologique 7,4



pyrophosphate

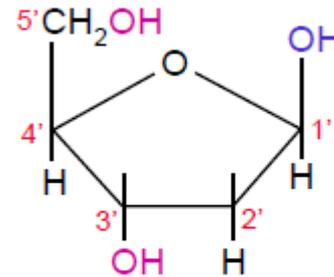


Le sucre est un pentose (5C)



β -D-Ribose

Dans l'ARN



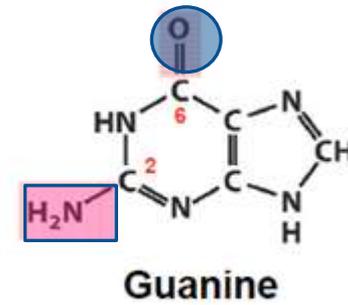
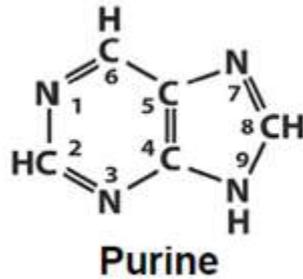
β -D-2' désoxyribose

Dans l'ADN

Bases Azotées

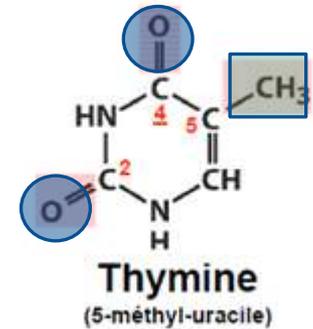
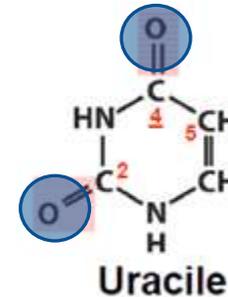
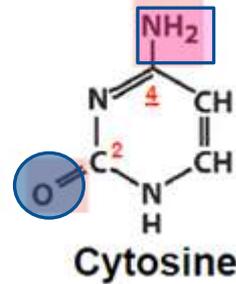
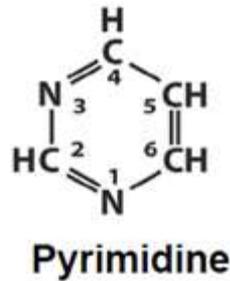
Bases puriques

Dérivent de la purine
(deux cycles)



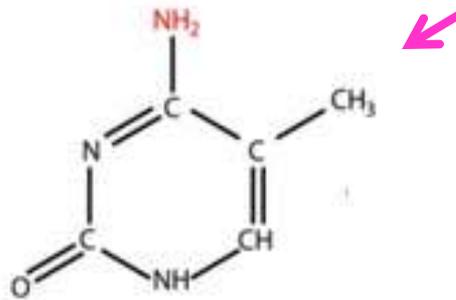
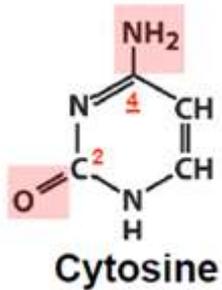
Bases Pyrimidiques

Dérivent de la pyrimidine
(un cycle)



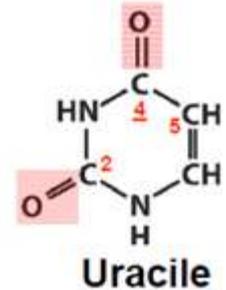
Bases modifiées retrouvées dans les Acides nucléiques

Exemples



5-méthylcytosine

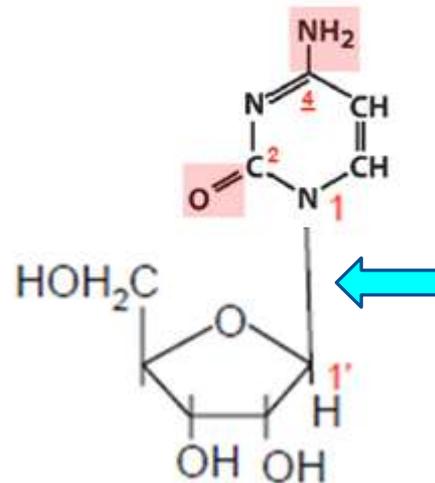
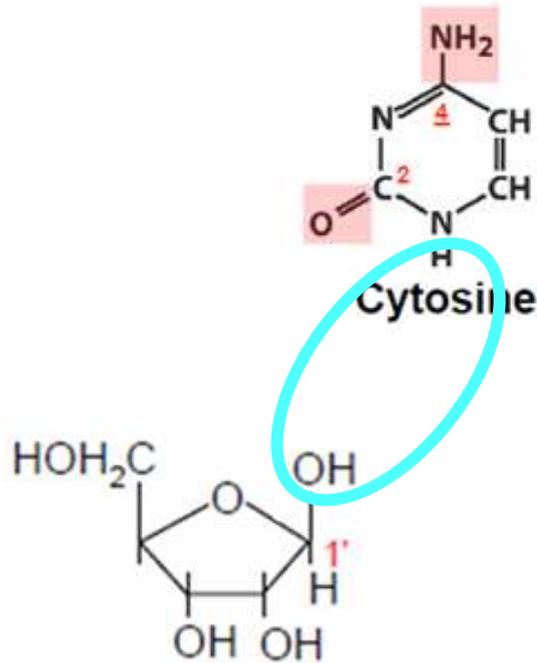
ADN
Plantes et animaux
(sauf insectes)



Pseudouracile

ARNt essentiellement

Formation d'un nucléoside

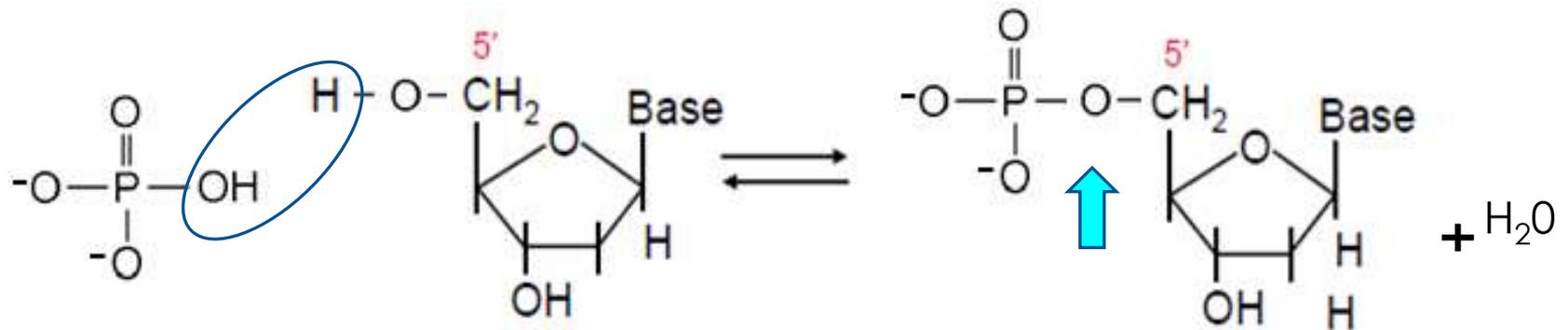


Liaison N-β osidique
entre carbone 1' du
pentose et l'azote **N9**
des purines ou **N1**
des pyrimidines

----- A compléter

base azotée + sucre = Nucléoside

Formation d'un nucléotide

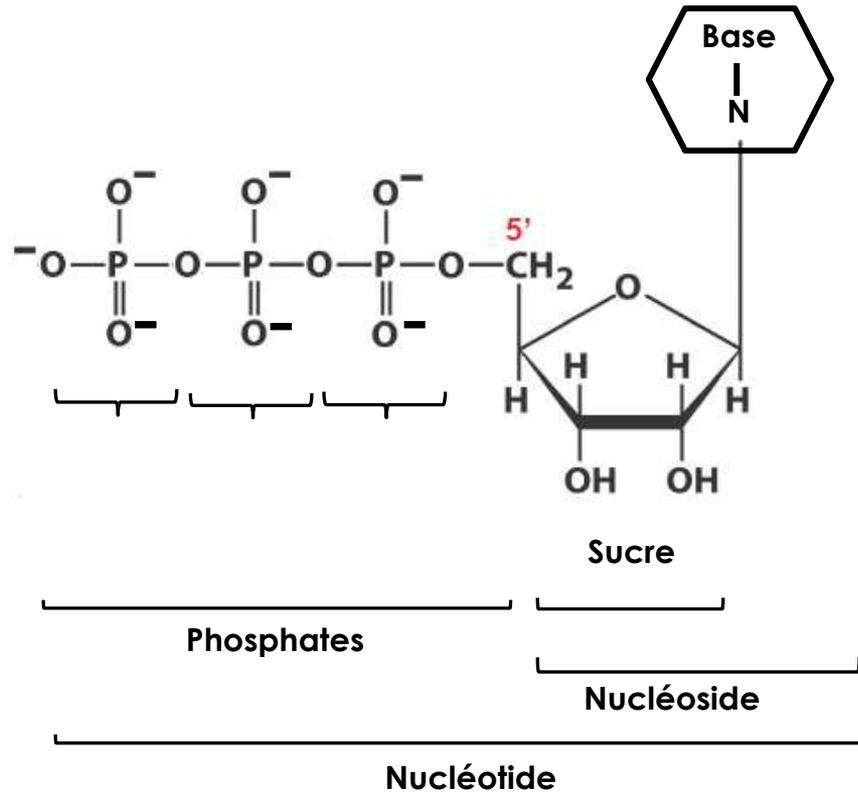


base azotée – sucre – Phosphate = Nucléotide monophosphate

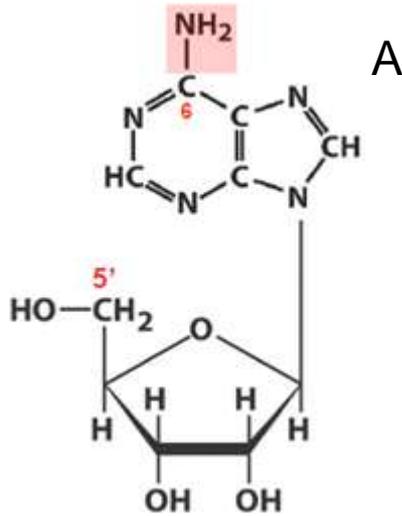
↑
Liaison ester

Cette liaison s'effectue par estérification (condensation alcool-acide) du carbone 5' du pentose par un groupement phosphate.

