

STRUCTURES ET PROPRIÉTÉS DES MOLÉCULES D'ADN

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Mais la structure d'une molécule d'ADN est bien plus complexe :

.....

.....

1. LA STRUCTURE PRIMAIRE DES MOLÉCULES D'ADN

.....

.....

.....

.....

.....

.....

La séquence primaire correspond donc à la **séquence en bases azotées de chacune des deux chaînes d'ADN** constituant la molécule d'ADN.

Exemple :

2. LA STRUCTURE SECONDAIRE DES MOLÉCULES D'ADN

2.1. QUELQUES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

✓ Les règles de CHARGAFF :

Les travaux d'Erwinn CHARGAFF, publiés en 1952, consistaient à déterminer les fractions molaires de chacune des bases azotées (A, T, G et C) dans la molécule d'ADN double brin de différents organismes vivants.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-après :

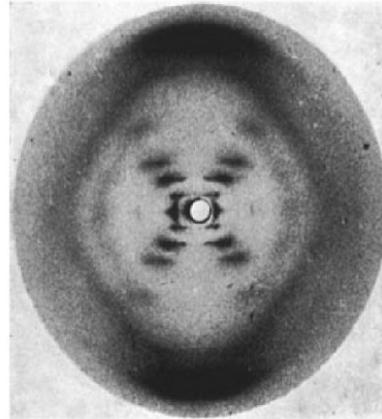
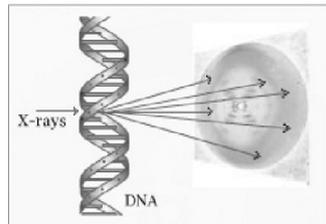
Organismes	% de A	% de G	% de C	% de T	Ratio A/T	Ratio G/C	% de (G + C)	% de (A + T)
Phage X174	24,0	23,3	21,5	31,2	0,77	1,08	44,8	55,2
Maïs	26,8	22,8	23,2	27,2	0,99	0,98	46,1	54,0
Poulpe	33,2	17,6	17,6	31,6	1,05	1,00	35,2	64,8
Poulet	28,0	22,0	21,6	28,4	0,99	1,02	43,7	56,4
Rat	28,6	21,4	20,5	28,4	1,01	1,00	42,9	57,0
Être humain	29,3	20,7	20,0	30,0	0,98	1,04	40,7	59,3
Sauterelle	29,3	20,5	20,7	29,3	1,00	0,99	41,2	58,6
Oursin	32,8	17,7	17,3	32,1	1,02	1,02	35,0	64,9
Blé	27,3	22,7	22,8	27,1	1,01	1,00	45,5	54,4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31,3	18,7	17,1	32,9	0,95	1,09	35,8	64,4
<i>Escherichia coli</i>	24,7	26,0	25,7	23,6	1,05	1,01	51,7	48,3

Q1. Analyser les résultats obtenus pour les ratios A/T et G/C.

Q2. Analyser les résultats obtenus pour les % de G + C et de A + T.

✓ Diffraction aux rayons X de la molécule d'ADN :

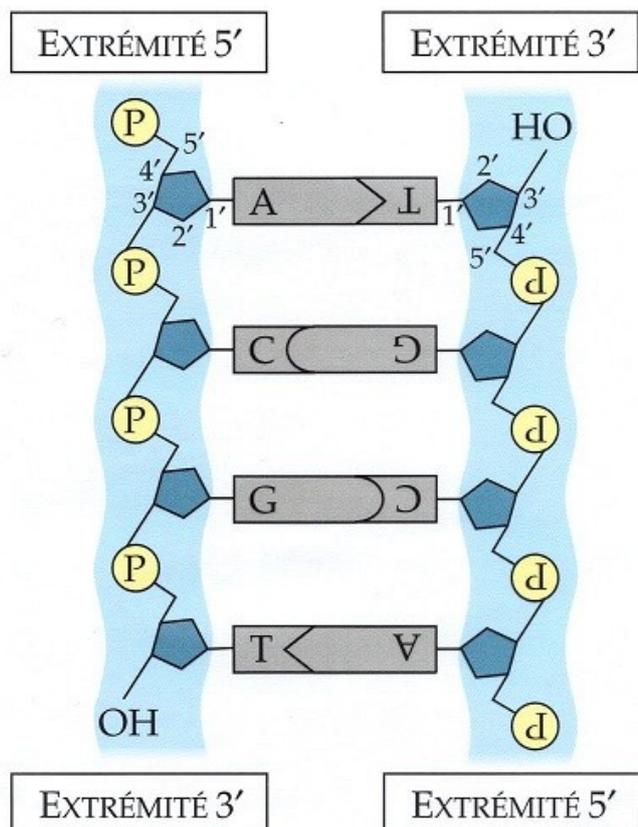
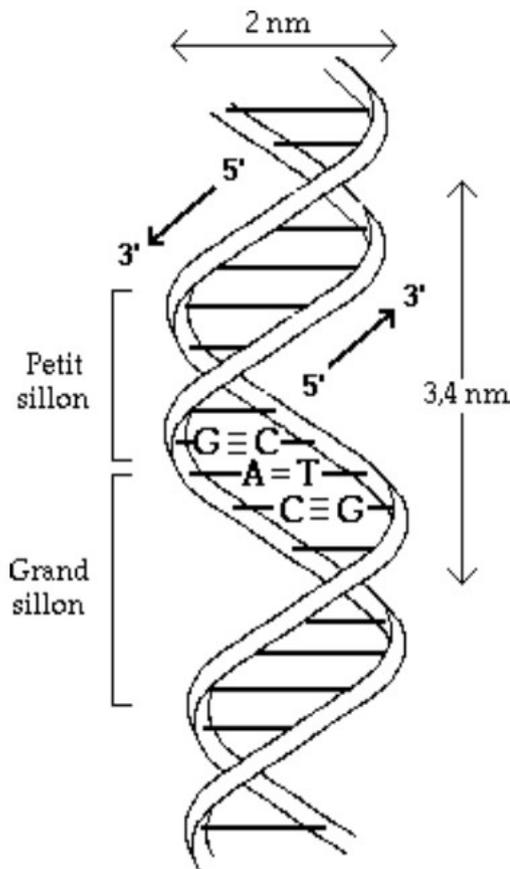
En 1951, Rosalind FRANKLIN réalise une diffraction aux rayons X de la molécule d'ADN. Elle obtient un cliché en forme de croix qui laisse supposer une structure secondaire hélicoïdale de la molécule d'ADN.

