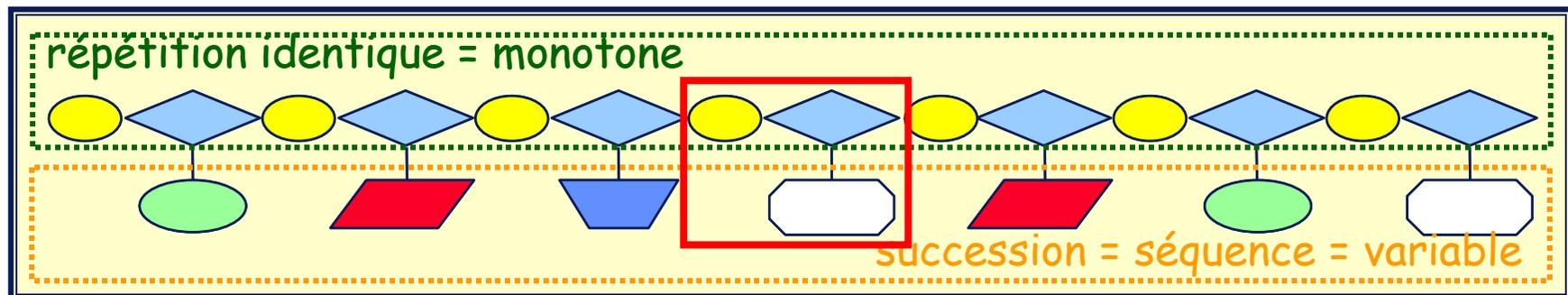


# ACIDES NUCLEIQUES

Eléments structuraux  
et  
Méthodes d'analyse

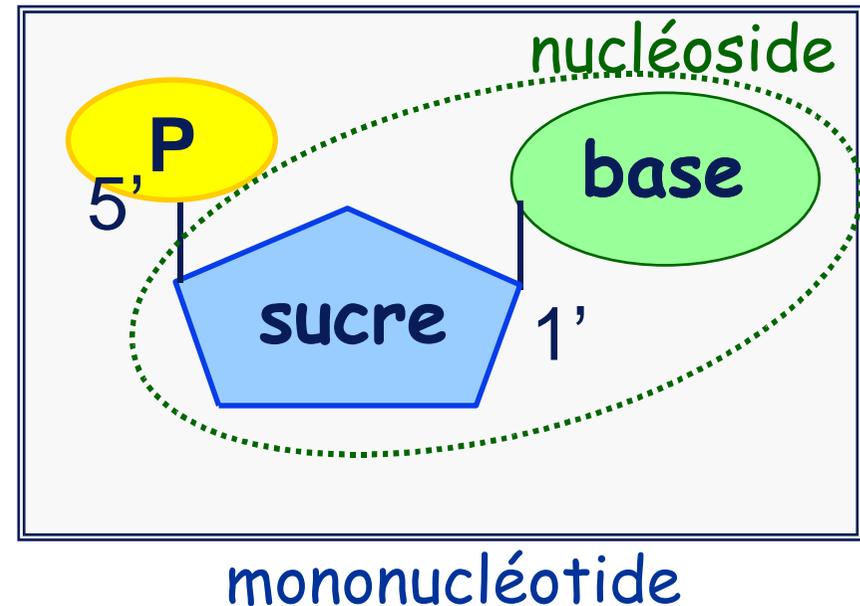
# Acides Nucléiques

- Polynucléotides
  - Structures macromoléculaires
  - Polymères linéaires
- ADN ou acide désoxyribonucléique
- ARN ou acides ribonucléiques
- Structure
  - Partie invariable - Partie variable



# Structure de base : nucléotide

- Unité monomérique : mononucléotide
- Composition du monomère :
  - 3 éléments
    - Une base
    - Un sucre
    - Un groupement phosphate
- Enchaînement
  - Sucre en position centrale



- Nucléoside = base liée au sucre
- Nucléotide = base liée au sucre lié au phosphate