Nomenclature



Nomenclature



Adénosine

"**osine**" pour les nucléosides puriques

Adénosine

Guanosine

Ecrire la formule semi-développée de nucléoside constitué d'un désoxyribose et une thymine (thymidine)

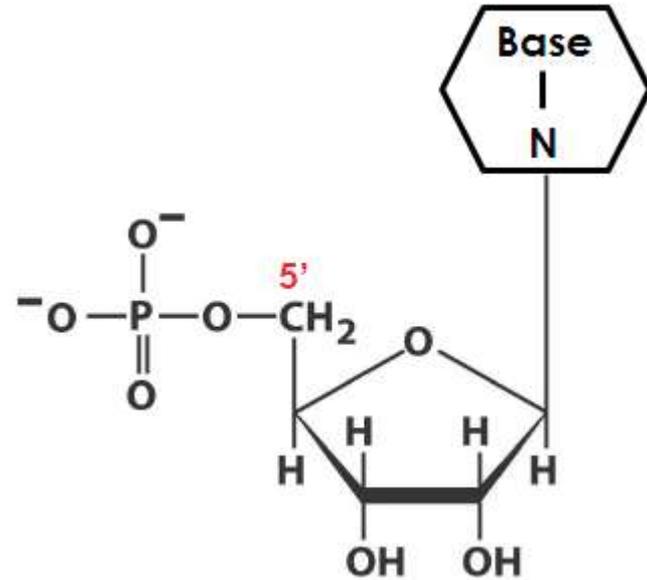
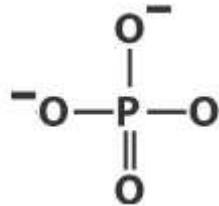
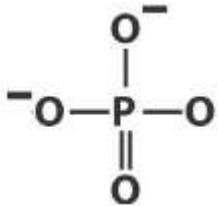
"**idine**" pour les nucléosides pyrimidiques

Cytidine

Uridine

Nucléotides

Nomenclature



Nucléotide 5' monophosphate

Nucléotide 5' diphosphate

Nucléotide 5' Triphosphate

A compléter

Nomenclature

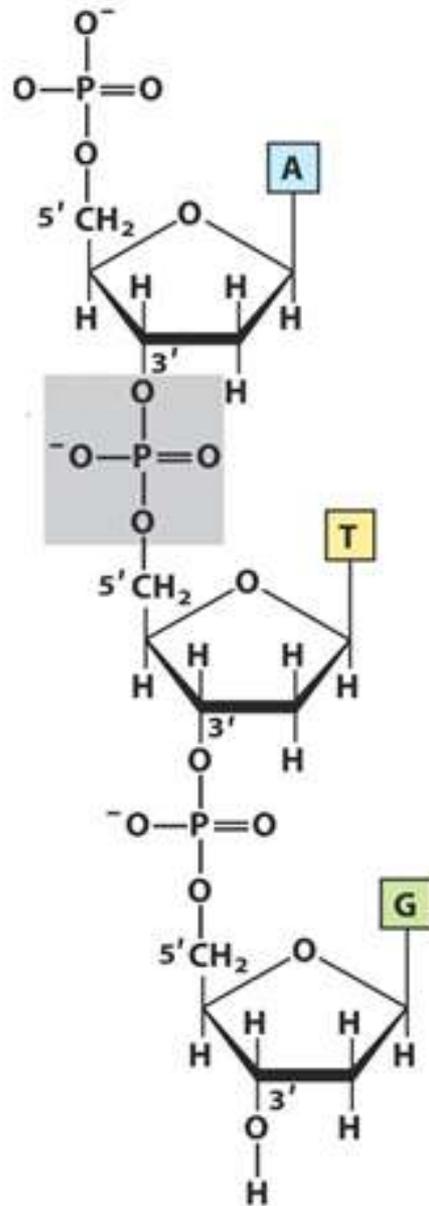
ARN

Base azotée	Ribonucleosides	Ribonucléotides 5' monophosphate	Ribonucléotides 5' diphosphate	Ribonucléotides 5' triphosphate
Adénine (A)	Adénosine	Adénosine monophosphate (AMP)	Adénosine diphosphate (ADP)	Adénosine triphosphate (ATP)
Guanine (G)	Guanosine	Guanosine monophosphate (GMP)	Guanosine diphosphate (GDP)	Guanosine triphosphate (GTP)
Uracile (U)	Uridine	Uridine monophosphate (UMP)	Uridine diphosphate (UDP)	Uridine triphosphate (UTP)
Cytosine (C)	Cytidine	Cytidine monophosphate (CMP)	Cytidine diphosphate (CDP)	Cytidine triphosphate (CTP)

Nomenclature

		ADN		ADN
Base azotée	Désoxyribonucleosides	Désoxibonucléotides 5' monophosphate	Désoxyonucléotides 5' diphosphate	Désoxyribonucléotides 5' triphosphate
Adénine (A)	Adénosine	Désoxyadénosine monophosphate (dAMP)	Désoxyadénosine diphosphate (dADP)	Désoxyadénosine triphosphate (dATP)
Guanine (G)	Guanosine	Désoxyguanosine monophosphate (dGMP)	Désoxyguanosine diphosphate (dGDP)	Désoxyguanosine triphosphate (dGTP)
Thymine (T)	thymidine	Désoxythymidine monophosphate (dTMP)	Désoxythymidine diphosphate (dTDP)	Désoxythmidinetriphosphate (dTTP)
Cytosine (C)	Cytidine	Désoxycytidine monophosphate (dCMP)	Désoxycytidine diphosphate (dCDP)	Désoxycytidine triphosphate (dCTP)





Chapitre II. Structure et Propriétés des Acides Nucléiques

I. Acide désoxyribonucléiques

1. Structure Primaire
2. Structure secondaire de l'ADN : la double hélice
3. Propriétés physico-chimiques des acides nucléiques
 - 3.1.