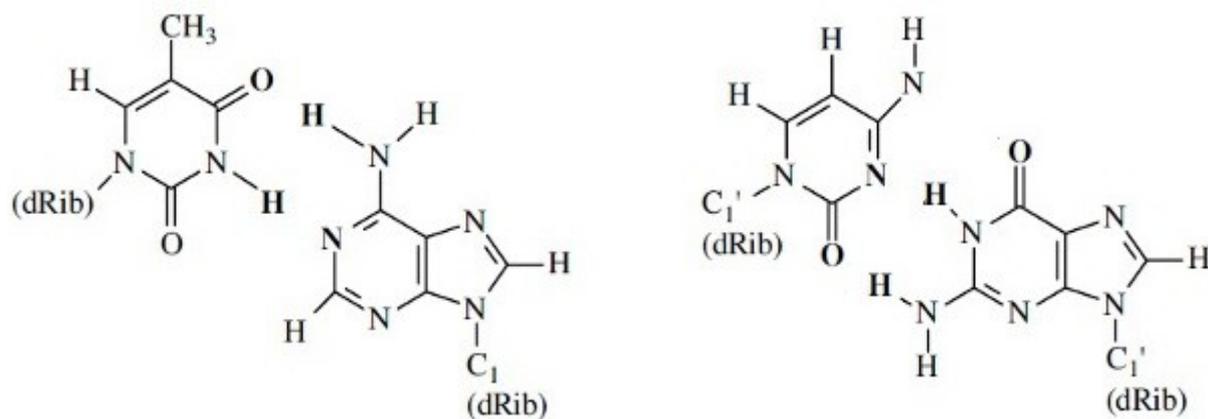


Ce cliché sera utilisé, à son insu, par WATSON et CRICK pour élaborer un modèle moléculaire de la structure secondaire de la molécule d'ADN.

2.2. LE MODÈLE DE LA DOUBLE HÉLICE D'ADN SELON WATSON ET CRICK : L'HÉLICE DE CONFORMATION B

En 1953, WATSON et CRICK publient un article dans la revue *Nature*, présentant un modèle moléculaire de la structure secondaire de la molécule d'ADN à partir de résultats expérimentaux obtenus précédemment.



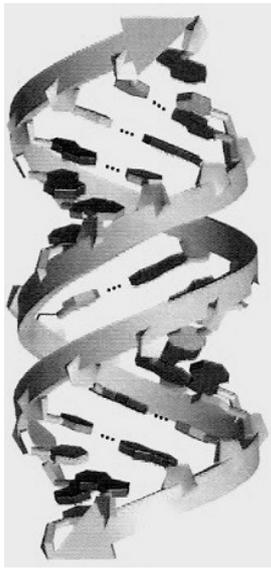
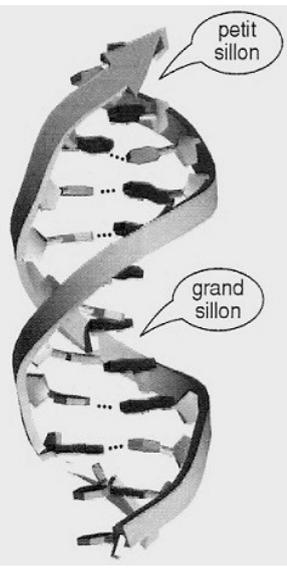
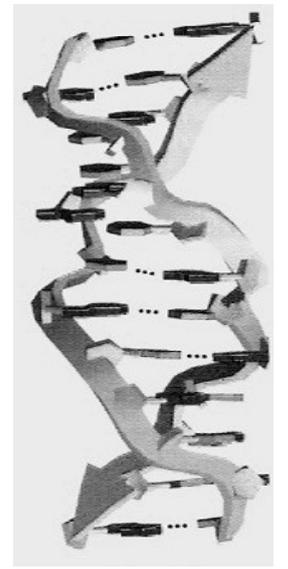


Les caractéristiques du modèle de WATSON et CRICK sont les suivantes :

La double hélice décrite par WATSON et CRICK est la **conformation B**. C'est la conformation la plus stable dans les conditions physiologiques. Elle est considérée comme la **forme native de l'ADN**.

2.3. LES AUTRES CONFORMATIONS DES DOUBLES HÉLICES D'ADN

Il existe trois conformations de la double hélice d'ADN : A, B et Z.

	Conformation ADN A	Conformation ADN B	Conformation ADN Z
Schéma			
Sens du pas de l'hélice			
Diamètre			
Nombre de paires de bases par tour d'hélice			
Longueur d'hélice par tour			
Hauteur d'hélice par paire de bases			
Grand sillon			
Petit sillon			
<i>In vivo</i>	- Si teneur en eau est inférieure à 75 % - hybride transitoire ADN-ARN (réplication, transcription)	Forme native dans les conditions physiologiques	Enchaînements alternés Pur/Pyr

3. LES STRUCTURES TERTIAIRES DES MOLÉCULES D'ADN

In vivo, l'ADN est organisé en structures supérieures ubiquitaires qui permettent un empaquetage très efficace de longues molécules d'ADN dans chaque noyau cellulaire ou dans une cellule procaryote de petite taille. Ces structures correspondent à de l'ADN dit sur- ou sous-enroulé.

Le surenroulement est un moyen majeur de **compactage mécanique** des molécules de grande taille. Il génère aussi une force (surtension) nécessaire aux transformations conformationnelles multiples que subit la molécule au cours de différents événements physiologiques.

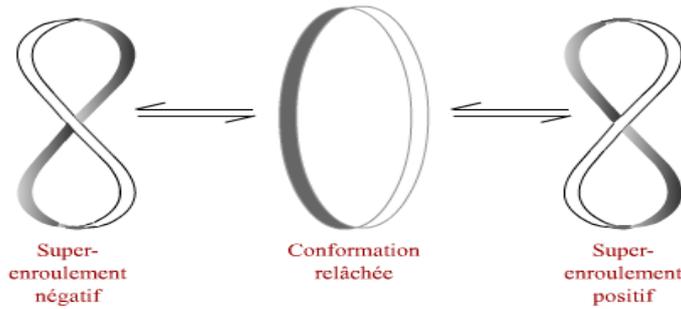
De nombreuses études visent donc à regarder de plus près les liens entre le surenroulement de l'ADN et son activité biologique.