# Bases

- Hétérocycles aromatiques azotés
- 5 bases réparties selon 2 familles

- **Bases puriques**

Noyau purine

2 hétérocycles azotés

2 bases : **Adénine**  
**Guanine**

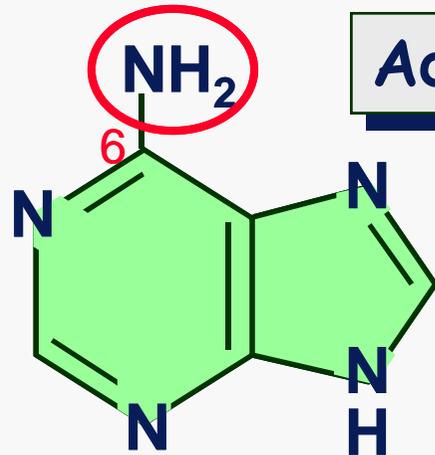
- **Bases pyrimidiques**

Noyau pyrimidine

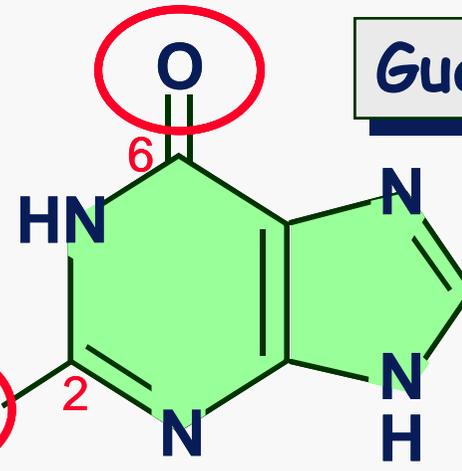
1 hétérocycle

3 bases : **Cytosine**  
**Thymine**  
**Uracile**

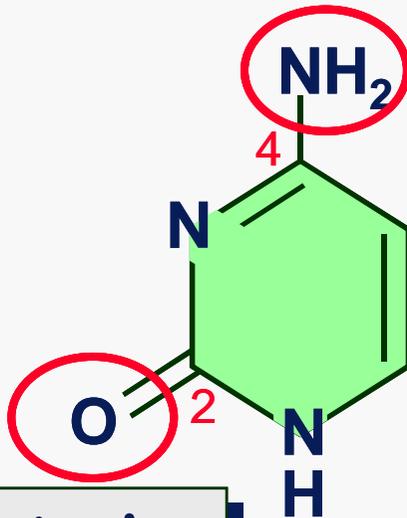
# Bases : Formules



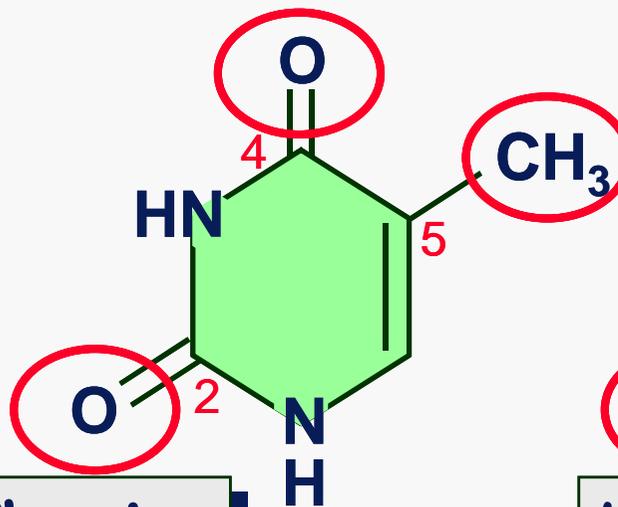
Adénine



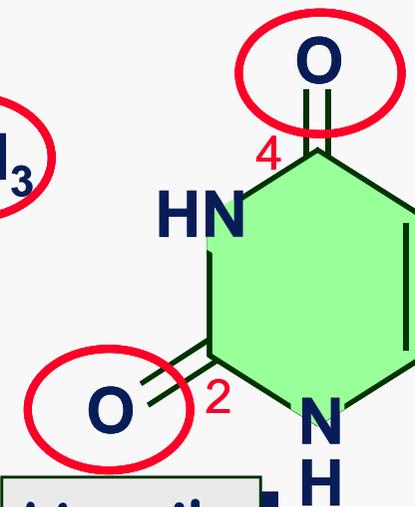
Guanine



Cytosine



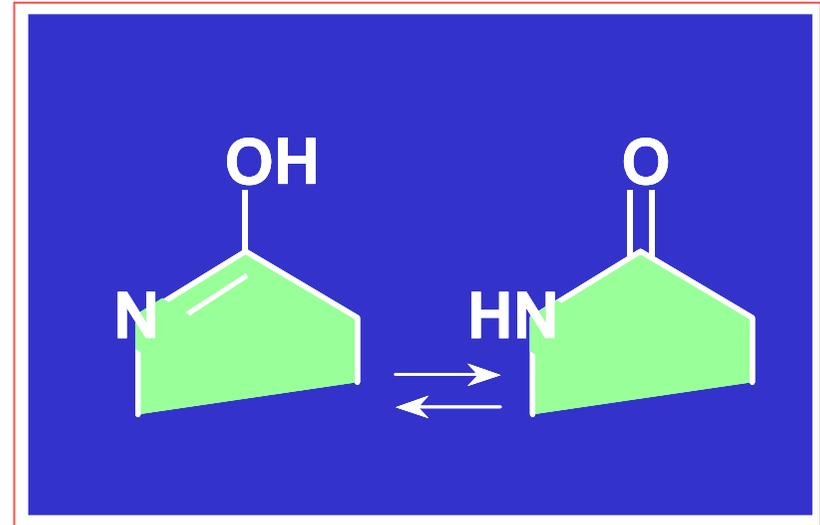
Thymine



Uracile

# Bases : propriétés

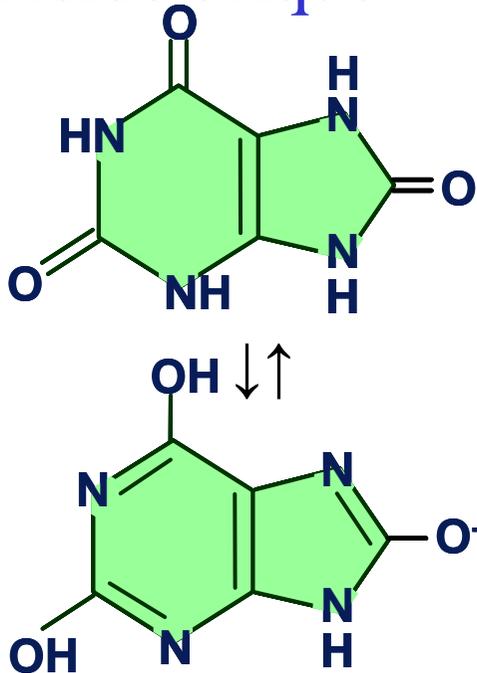
- Propriétés chimiques
  - Caractère **aromatique**
  - Equilibre
    - lactime  $\Leftrightarrow$  **lactame**
    - Imine  $\Leftrightarrow$  **Enamine**
  - Caractère basique : - NH<sub>2</sub>
  - Potentialité
    - d'interactions hydrogène



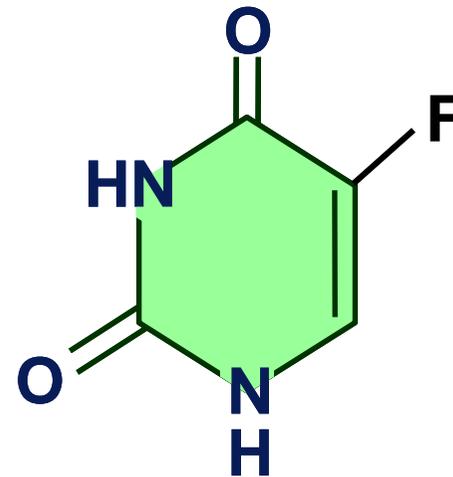
- Variations
  - Bases mineures : modification  $\Rightarrow$  ex méthylation
  - Dérivés :
    - métabolites (acide urique)
    - médicaments (5 fluoro uracile)