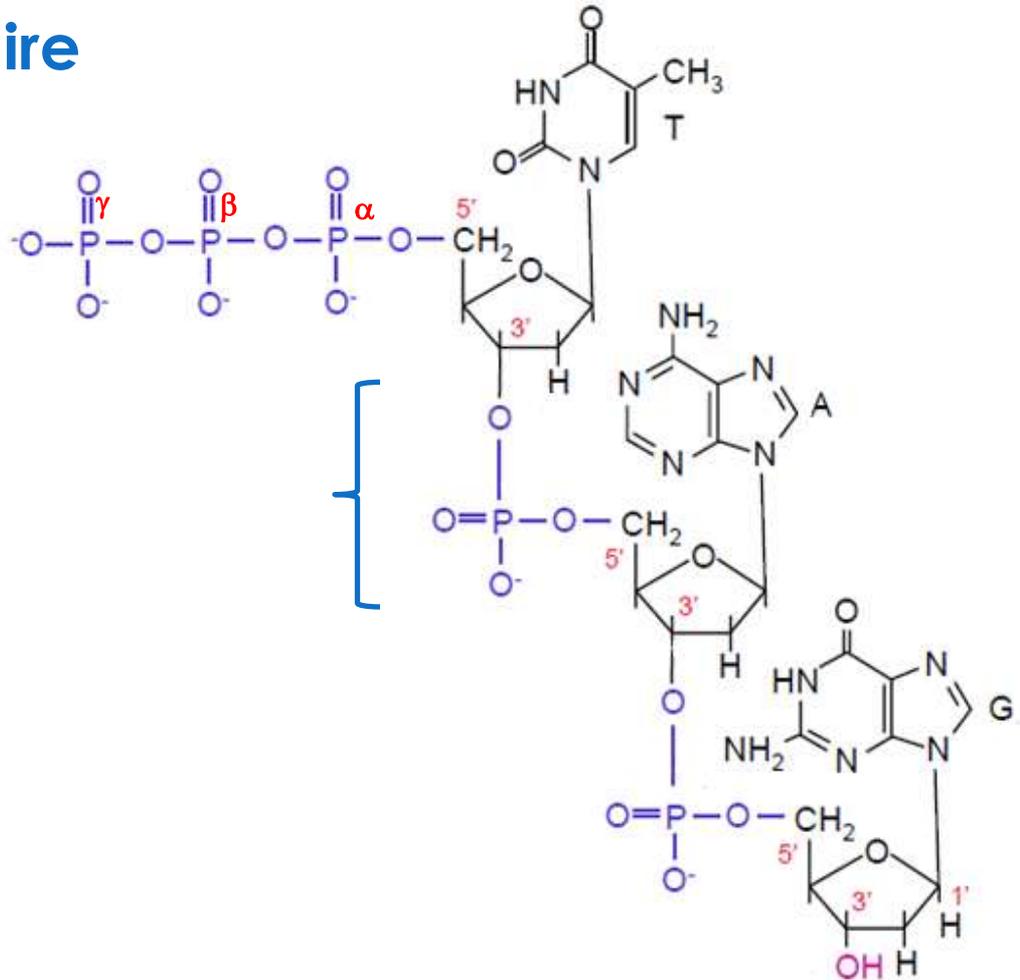
II . Acides ribonucléiques

1.1 Structure primaire

Extrémité 5' Phosphate

Liaison phosphodiester

Extrémité 3' OH

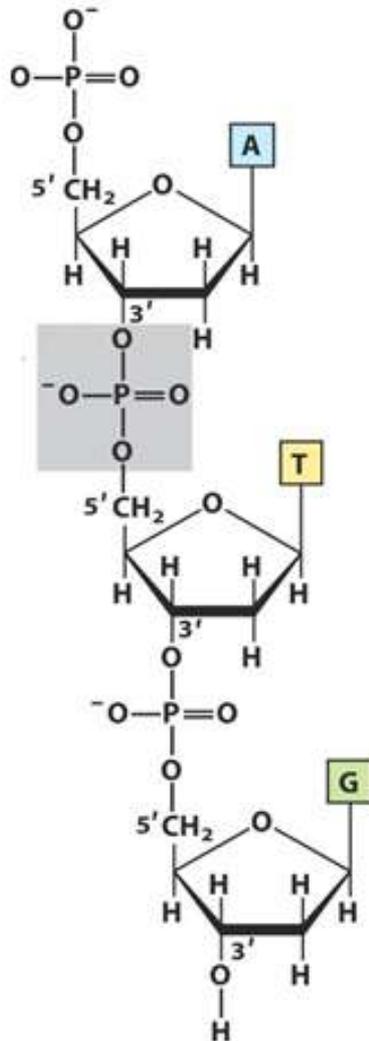


Le brin d'ADN est un polymère de désoxyribonucléotides monophosphates reliés entre eux par des liaisons **3',5'- phosphodiester** (relient le carbone 3' du désoxyribose d'un nucléotide au carbone 5' du désoxyribose du nucléotide suivant).

1.1 Structure primaire

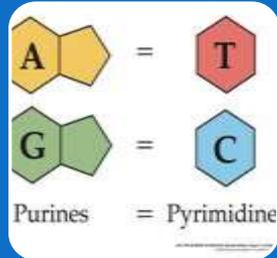
Caractéristiques du brin d'ADN (ou chaîne d'ADN)

P
I
S - B
I
P
I
S-B
I
P
I
S - B



- L'alternance pentose-Phosphate constitue le squelette de l'ADN sur lequel sont accrochées les bases azotées
- Le brin d'ADN possède une polarité: il a une **extrémité 5'-phosphate** et une extrémité **3'-OH**.

Ce que l'on savait sur l'ADN



Chargaff 1950

ADN constitué de 4 types de nucléotides contenant 4 bases A, T, C, G

A=T , C=G

A+T/C+G varie selon espèce

très grande importance dans la structure secondaire de l'ADN



Rosalind Franklin et Wilkins 1952

Diffraction aux RX d'ADN cristallisé montre une répétition tous les 34Å°

Proposition d'une structure hélicoïdale

Ce que l'on ne savait pas : Structure de la molécule l'ADN

Pourcentage des bases dans différents organismes

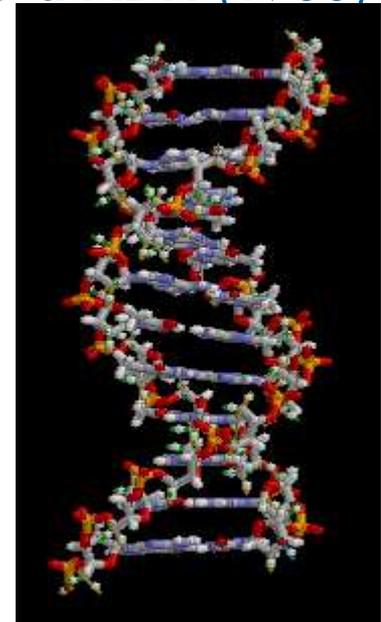
Pourcentage Organisme	A	T	G	C	rapport A+T/G+C
E. coli	26,0	23,9	24,9	25,2	1,00
Levure	31,3	32,9	18,7	17,1	1,79
Rat	28,6	28,4	21,4	21,5	1,33
Homme	30,3	30,3	19,9	19,8	1,52

1.2 Structure secondaire

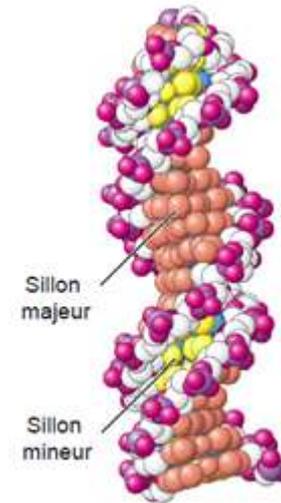
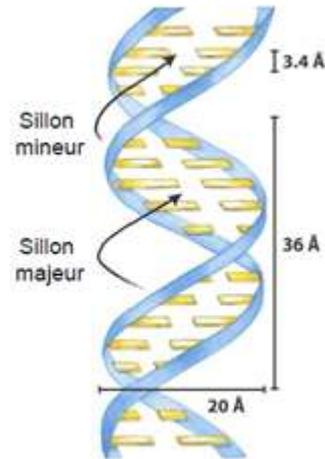
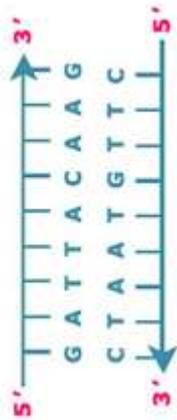
Analyse des clichés de Rosalind Franklin par Watson et Crick



Découverte de la
double hélice d'ADN (1953)



1.2 Structure secondaire: la double hélice d'ADN

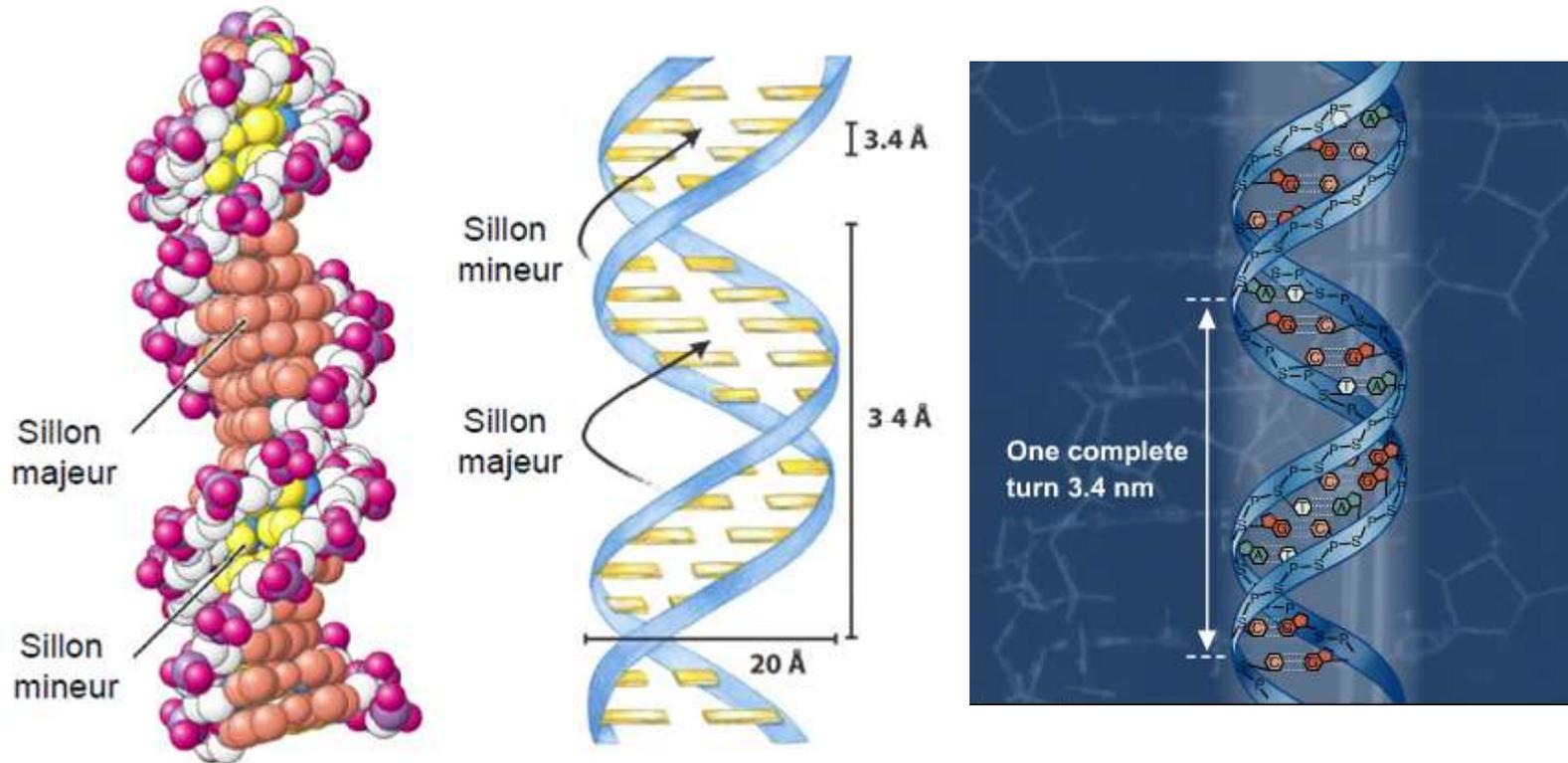


Représentations
schématiques

Modèle
moléculaire

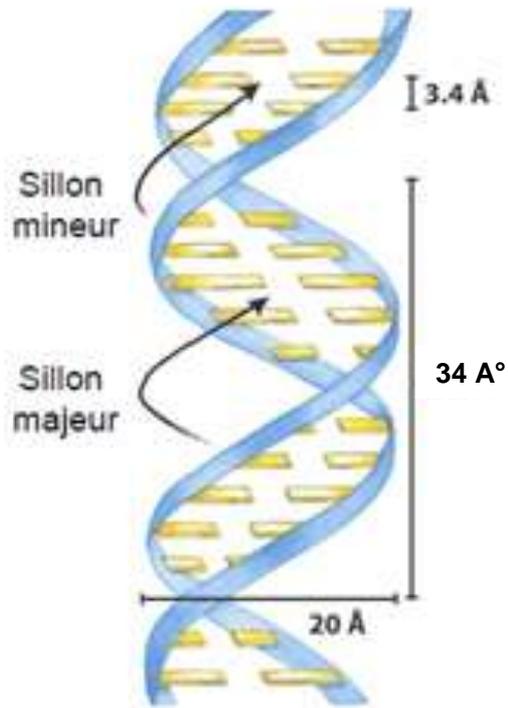
La molécule d'ADN est constituée de **deux chaînes d'ADN** (ou brins d'ADN) qui s'enroulent autour d'un axe formant une conformation hélicoïdale appelée **double hélice d'ADN**.