3.1. LE SURENROULEMENT DES MOLÉCULES D'ADN CIRCULAIRES

3.1.1. LA NOTION DE SURENROULEMENT

À partir de la conformation relâchée d'une molécule d'ADN circulaire, on distingue :

-
-



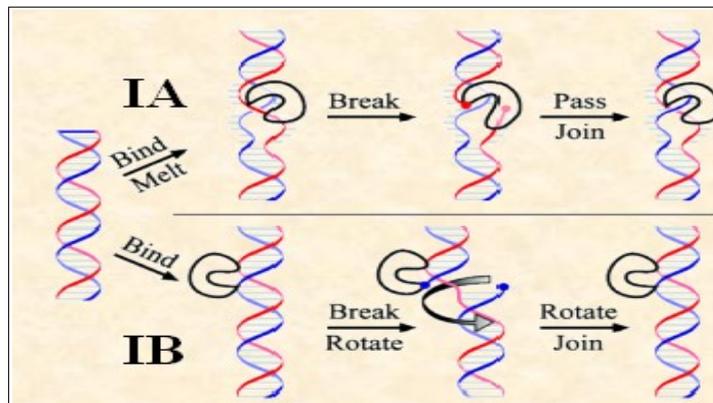
Le surenroulement de la molécule d'ADN est observé dans de nombreux processus cellulaires :

- La régulation de l'expression des gènes.
 - Le compactage de la molécule d'ADN.
 - La réplication de la molécule d'ADN.
 - La transcription.
- } voir SVT

3.1.2. LES TOPOISOMÉRASES

Il existe deux grandes classes de topoisomérases :

- **Les** _____ :
- Elles réalisent une coupure sur l'un des deux brins de la molécule d'ADN. Cette brèche transitoire relâche la torsion.



La topoisomérase de type IA est présente chez les organismes eucaryotes et procaryotes.
 La topoisomérase de type IB est uniquement présente chez les organismes eucaryotes.

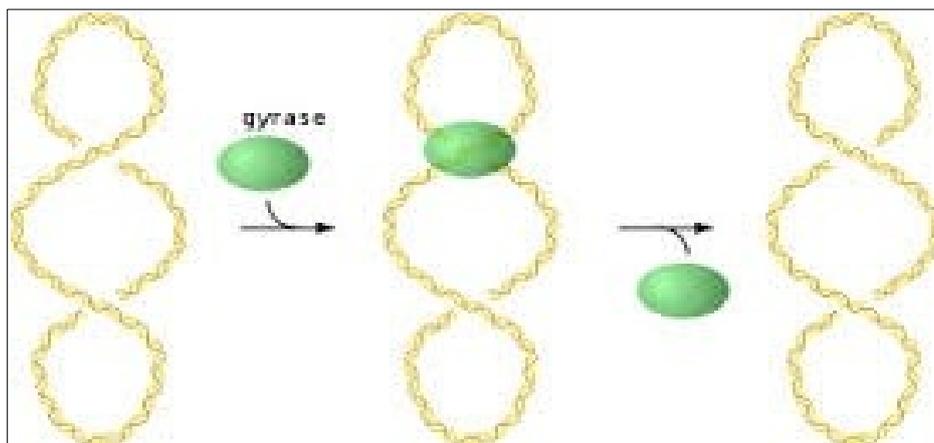
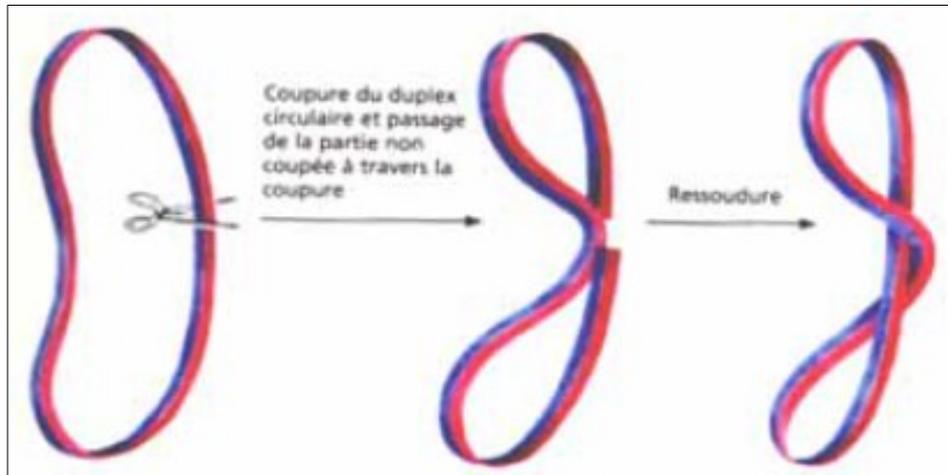
— _____ :

Elles réalisent une **coupe sur les deux brins** de la molécule d'ADN. Elles permettent d'enlever ou de fabriquer du surenroulement. Elles permettent également de « démêler » la molécule d'ADN.

.....

La gyrase et la topoisomérase IV sont des topoisomérases de type II spécifiques des organismes procaryotes.

Les topoisomérases II α et II β sont des topoisomérases de type II spécifiques des organismes eucaryotes.

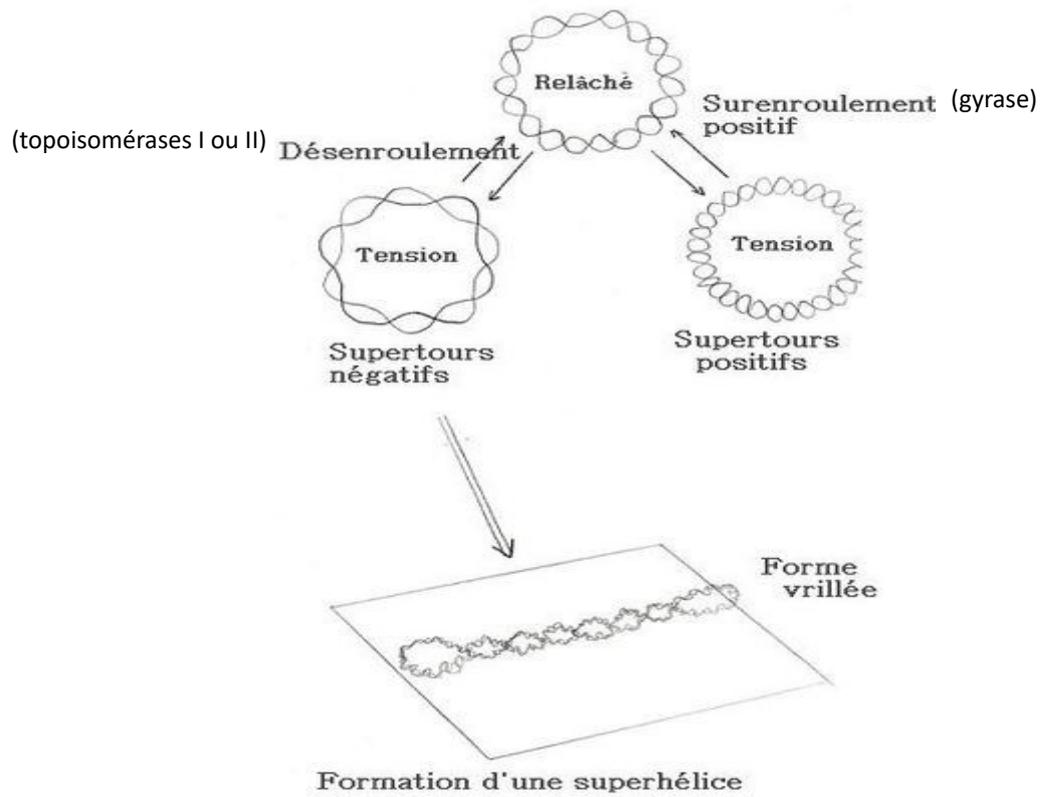


Les topoisomérases sont les cibles de molécules thérapeutiques à propriétés anti-tumorales (exemples : étoposide, podophyllotoxines, etc...) ou antibiotiques (exemples : acide nalidixique, ciproflaxine, etc...)