# Dérivés métaboliques et de synthèse

- Acide urique



- 5 fluoro-uracile



- Analogue de base pyrimidique
- Converti en nucléotide
- Inhibiteur d'une enzyme clé de la synthèse de l'ADN

# Sucre - Phosphate

- Sucre

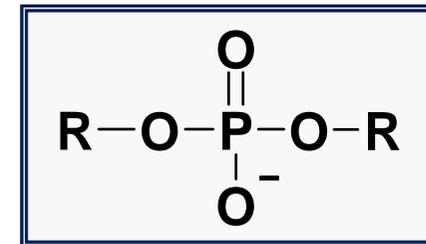
- 2 possibilités

- Même structure de base : D aldopentose



- Phosphate

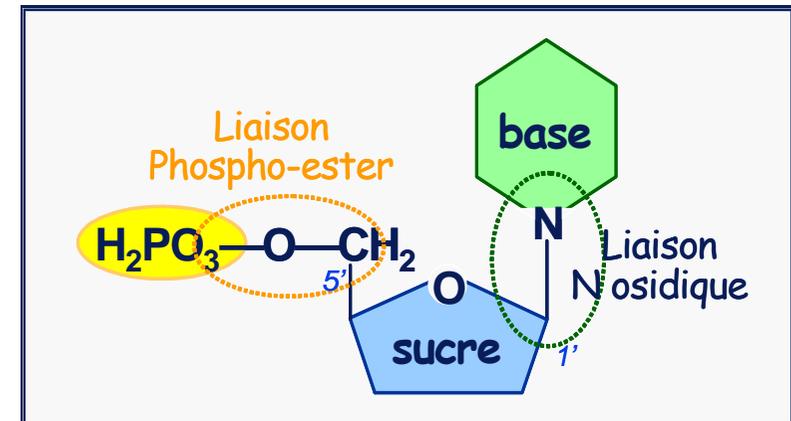
- Triacide => 1 fonction acide



- Liaisons

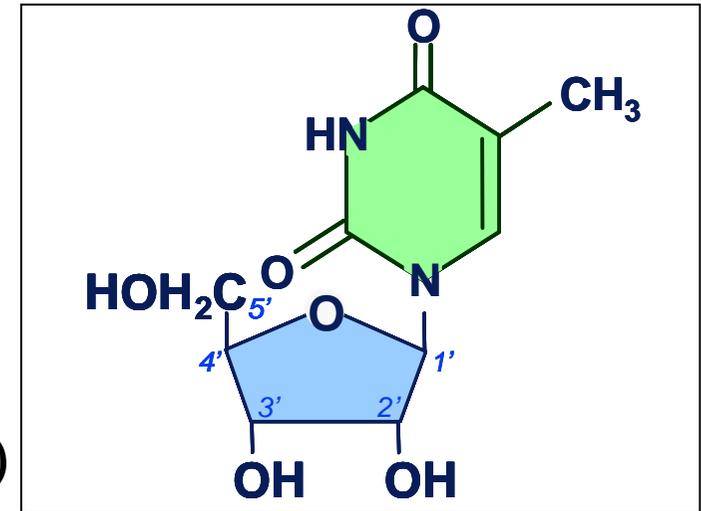
- 2 types :  $\beta$  N osidique et ester

- hydrolysables

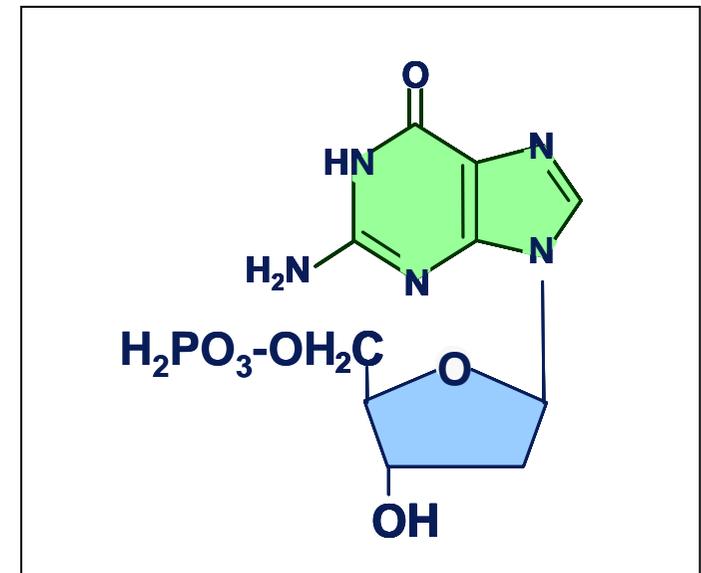


# Nomenclature

- Nomenclature :
  - Nucléosides puriques (- osine)
    - Guanine – Guanosine
    - Adénine – Adénosine
  - Nucléosides pyrimidiques (- idine)
    - Uracile – Uridine
    - Thymine – Thymidine
    - Cytosine – Cytidine
  - Nucléotides
    - Dénomination du nucléoside
    - + - Phosphate
    - Acide (désoxy)Guanilylique