1.2 Structure secondaire



- Le diamètre de l'hélice est de 20 Å (2 nm).
- Un tour d'hélice mesure 34 Å (3,4 nm) ;
- La distance entre deux nucléotides est de 3.4 Å. Il y a donc 10 à nucléotides par tour d'hélice.

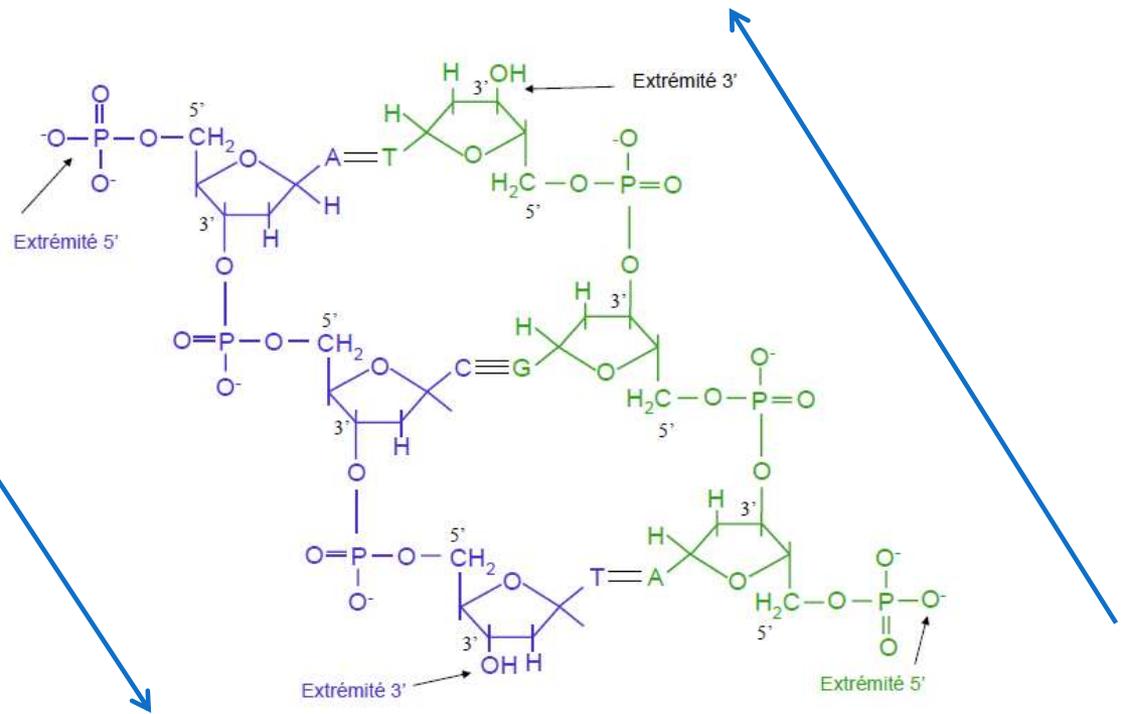
1.2 Structure secondaire: la double hélice d'ADN



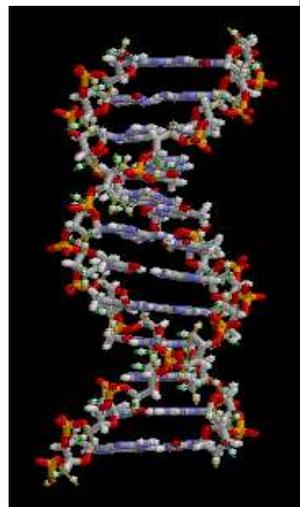
- L'hélice tourne à droite
- deux sillons inégaux : le grand sillon (sillon majeur) et le petit sillon ou sillon mineure)

1. ADN

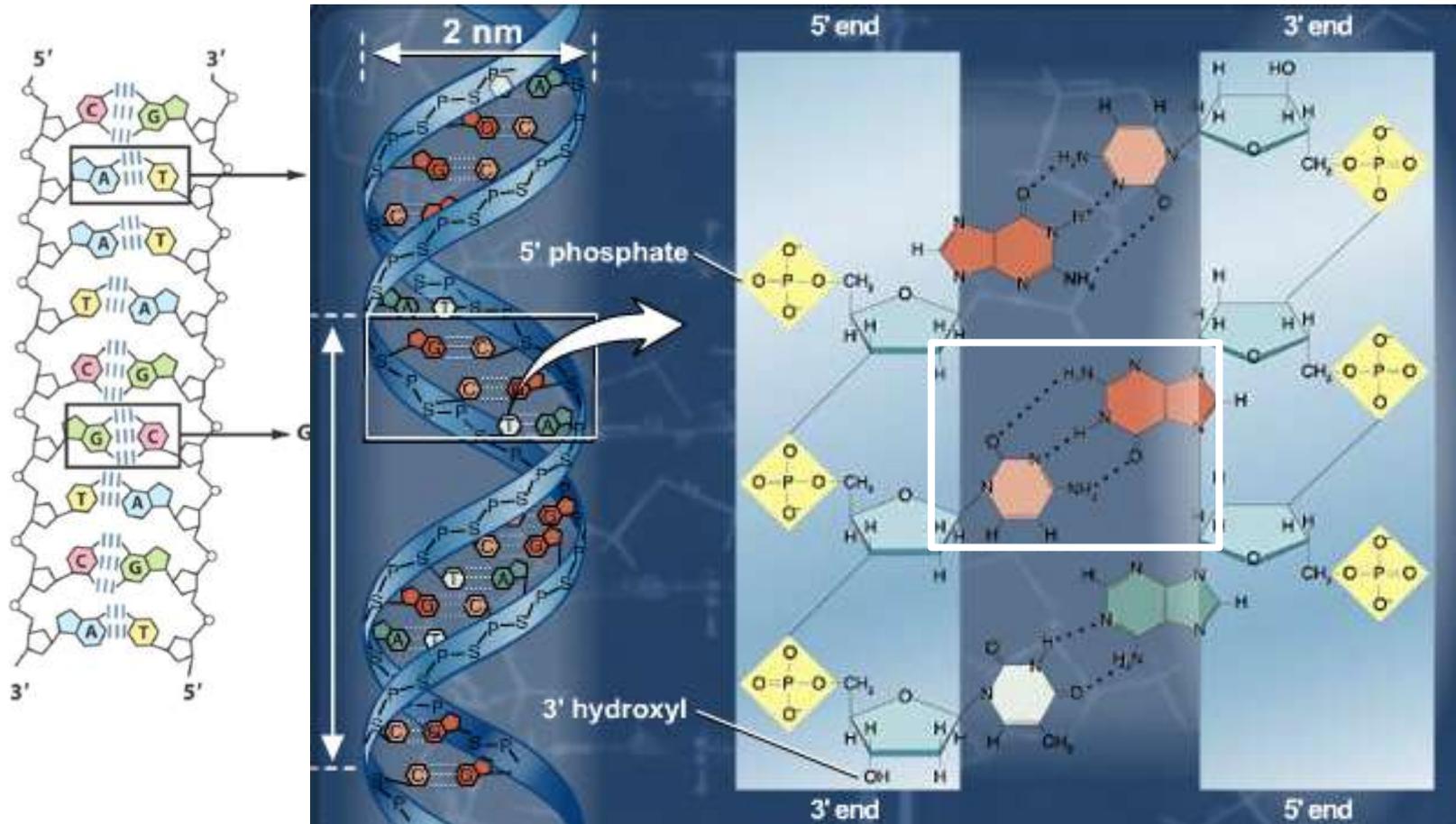
1.2 Structure secondaire



Les deux chaînes sont antiparallèles

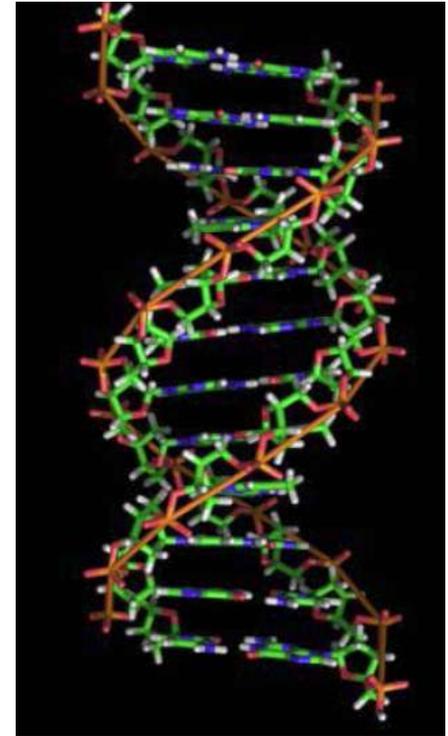
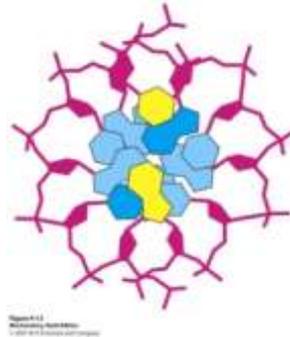
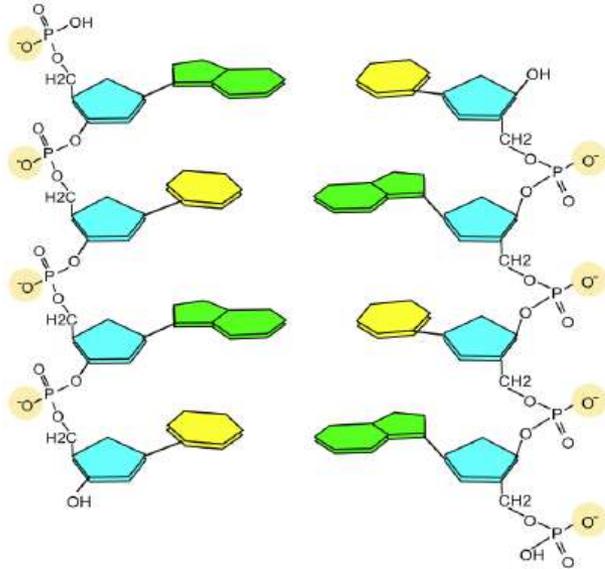