3.1.3. LES TOPOISOMÈRES DES MOLÉCULES D'ADN CIRCULAIRES

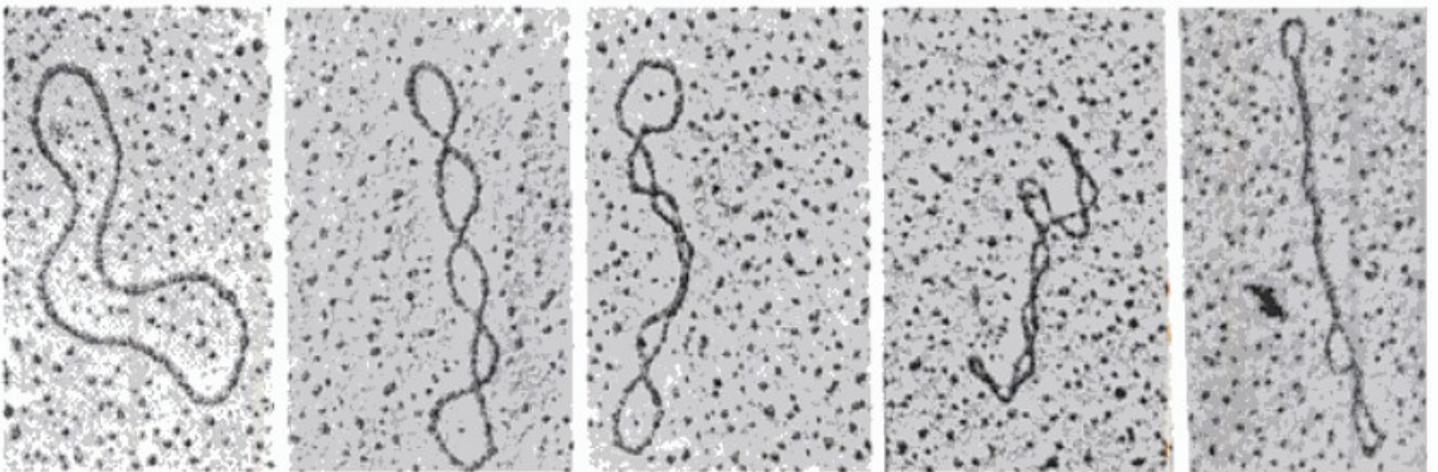
Dans certaines cellules, la molécule d'ADN se présente sous forme double brin circulaire (chromosome bactérien, plasmide, génome mitochondrial et chloroplastique).

Cette molécule d'ADN peut subir des surenroulements positifs ou négatifs causés par l'activité des topoisomérases.



j

Surenroulements et formation d'une superhélice d'ADN (observation en MET)



ADN circulaire relâché

superhélice d'ADN

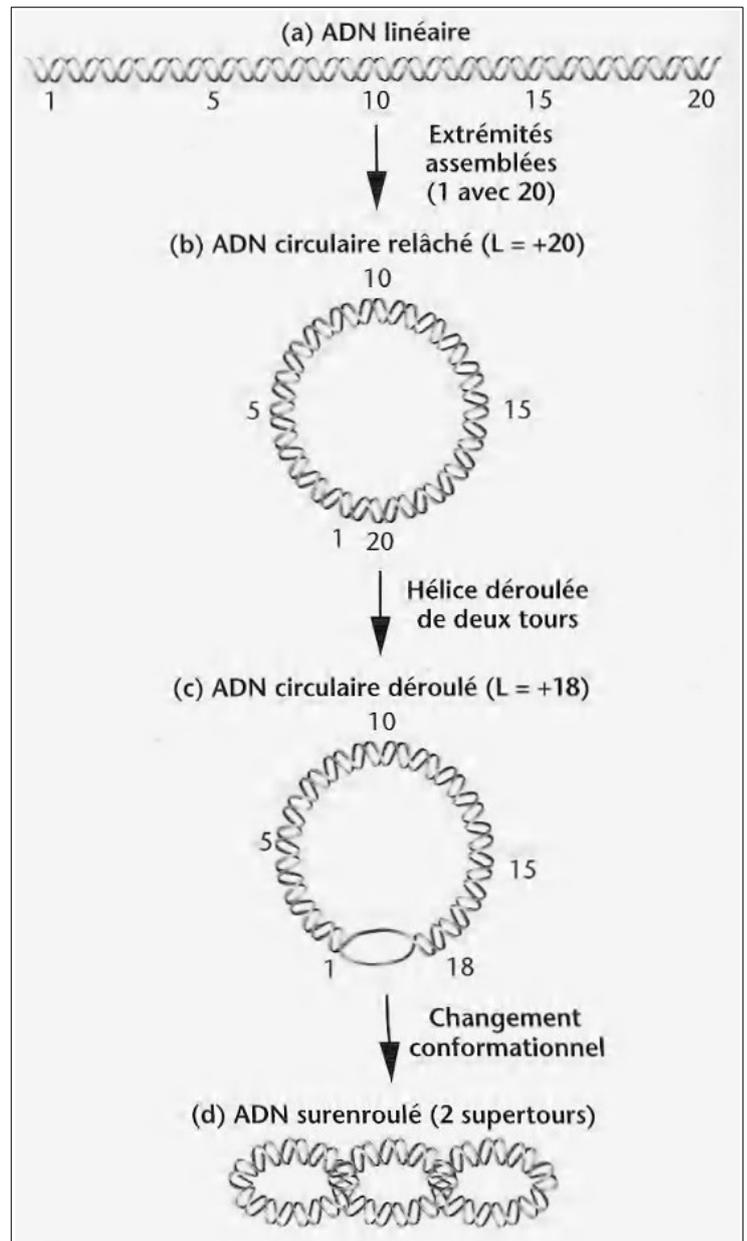
Soit une molécule d'ADN linéaire comportant 20 tours d'hélice.
Ce nombre définit le **nombre d'enlacements** (ou linking number, noté L).