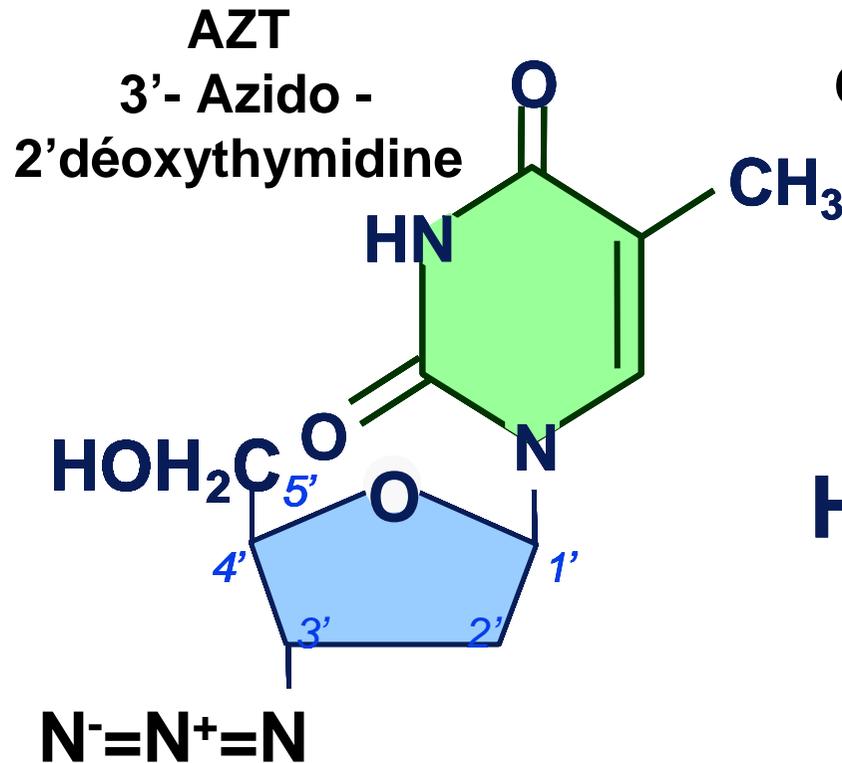


**Thymidine**

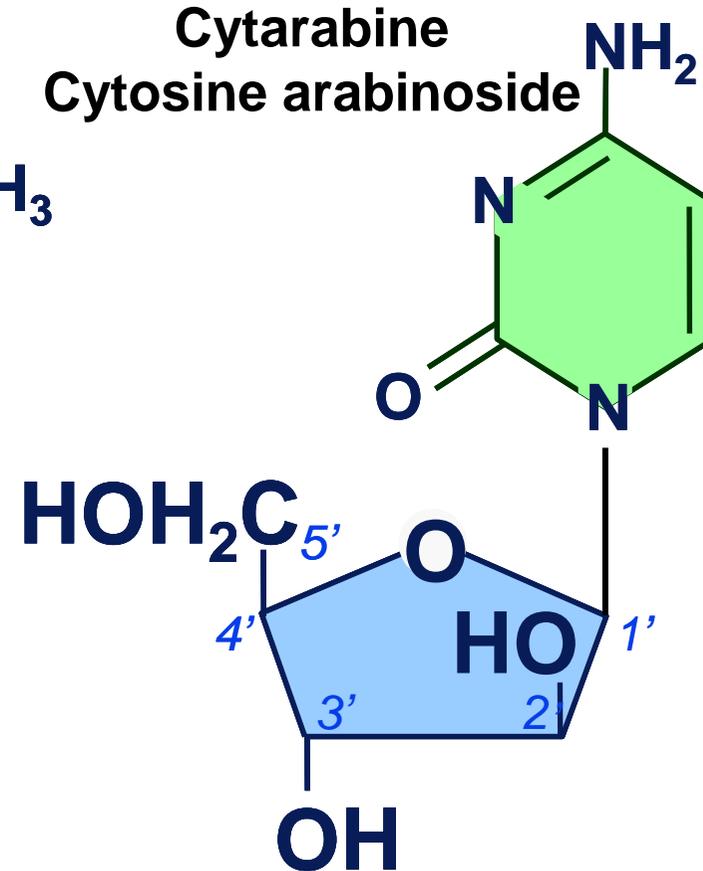


**Désoxy Guanosine monophosphate**

# Dérivés de nucléosides et de nucléotides



- AZT
- 3'-Azido-2'-deoxythymidine
- Converti en nucléotide tri-P
- Inhibiteur de la Reverse transcriptase

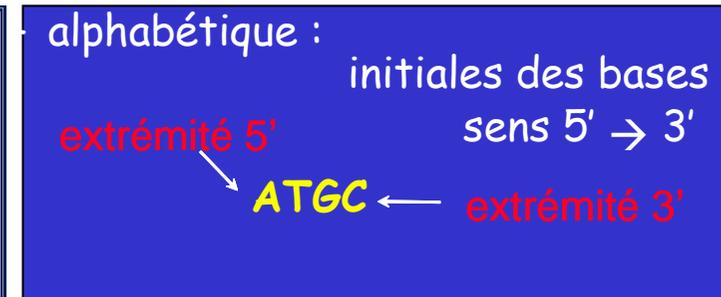
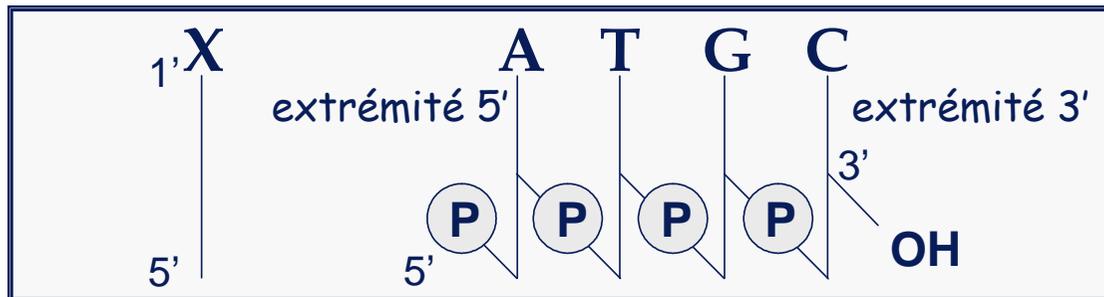


- Nucléoside pyrimidique
- Converti en nucléotide
- Incorporé dans l'ADN
- Inhibiteur de l'ADN polymérase



# Acides nucléiques = polynucléotides

- Caractéristiques structurales
  - Structure primaire : ordre des bases
  - Orientation ou polarité de la chaîne:
    - Sens conventionnel : 5' -> 3'



- Structure second-tertiaire
  - Organisation tridimensionnelle
    - Organisation en motifs structuraux
    - Repliement de ces motifs

# ADN et ARN

## • ADN

- 1% du poids de la cellule
- Poids moléculaire élevé
- Fonctions / Localisation
- 2 types
  - Procaryotes
    - 1 double brin circulaire
    - E. Coli : 4 700 000 paires de bases
  - Eucaryotes
    - Plusieurs doubles brins
    - Homme:
      - ADN génomique :  $3 \times 10^9$  pb
      - ADN mitochondrial : 16 569 pb

## • ARN

- 5 – 10% du poids de la cellule
- Poids moléculaire variable selon le type
- Fonctions / Localisation
- Plusieurs types
  - ARNr : ribosomal
  - ARNm : messenger
  - ARNt : transfert
  - ...