1.2 Structure secondaire



- Les deux chaînes sont stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les bases
- Il existe une complémentarité des bases : A-T et C-G

1.2 Structure secondaire



Dans la double hélice les bases azotées complémentaires sont

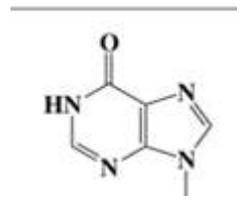
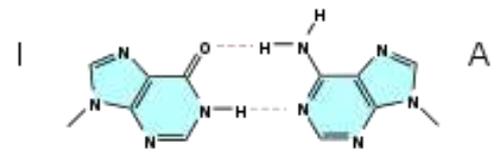
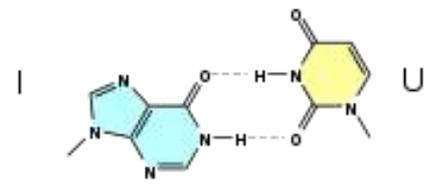
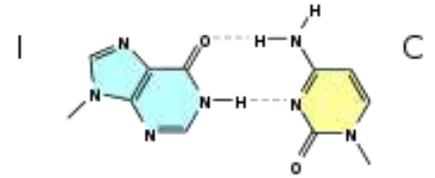
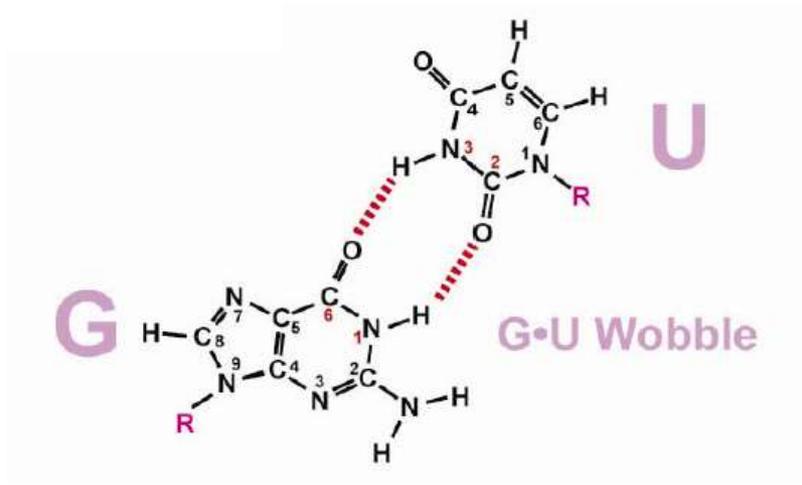
- à l'intérieur de l'hélice
- situées sur le même plan
- perpendiculaires à l'axe de l'hélice

Le plan des oses est perpendiculaire à celui des bases



1. ADN

Appariement non conventionnel
« wobble »



Dans l'inosine
adénine
modifiées

Chapitre II. Structure et Propriétés des Acides Nucléiques



I. Acide désoxyribonucléiques

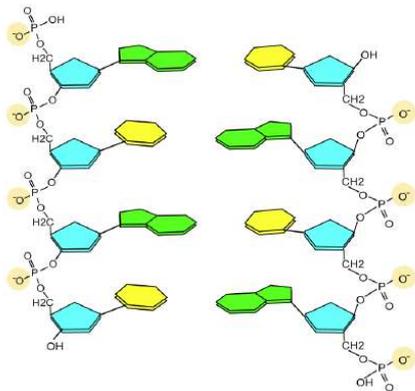
1. Structure Primaire
2. Structure secondaire de l'ADN : la double hélice

3. Propriétés physico-chimiques des acides nucléiques

- 3.1. Solubilité
- 3.2. Poids Moléculaire
- 3.3. Absorption dans la lumière ultraviolette
- 3.4. Dénaturation/Renaturation
- 3.5. Effet hyperchrome de l'ADN
- 3.6. Densité
- 3.7. Hydrolyse des Acides nucléiques

3.1. Solubilité

- Sont chargés négativement en raison des groupements phosphate
- solubles dans l'eau sous forme de sels de sodium
- viscosité élevée dans l'eau.
- précipitent dans l'éthanol en présence de sel de sodium (neutralise charges -)



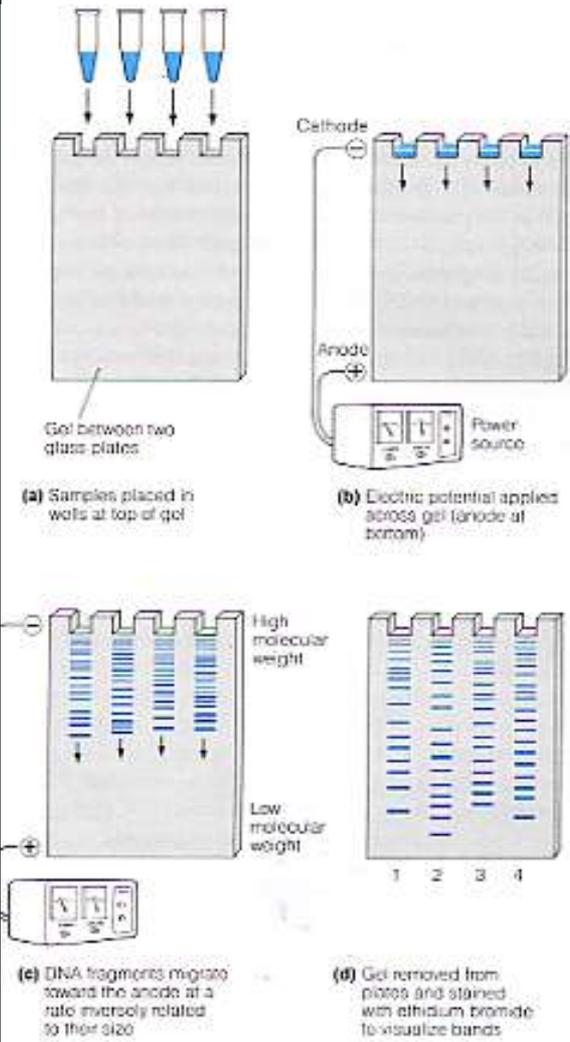
Na⁺

Ethanol

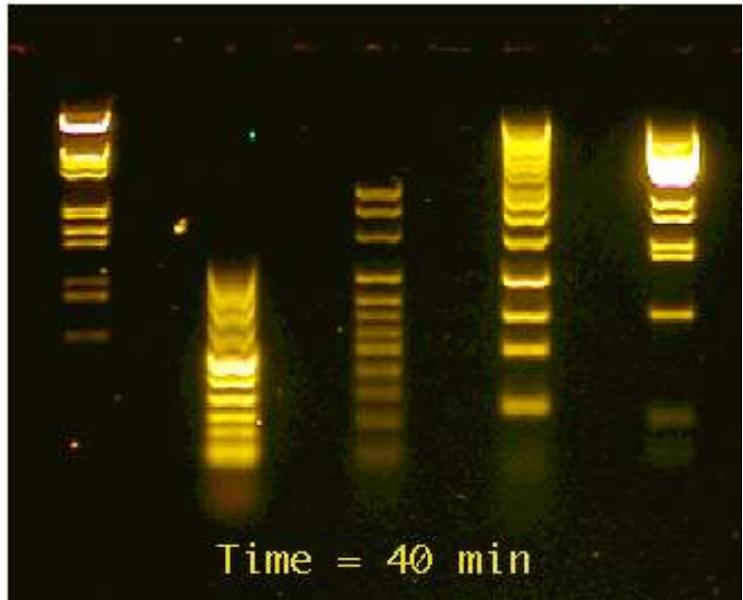
→ Pelote d'ADN
(Ou méduse)



Poids moléculaire



- La taille de l'ADN peut être déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose ou gel de polyacrylamide.



Électrophorèse sur gel d'agarose.

3.3. Absorption dans la lumière ultra-violette

Comment détermine-t-on la longueur d'onde maximale à laquelle absorbe une molécule ?

On réalise un spectre d'absorption.

Comment?