Si les deux extrémités de la molécule sont assemblées, on obtient une forme circulaire *relâchée énergétiquement*.

Imaginons qu'on ouvre le cercle par cassure d'un brin, qu'on désenlace 2 tours d'hélice et qu'on ressoude les extrémités.

La structure obtenue est alors *contrainte énergétiquement* et ne peut donc subsister sous cette forme.

Pour acquérir une conformation plus stable sur le plan énergétique, la molécule forme des **supertours** dans la direction opposée à celle du déroulement (autant de supertours que de nombre de (dés)enlacements réalisés).

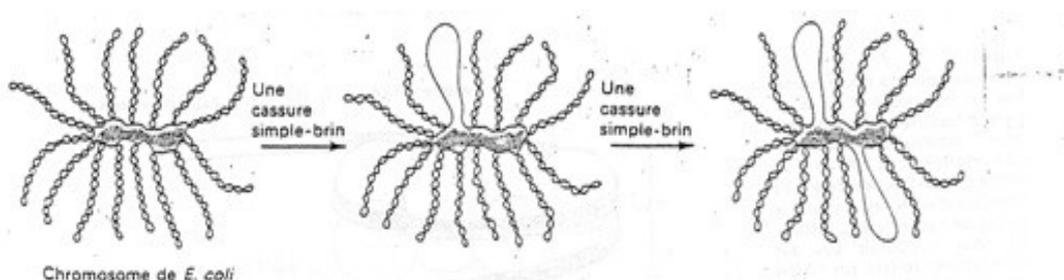


Un déficit d'enlacement génère des **supertours négatifs**.

Deux molécules qui diffèrent uniquement par leur nombre de chevauchements sont appelées **isomères topologiques ou topoisomères**.

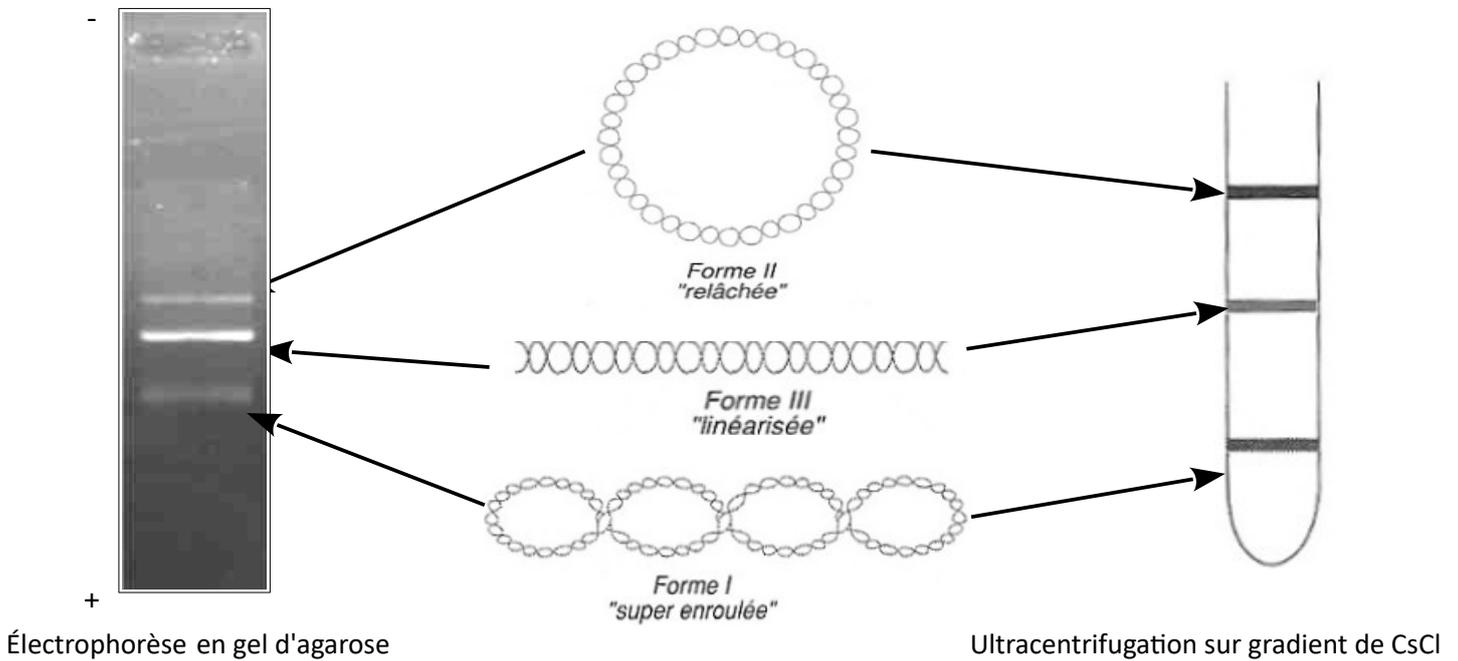
Le compactage de l'ADN procaryote est lié à l'existence de **super-enroulements**.

Le chromosome bactérien possède plusieurs domaines super-enroulés (une cinquantaine chez *E. coli*). Ces domaines sont stabilisés par fixation à des protéines stabilisatrices.



Ce schéma fait apparaître 15 des 46 boucles attachées sur le squelette protéique

.....

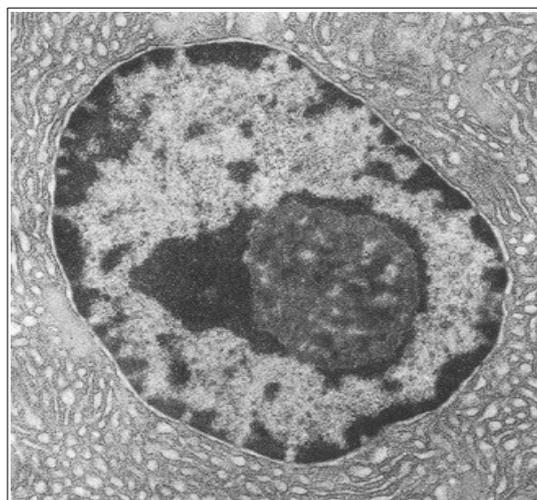


.....

3.2. LE COMPACTAGE DES MOLÉCULES D'ADN LINÉAIRES

Les molécules d'ADN double brin linéaire sont plus ou moins condensées selon la physiologie cellulaire :

- au cours des divisions cellulaires, l'ADN est compacté au maximum pour former des **chromosomes** visibles en microscopie photonique à fond clair.
- À l'interphase, la molécule d'ADN est dans un état plus ou moins condensé : on parle de **chromatine**.