# ADN

- Caractéristiques générales
  - sucre : désoxyribose
  - Bases : A, C, G, T
  - Bicaténaire : toujours sous forme double brin
- Caractéristiques des chaînes
  - Complémentaires
  - Antiparallèles
  - Hélicoïdales

# ADN : Chaînes complémentaires

- Appariement – complémentarité
  - Etablissement d'interactions hydrogène entre bases puriques et pyrimidiques
- 2 chaînes polynucléotidiques s'assemblent pour former un double brin

Adénine — Thymine  
Guanine — Cytosine

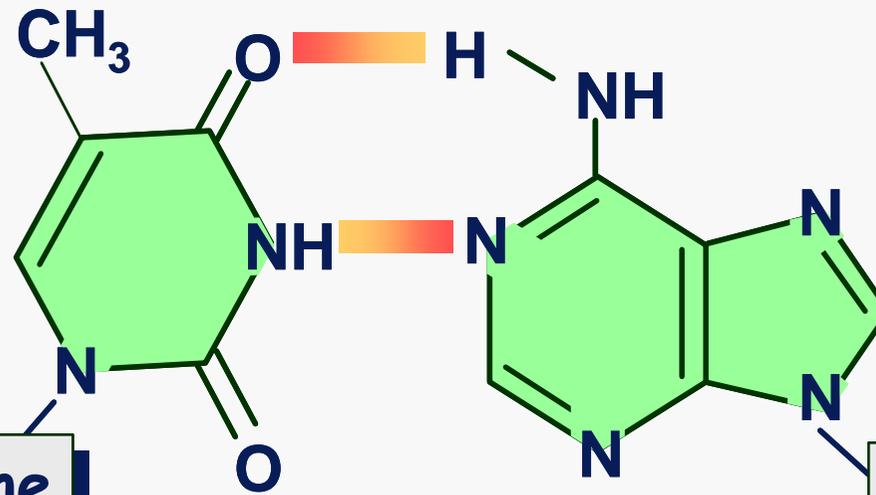
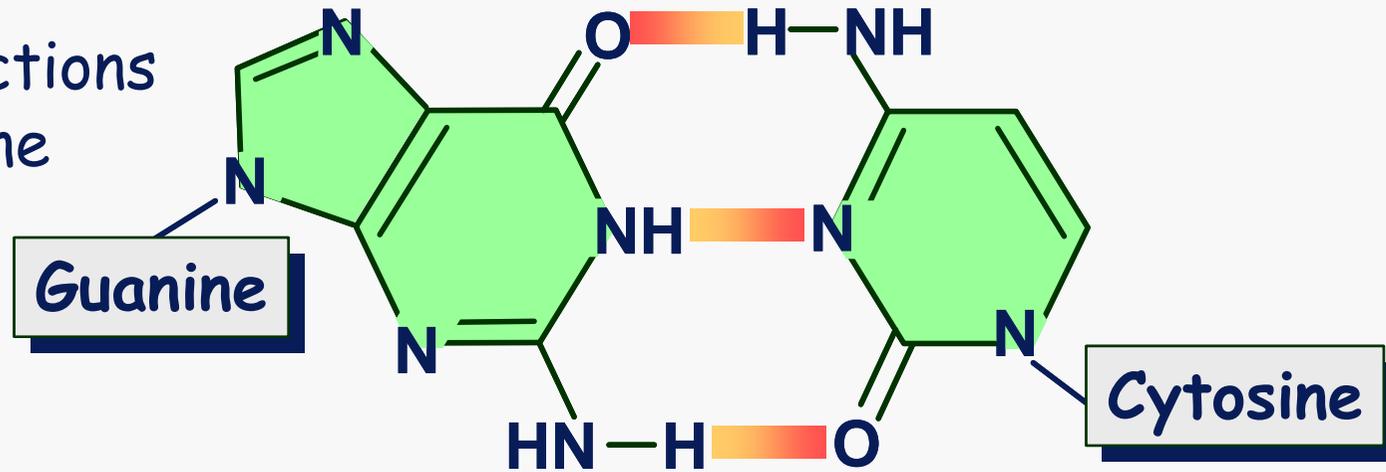
seules associations  
présentes dans l'ADN  
= bases appariées