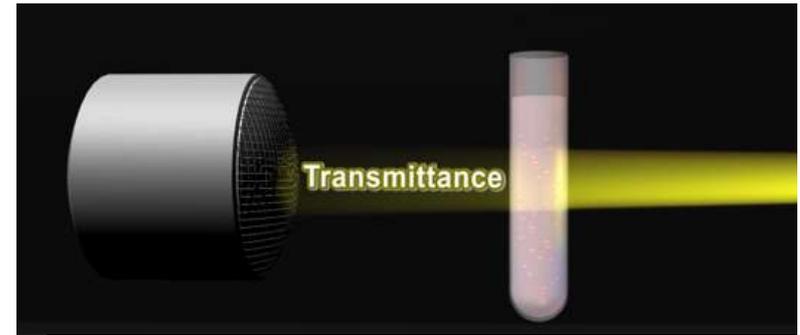
On fait varier la longueur d'onde et on note la densité optique d'une solution en utilisant un spectrophotomètre

On trace la courbe représentant la densité optique en fonction de la longueur d'onde

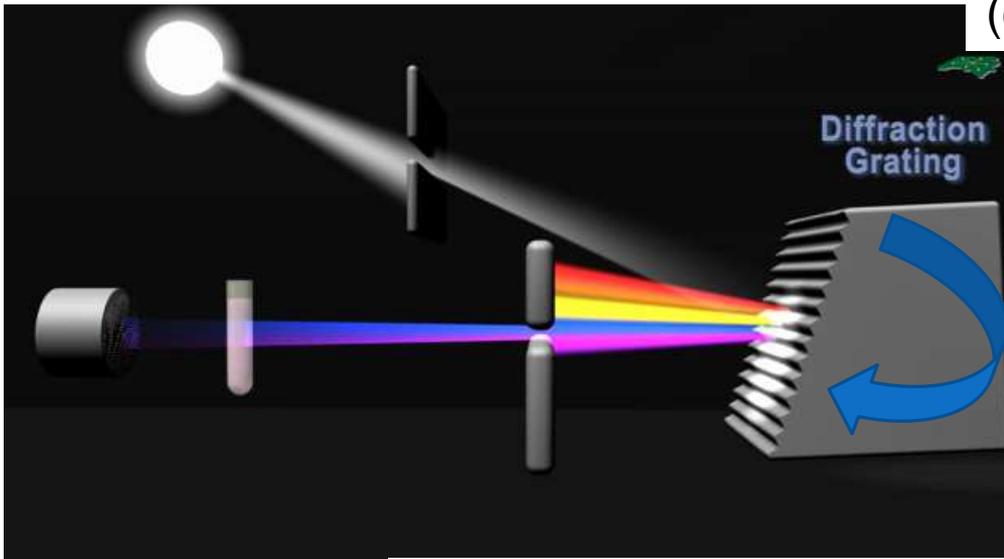
Principe du spectrophotomètre



Source lumineuse



La transmission est inversement proportionnelle à l'absorption (densité optique)



Détecteur

Prisme mobile permettant la diffraction de la lumière

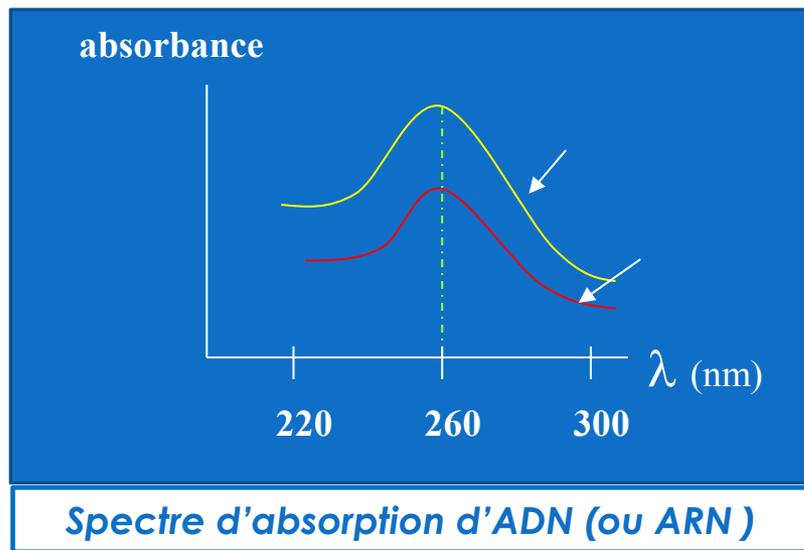


$$D_{0_{380\text{nm}}} =$$

3.3. Absorption dans la lumière ultra-violette



<https://www.youtube.com/watch?v=xHQM4BbR040>



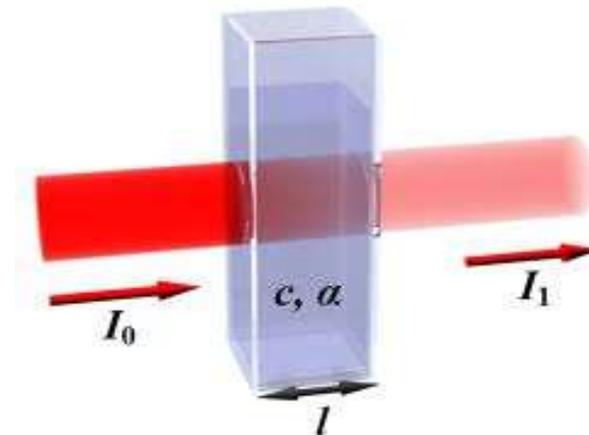
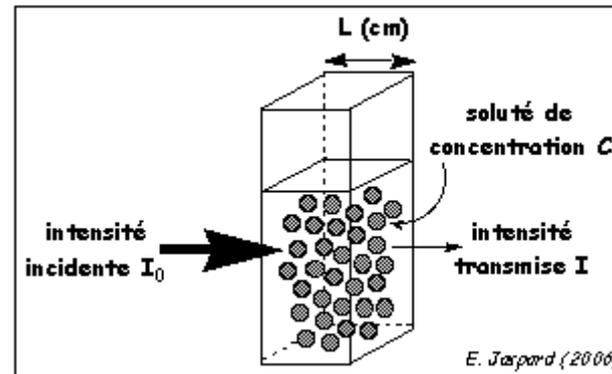
L'ADN et l'ARN Absorbent dans les **UV** avec un maximum à **260 nm**.

- Loi de Beer-Lambert : DO proportionnelle à la concentration

$$DO = \log (I_0/I) = \epsilon \cdot l \cdot C$$

ϵ = coefficient d'extinction ou d'absorbance (qui dépend de la longueur d'onde)

ϵ_M en $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ si c en en M moles,
 → coefficient d'extinction molaire