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

L'analyse biochimique de la chromatine montre qu'elle renferme trois constituants principaux :

- ADN : 30 %
- ARN : 5%
- Protéines : 65%

Elles sont de deux types :

- _____ :
- Elles interviennent directement dans le compactage de l'ADN.
Le tableau suivant regroupe des informations sur la structure des histones.

Histone	Masse (kDa)	% Arg	% Lys
H1	23	1	29
H2A	14	9	11
H2B	13.8	6	16
H3	15.3	13	10
H4	11.3	14	11

En déduire une propriété des protéines histones.

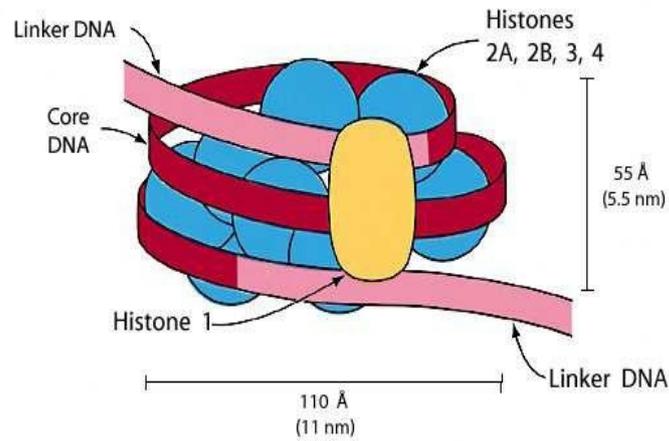
Indiquer comment ces protéines peuvent interagir avec l'ADN.

- _____ :
- Elles sont très diverses et moins représentées que les protéines histones.

Les différents degrés de compactage de la chromatine sont dus à des enroulement de la molécule d'ADN.

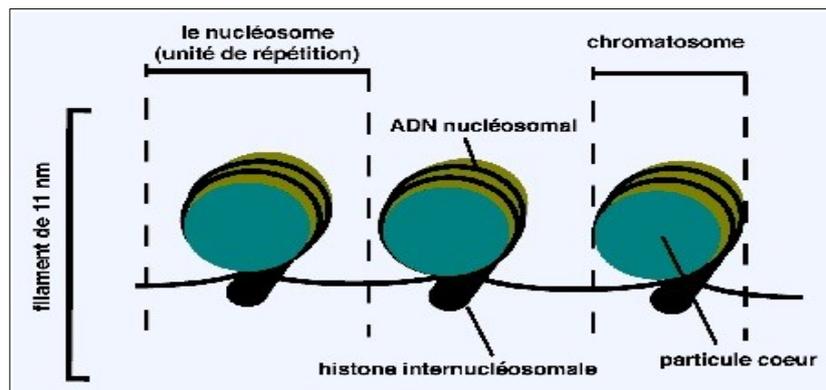
Le premier degré d'enroulement, responsable de **fibres de 11 nm**, est dû aux nucléosomes. **protéines histones H1, H2A, H2B, H3 et H4**, qui vont s'assembler pour former un **octamère** autour duquel la molécule d'ADN s'enroule deux fois.

Cette structure est appelée **nucléosome**.

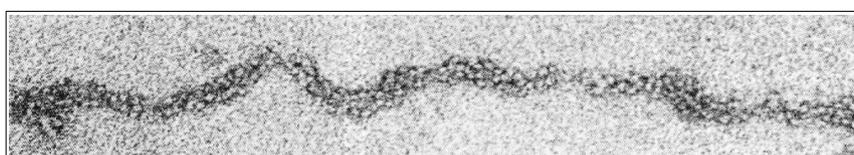
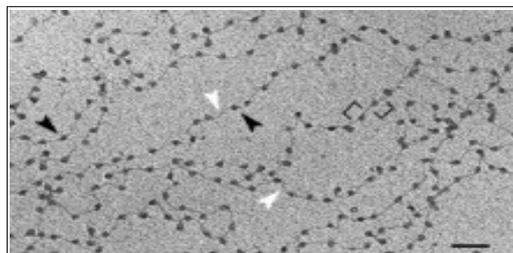


À partir du schéma, proposer une définition d'un nucléosome.

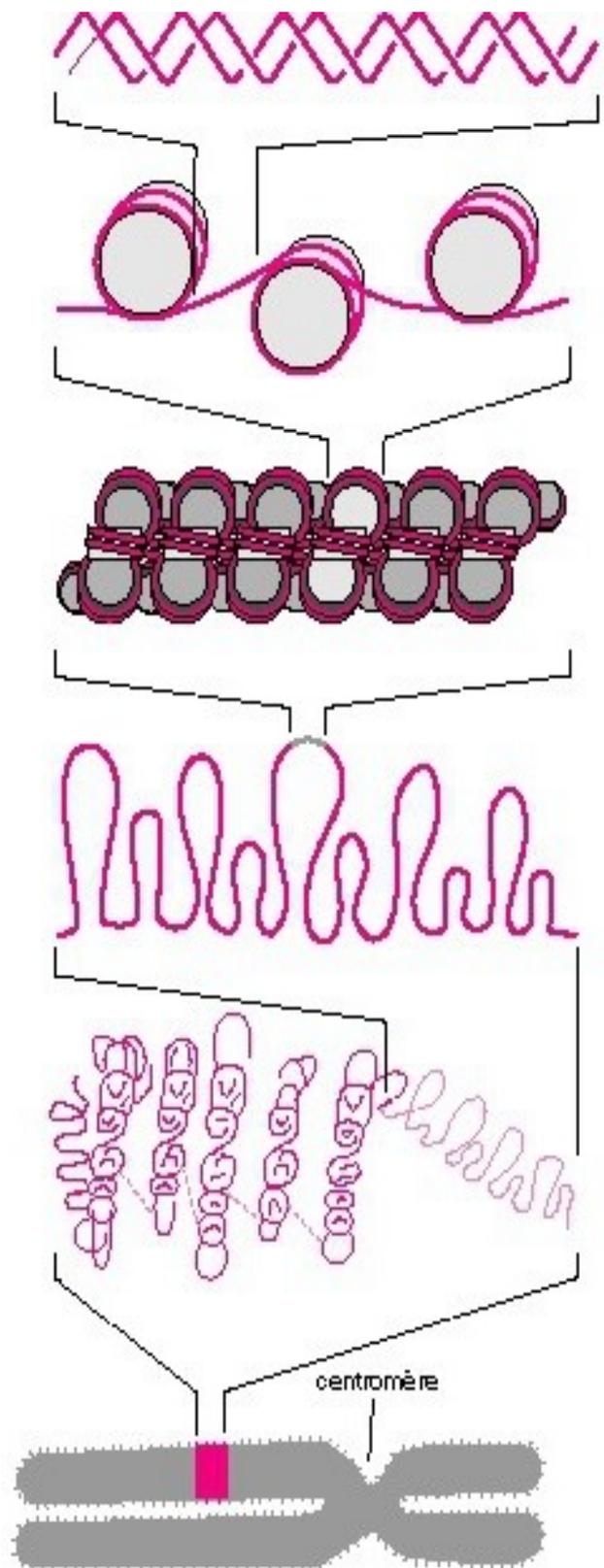
La répétition des nucléosomes est responsable d'une **fibre chromatinienne de 11 nm de diamètre.**



Les nucléosomes sont visibles en microscopie électronique sous la forme d'un collier de perles.