Dans l'ADN :  $n \text{ purines} = n \text{ pyrimidines}$

$$A / T = G / C = 1$$

# Complémentarité

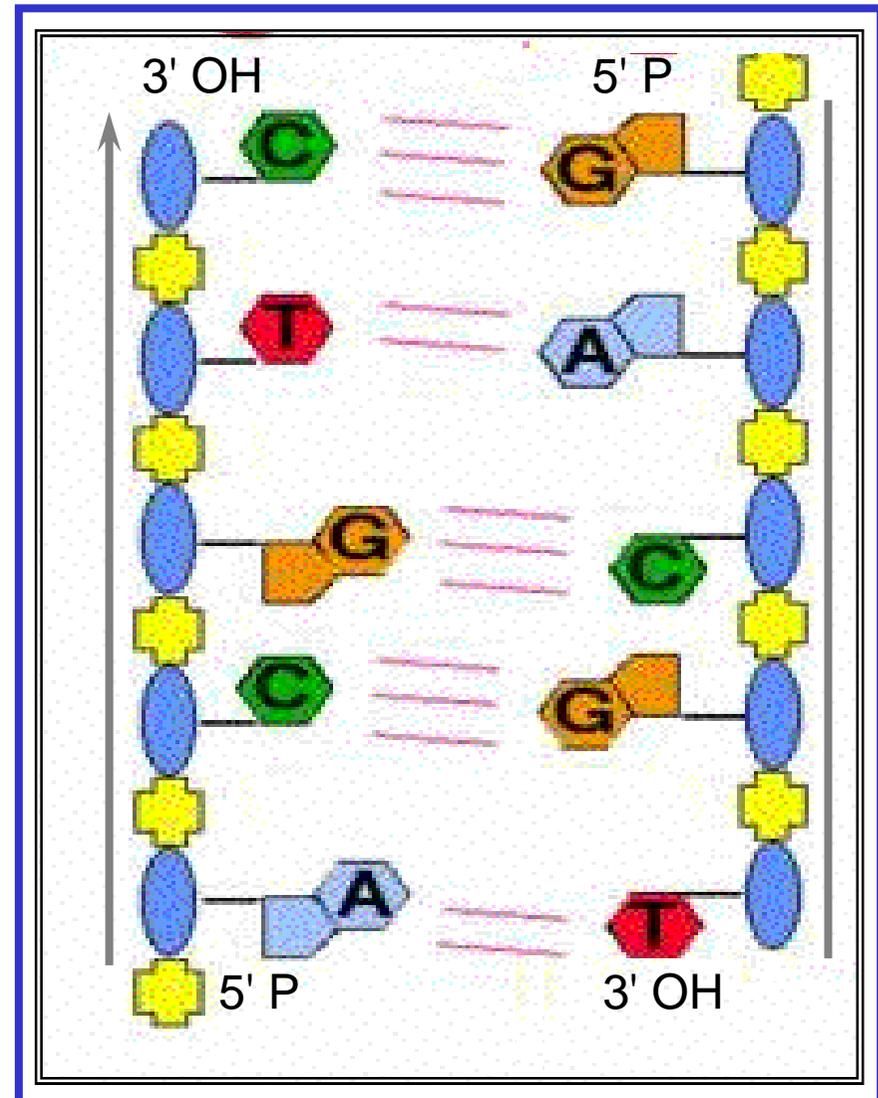
3 interactions  
hydrogène



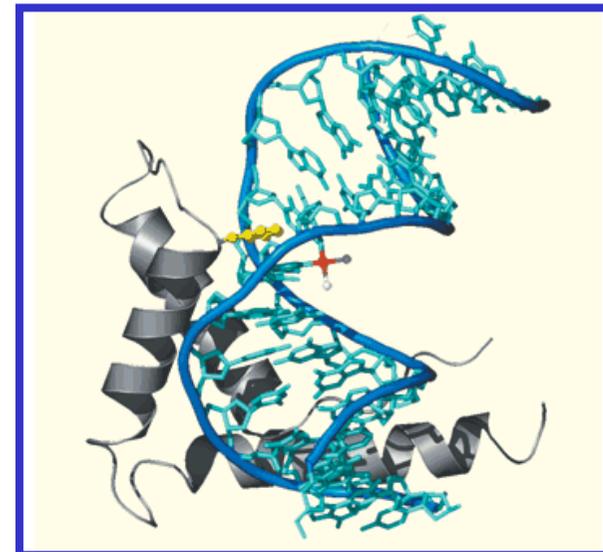
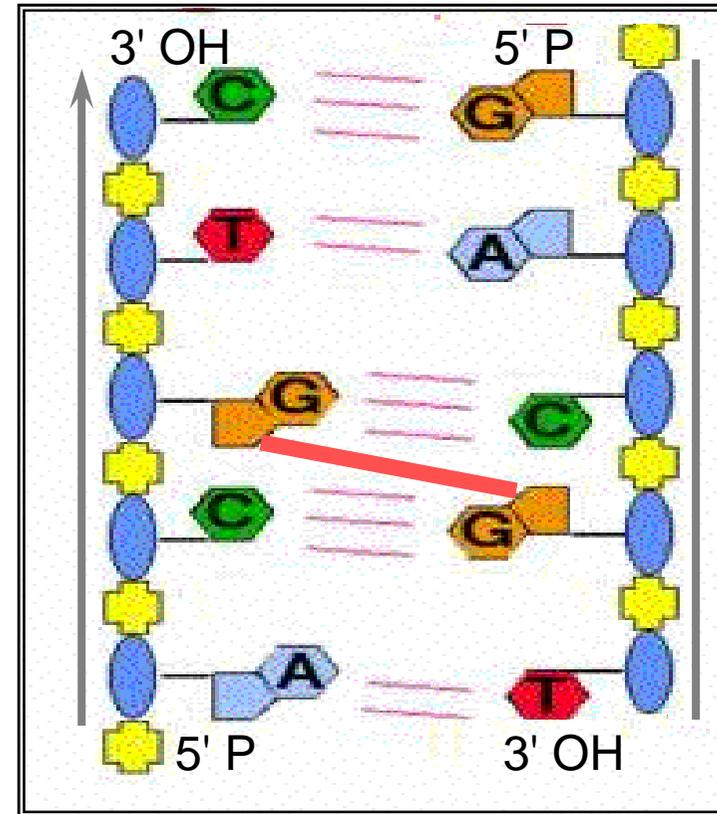
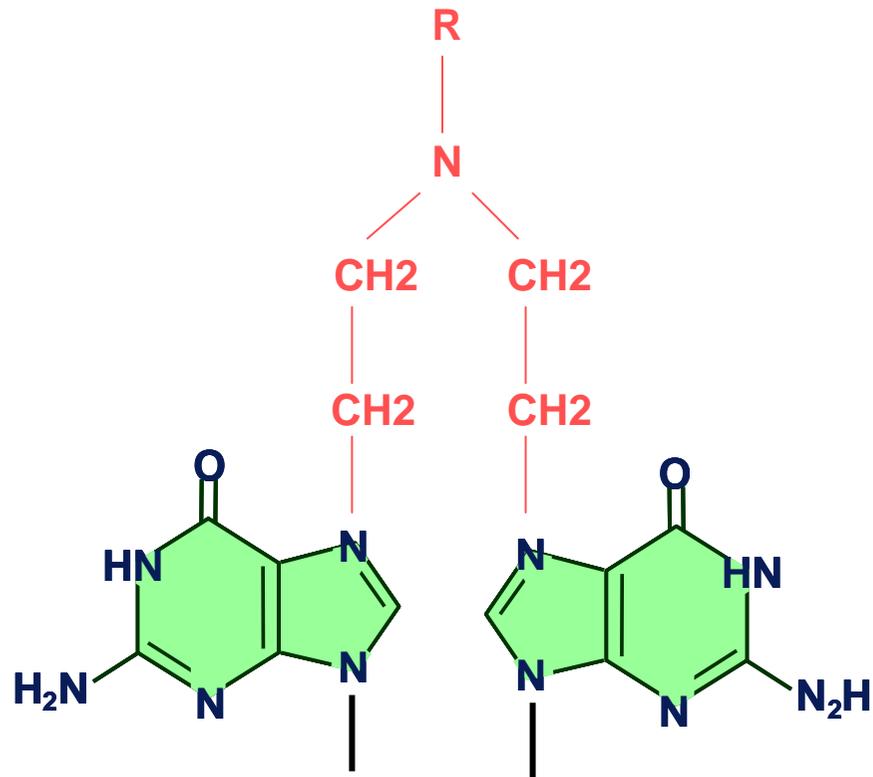
2 interactions  
hydrogène