Dénaturation/ renaturation de l'ADN



ADN double brin
ADN bicaténaire
ADN duplex

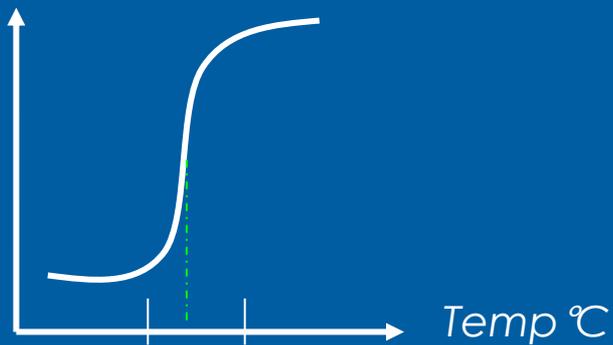
Chaleur

Dénaturation
Fusion



ADN simple brin
ADN monocaténaire
ADN simplex

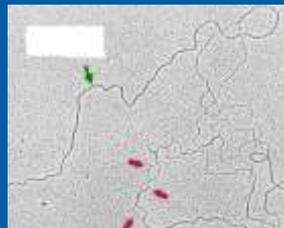
DO à 260nm



80°

100°

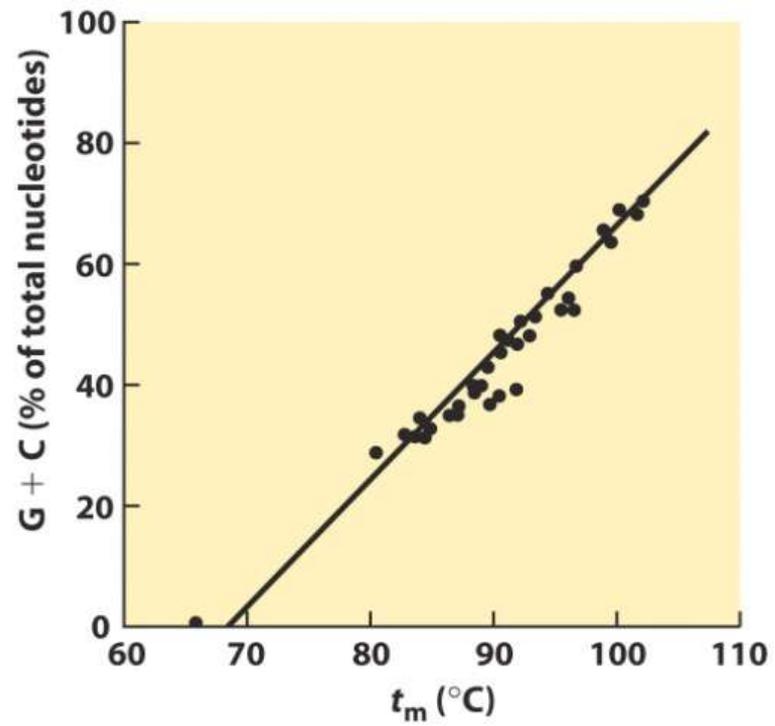
Tm



Refroidissement
Progressive

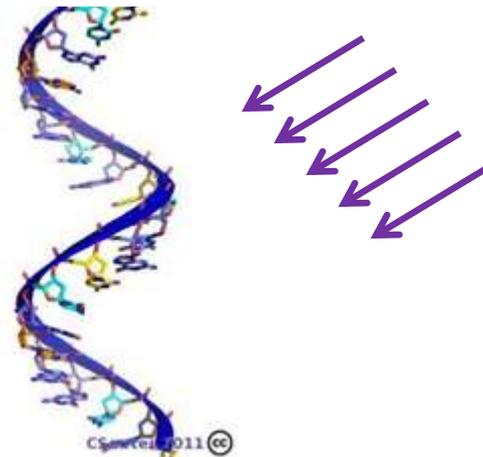
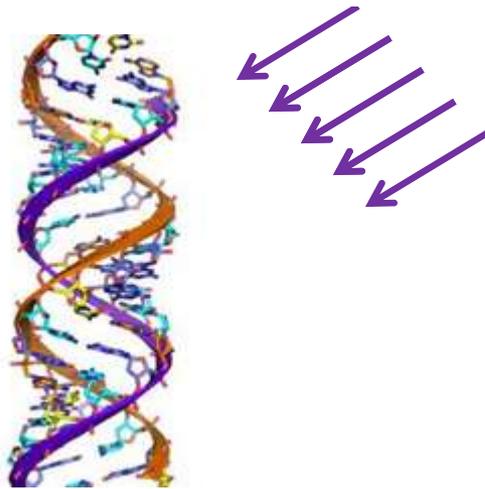
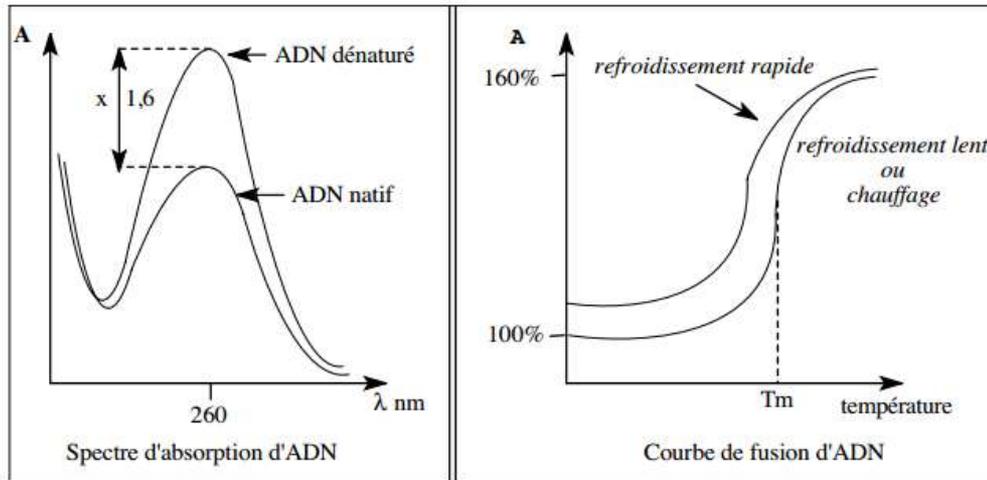


Renaturation
Hybridation



Interpréter cette courbe

Effet hyperchrome



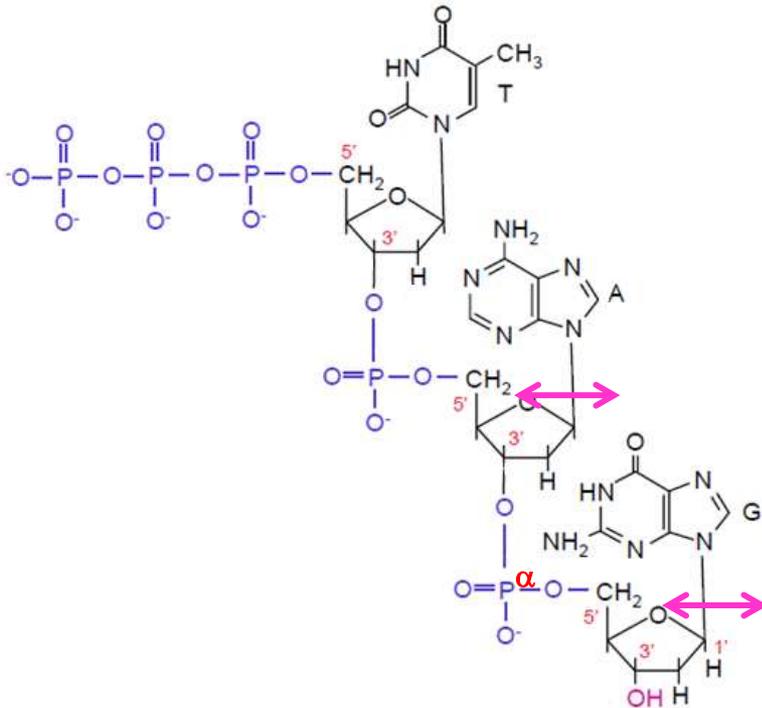
Les bases sont plus accessibles à la lumière UV

Hydrolyse Acide

ADN



ADN dépourvu
de purine
ADN apurique



Clivage de la liaison N-osidique
Entre les purines (N9) et le
2'désoxyribose (C1')

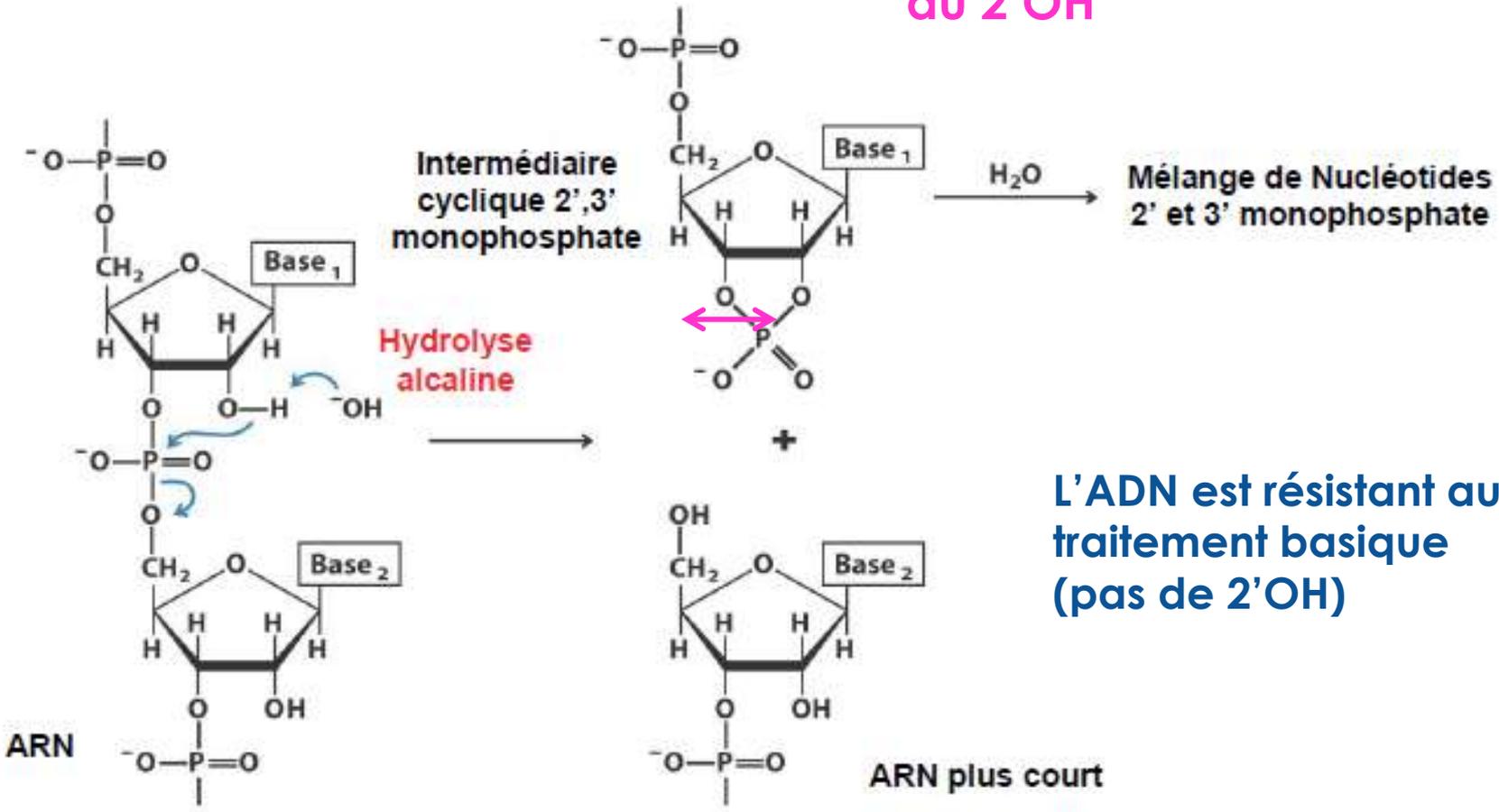
A cette conc.
pas d'effet sur
l'ARN

Hydrolyse Alcaline

ARN



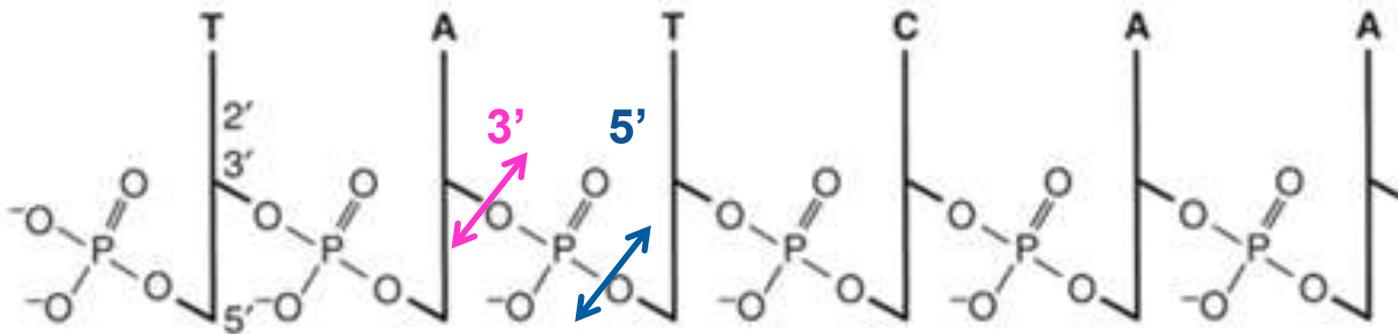
Hydrolyse rapide et totale
 Due à la présence du 2'OH