Dans le cas des divisions cellulaires, des degrés d'enroulement supplémentaires vont se mettre en place pour former les **chromosomes** qui correspondent à l'état de compactage maximal de l'ADN nucléaire.



Remarque :

Des modifications chimiques sur les histones (phosphorylations, acétylations, méthylations, ubiquitinations, sumoylations) permettent la régulation de l'état de condensation de l'ADN et donc de l'expression génique (code des histones).

4. LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES MOLÉCULES D'ADN

La structure en double hélice de la molécule d'ADN lui donne une nature fibreuse dont les propriétés physico-chimiques peuvent être exploitées en biologie moléculaire et génie génétique.

4.1. LA TAILLE DES MOLÉCULES D'ADN

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Organismes	Nombre de bases (en kpb)	Longueur de la molécule d'ADN (en μm)	Taille du microorganisme ou de la cellule (en μm)
<u>Virus :</u>			
- SV40	5,1	1,7	0,05
- bactériophage λ	48	1,7	0,135
<u>Procaryotes :</u>			
- Mycoplasmes	760	260	0,3
- <i>Escherichia coli</i>	4 000	1 360	2
<u>Eucaryotes :</u>			
- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13 500	4 600	10
- <i>Homo sapiens sapiens</i>	Environ 3 000 000	990 000	10 à 20

4.2. LA SOLUBILITÉ DES MOLÉCULES D'ADN

.....

.....

.....

.....



4.3. LA CHARGE DES MOLÉCULES D'ADN

.....

.....

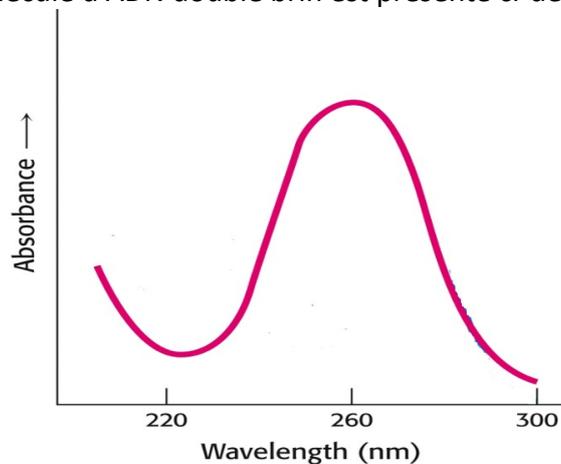
.....

.....

.....

4.4. LES PROPRIÉTÉS SPECTRALES DES MOLÉCULES D'ADN

Le spectre d'absorption de la molécule d'ADN double brin est présenté ci-dessous :



Analyser cette courbe et donner une application au laboratoire du phénomène observé.

4.5. L'HYDROLYSE DES MOLÉCULES D'ADN

Les liaisons phosphodiester présentes dans la molécule d'ADN peuvent être rompues.

4.5.1. L'HYDROLYSE CHIMIQUE DES MOLÉCULES D'ADN

.....

.....

.....

Ces méthodes, du fait de leur faible spécificité de coupure et de leurs conditions de mises en œuvre, ne sont quasiment plus employées.

4.5.2. L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES MOLÉCULES D'ADN

Les nucléases présentent des niveaux de spécificité et sont classées par :

- leur mode d'attaque de la chaîne : aux extrémités pour les 3'-OH exonucléases et 5'-P-exonucléases, ou à l'intérieur de la chaîne polynucléotidique pour les endonucléases.
- leur spécificité vis-à-vis du substrat : DNAases, ou désoxyribonucléases, pour la molécule d'ADN, RNAases, ou ribonucléases, pour les ARN, ou les deux.
- de la structure, simple ou double brin de l'acide nucléique.
- leur spécificité de reconnaissance des sites : bases ou leur enchaînement (séquence spécifique).
- le type de coupure de la liaison phosphodiester :

Quelques exemples de nucléases :

NUCLÉASES	SUBSTRATS	SITE DE COUPURE	SPÉCIFICITÉ DE COUPURE
EXONUCLÉASES			
Phosphodiesterase de venin	ARN, ADN _{ss}	3'	Extrémité 3'
Phosphodiesterase de rate	ARN, ADN _{ss}	5'	Extrémité 5'
Exonucléase I d' <i>Escherichia coli</i>	ADN _{ss}	3'	Extrémité 3'
Exonucléase III d' <i>Escherichia coli</i>	ADN _{ds}	3'	Extrémité 3'
ENDONUCLÉASES			
Endonucléase I d' <i>Aspergillus</i>	ARN, ADN _{ss} , ADN _{ds}	3'	Aléatoire
RNase T1 d' <i>Aspergillus</i>	ARN _{ss}	5'	- G # N -
RNase pancréatique	ARN _{ss}	5'	- Pyr # N -
DNase II de thymus	ADN _{ss}	5'	- dPyr # dPur -

ss : single strand = simple brin (monocaténaire)

ds : double strand = double brin (bicaténaire)

N : représente n'importe quel nucléotide

Il existe également de endo-DNases (ou endo-désoxyribonucléases) très particulières : **les enzymes de restriction**.

Chaque espèce bactérienne produit une collection d'endo-DNases, dont le site de coupure est spécifique d'une séquence de 4 à 10 désoxyribonucléotides, qui leur permet de s'opposer à l'infection de certains virus en hydrolysant leur ADN, sans hydrolyser leur propre ADN protégé par le biais d'une méthylation des séquences partielles spécifiques. On parle de restriction virale et on a appelé ces nucléases des enzymes de restriction.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

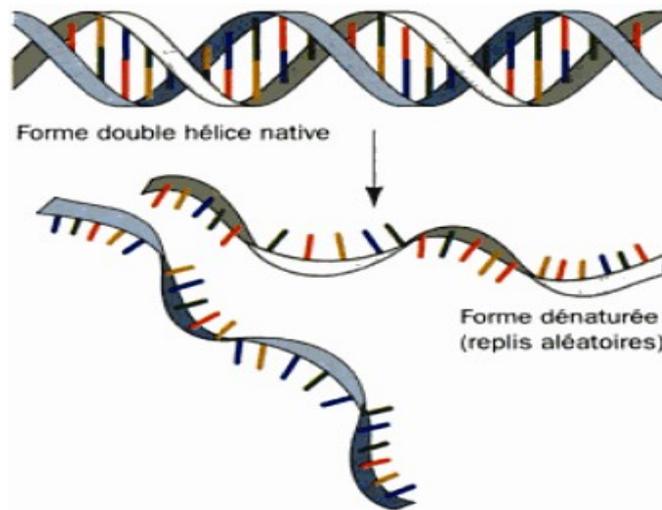
Exemple de séquence palindromique :

Exemples d'enzymes de restriction :

Ces enzymes de restriction sont un outil de choix pour de nombreuses techniques de biologie moléculaire, d'autant que le nombre d'enzymes de restriction purifiés à disposition est relativement grand : environ 500.