# ADN : Chaînes anti-parallèles

- Orientations en sens opposés des 2 brins
- Interactions faibles
  - Dénaturation réversible
    - *In vitro*
      - Augmentation de T°
    - *In vivo*
      - Enzymes

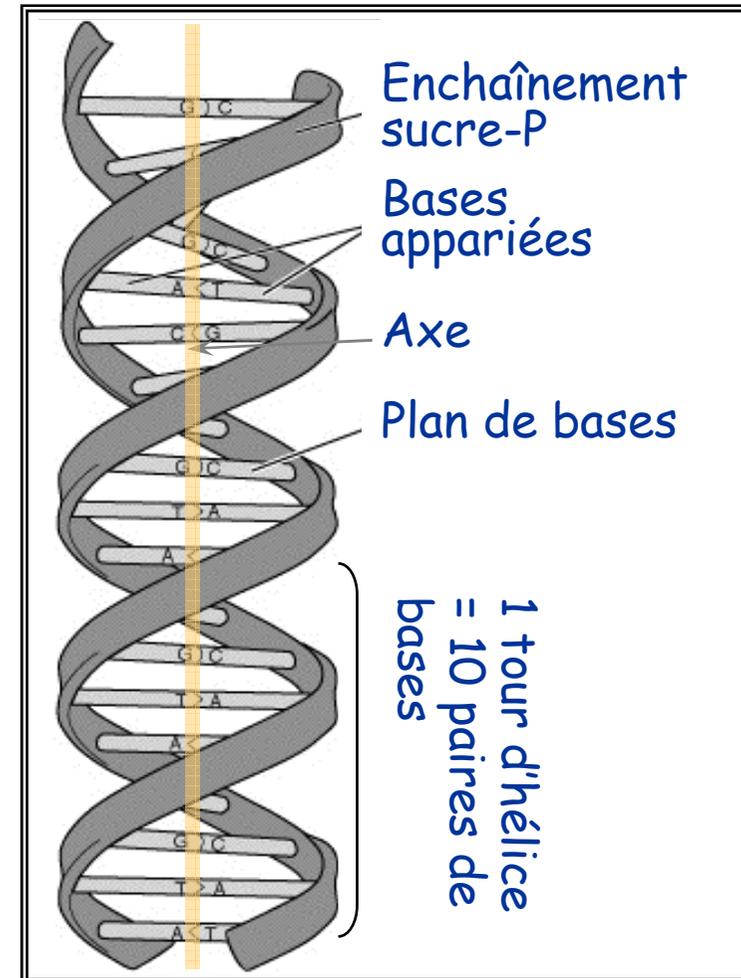


# Agents alkylants

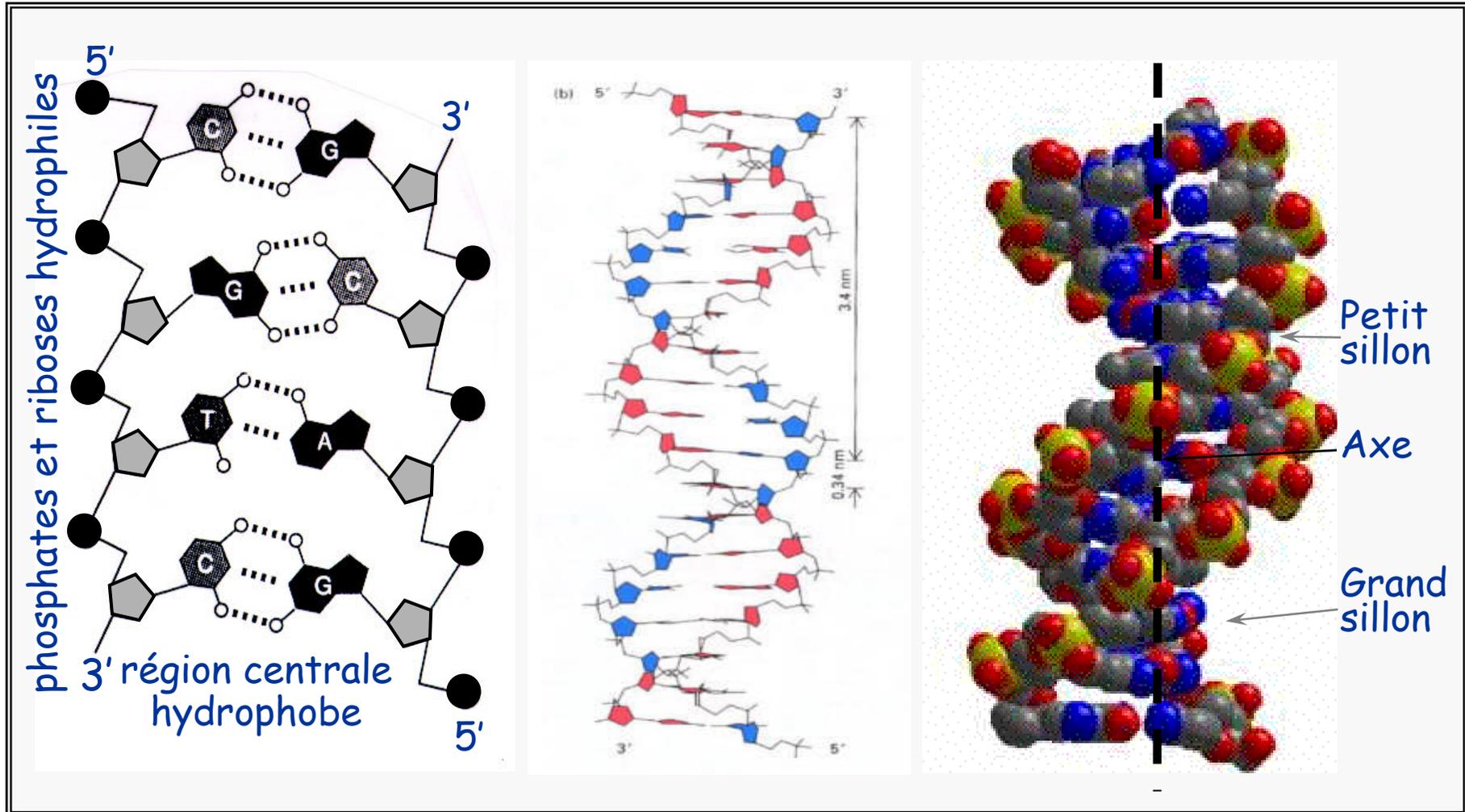


# ADN : Double hélice

- Hélice droite régulière
  - Pas de 3,4 nm (10 pb)