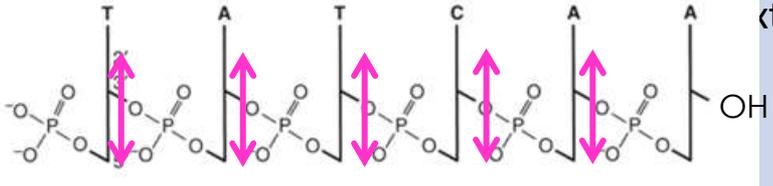
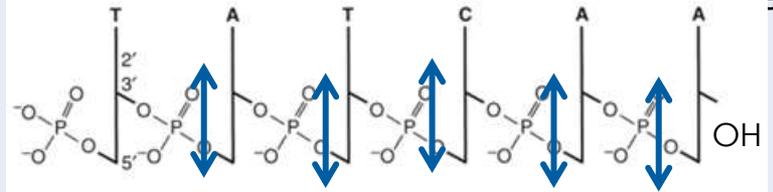
L'ADN est résistant au traitement basique (pas de 2'OH)

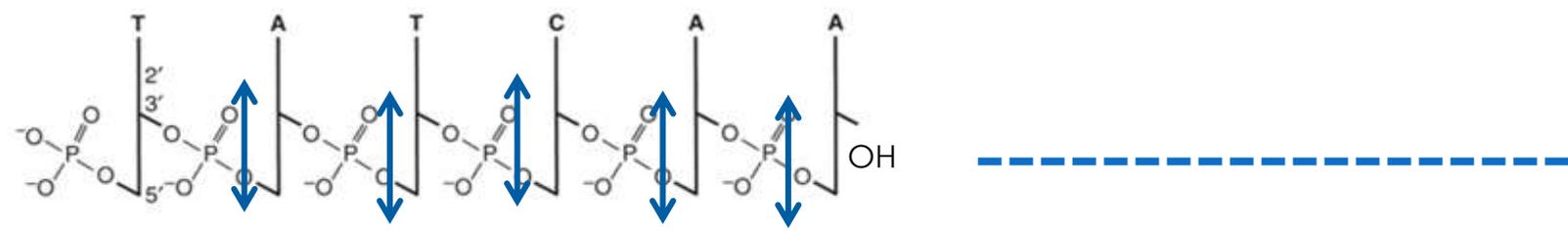
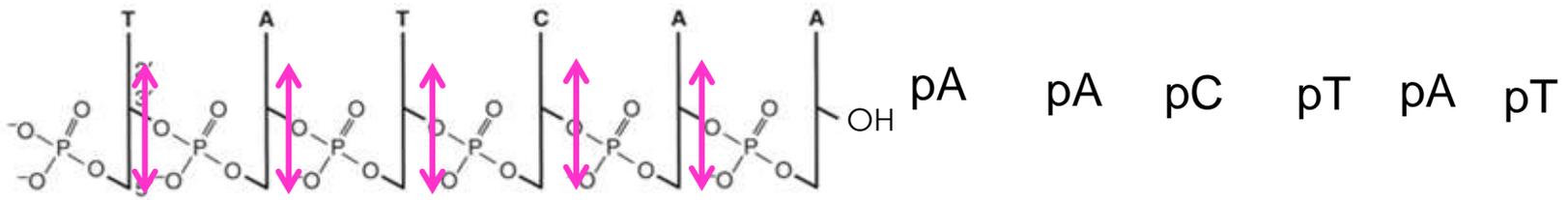
Hydrolyse enzymatique

Type de coupures



Exonucléases

Enzymes	Substrats	Type de coupure	Spécificité coupure Commece par	Produits
Phosphodiesterase de venin de Serpen			Extrémité 3'	5'-NMP, 5'-dNMP
Phosphodiesterase de la rate de bœuf			Extrémité 5'	3'-NMP, 3'-dNMP
Exonucléase I d' <i>E.coli</i>	ADN sb	3'	3 Extrémité'	5'-dNMP
Exonucléase d' <i>E.coli</i>	ADN db	3'	3' OH	3'-dNMP +ADN sb

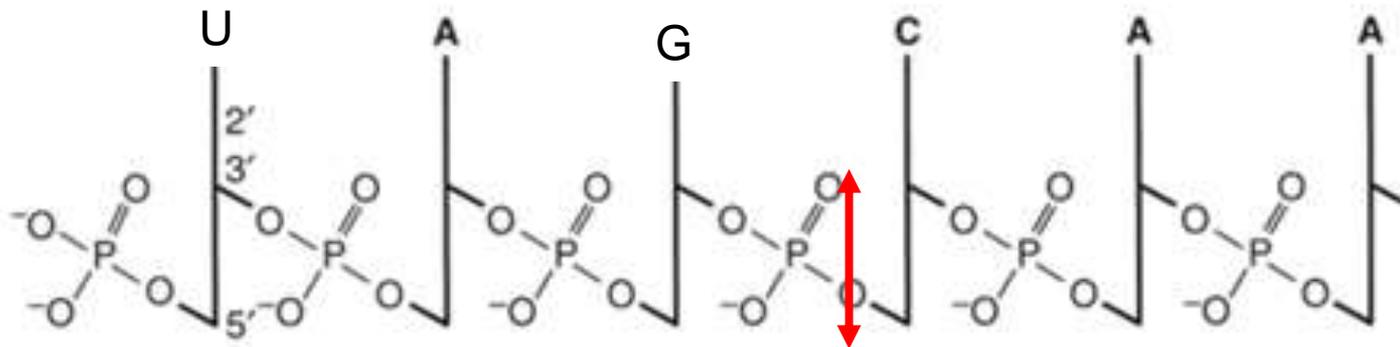


Endonucléases

Enzymes	Substrats	Type de coupure	Spécificité coupure	Produits
Endonucléases S1	ARN, ADN sb et db	3'	aléatoire	5'-NMP-oligonucléotide 5'-P, 5'-dNMP+ oligodesoxynucleotide 5'P
Ribonucléase de T1 (RNase T1)	ARN sb	5'	Lorsque qu'une G est du côté 3' de la liaison Phosphodiester	3'-NMP+oligonucléotide 3'P
RNase T2	ARN sb	5'	Lorsque qu'une A est du côté 3' de la liaison Phosphodiester	
RNase pancréatique	ARN sb	5'	Lorsque qu'une Pyrimidine est du côté 3' de la liaison Phosphodiester	3-NMP oligonucléotides 3'P

Hydrolyse enzymatique

Ribonucléase de T1 (RNase T1)



5' p U p A p Gp

5' C p A p A

5'

ARN sb

Quand G est du côté 3' de P

Enzyme de restriction

- Endonucléases: reconnaissance d'une séquence spécifique d'une molécule d'ADN et de la couper.
- Mise en évidence chez certaines bactéries.
- Plus de 500 enzymes de restriction
- Les plus utilisées en biologie moléculaire sont les enzymes de types II :
- Elles reconnaissent des séquences palindromiques de 4-8 paire de bases Elles effectuent une coupure sur les 2 brins

Séquence
palindromique

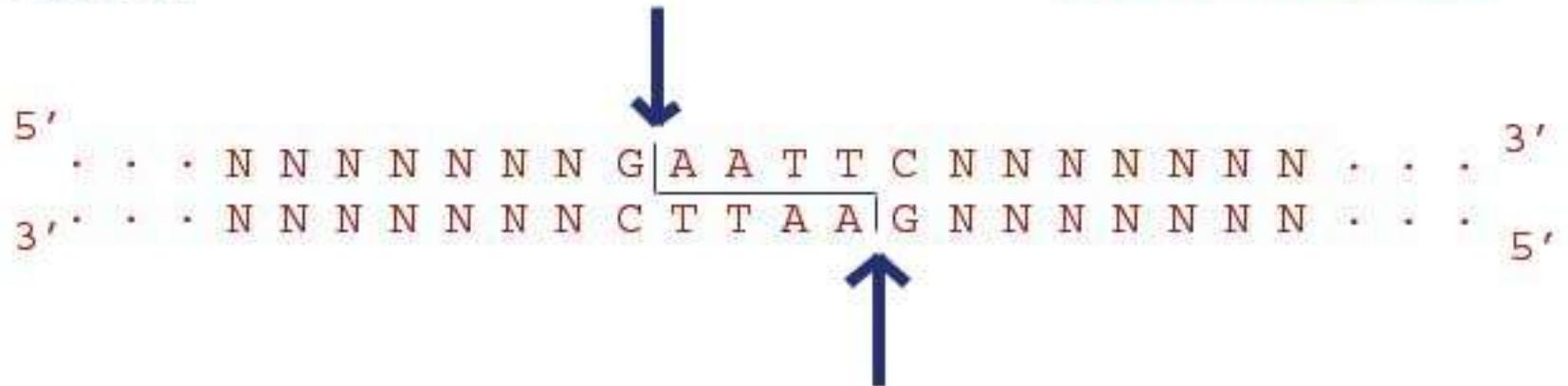


Enzyme de restriction:

Eco RI

Source:

Escherichia coli



Enzyme de restriction:

Eco RI

Source:

Escherichia coli

• N N N N N N N N G
• N N N N N N N N C T T A A

brin A

A A T T C N N N N N N N N •
G N N N N N N N N •

brin B

Enzyme	Source	Séquence reconnue	Coupure
<i>Eco RI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC--- 3' G--- 3'---CCTAG 5'
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A--- 5'
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'