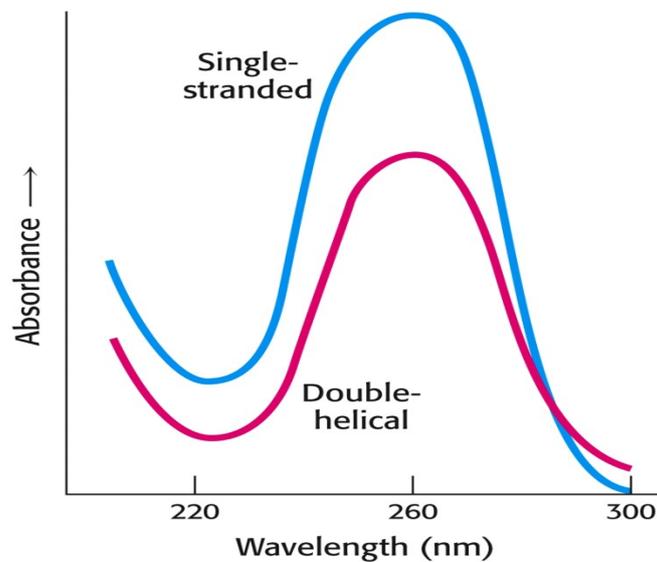
4.6. LA DÉNATURATION DES MOLÉCULES D'ADN ET LA NOTION DE TEMPÉRATURE DE FUSION

Lorsqu'une solution d'ADN bicaténaire (ou ADN duplex) est chauffée au-dessus d'une certaine température, sa structure initiale est perdue car les deux brins complémentaires se séparent et prennent chacun une conformation aléatoire appelée enroulement au hasard (ou random coiling).



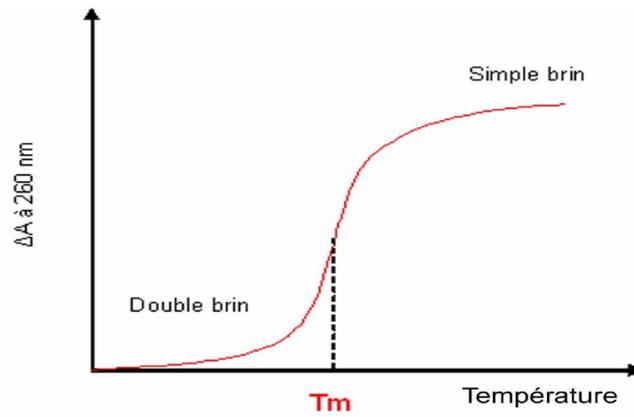
Ce phénomène de dénaturation s'accompagne d'une modification de la viscosité de la solution d'ADN. Les solutions d'ADN natif (bicaténaire) est élevée. La dénaturation de la molécule d'ADN fait chuter brutalement cette viscosité.

En réalisant le spectre d'absorption d'une solution d'ADN natif (bicaténaire) et d'un solution d'ADN dénaturé (monocaténaire), on obtient la figure suivante :



Analyser et interpréter ces courbes.

Le **phénomène de fusion** peut être mis en évidence en chauffant progressivement une solution d'ADN duplex et en suivant l'absorbance à $\lambda = 260$ nm en fonction de la température. On obtient une **courbe de fusion** :



Analyser et interpréter cette courbe.

.....

.....

.....

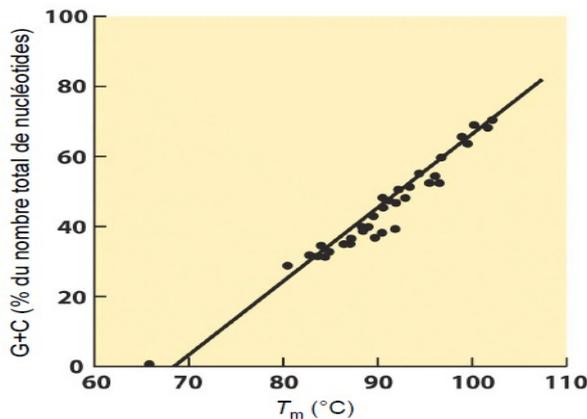
.....

.....

La valeur de la T_m pour une molécule donnée dépend de différents paramètres :

— _____ :

La complémentarité des deux brins de l'ADN est maintenue grâce à l'appariement entre G et C d'une part et A et T d'autre part. Mais le nombre de liaison hydrogène n'est pas le même pour chaque couple de bases. Il est évident donc que le nombre de bases sera un facteur non négligeable dans le calcul de la T_m . De manière générale, on note que la relation entre la composition en G+C et la T_m est de nature linéaire pour des ADN de longueurs identiques ou suffisamment longs (> 200 pb) :



Mais en pratique, pour les oligonucléotides dont la taille est inférieure ou égale à 20 nucléotides, on utilise plutôt la formule :

- _____ :
De manière générale, l'abaissement de la T_m est de 1°C pour une valeur de 1 % de mésappariement entre les deux brins d'ADN.

- _____ :
Les sels sous forme de cations monovalents (Na^+ notamment), lorsqu'ils sont ajoutés aux fortes concentrations ($> 1 \text{ mol.dm}^{-3}$) n'influencent pas les valeurs de T_m . Par contre, pour des concentrations en Na^+ inférieures à 1 mol.dm^{-3} , une augmentation de la concentration entraîne une diminution de la T_m . Les cations divalents ont un effet encore plus important. D'autres substances telles que le formamide peuvent abaisser la T_m lors des hybridations.

- _____ :
La T_m devient plus grande si la longueur de l'ADN l'est aussi : un ADN long contient plus de liaisons à dissocier qu'un ADN plus court. On constate tout de même que l'effet longueur est important pour les petits fragments d'ADN.

Il existe donc des formules empiriques de détermination de la température de fusion prenant en compte tout ou partie de ces facteurs, et valables pour des fragments d'ADN dont la taille est comprise entre 20 et 100 nucléotides :

Des calculateurs automatiques de T_m existent sur internet.