- Bases au centre
  - Plans parallèles
  - Axe  $\perp$  au plan des bases
- Oses – P en périphérie
- Stabilisation
  - Interactions Hydrogène
  - Transfert de charge



# Double hélice: modélisation



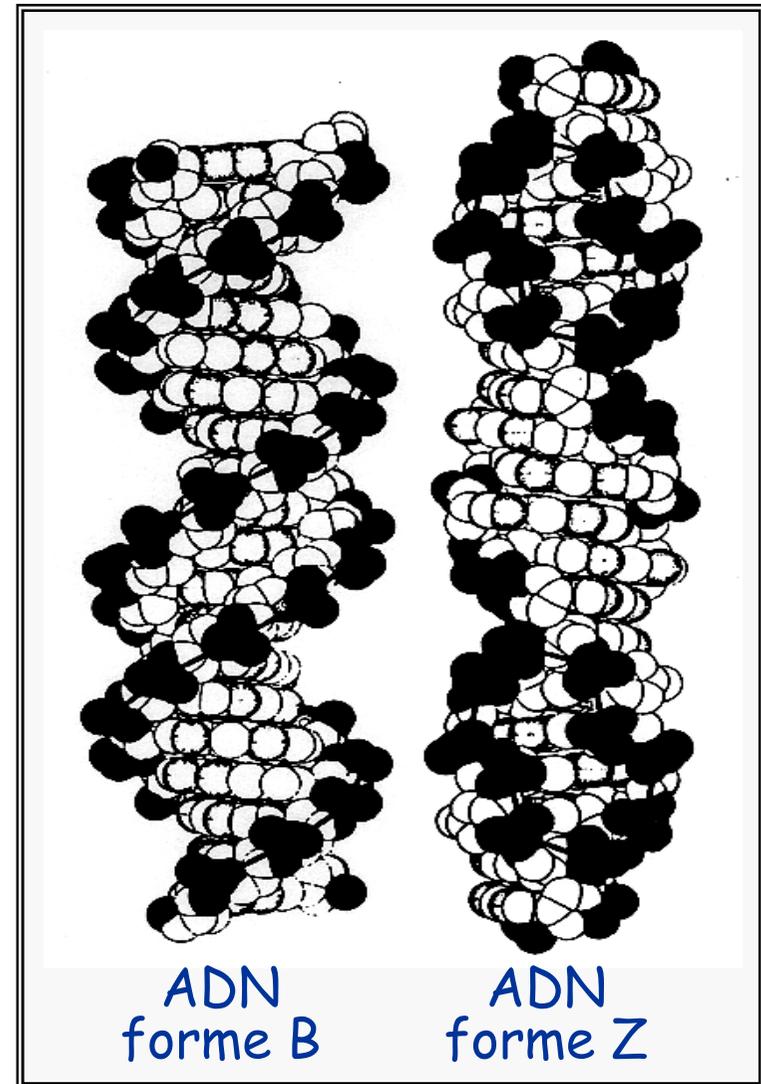
# Double hélice : image



**ADN visualisé à l'aide d'un microscope à effet Tunnel (MET)**

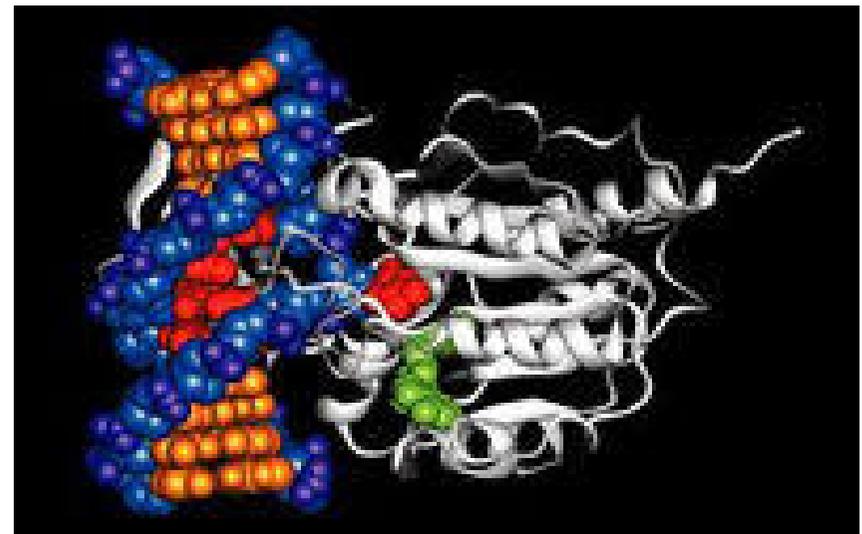
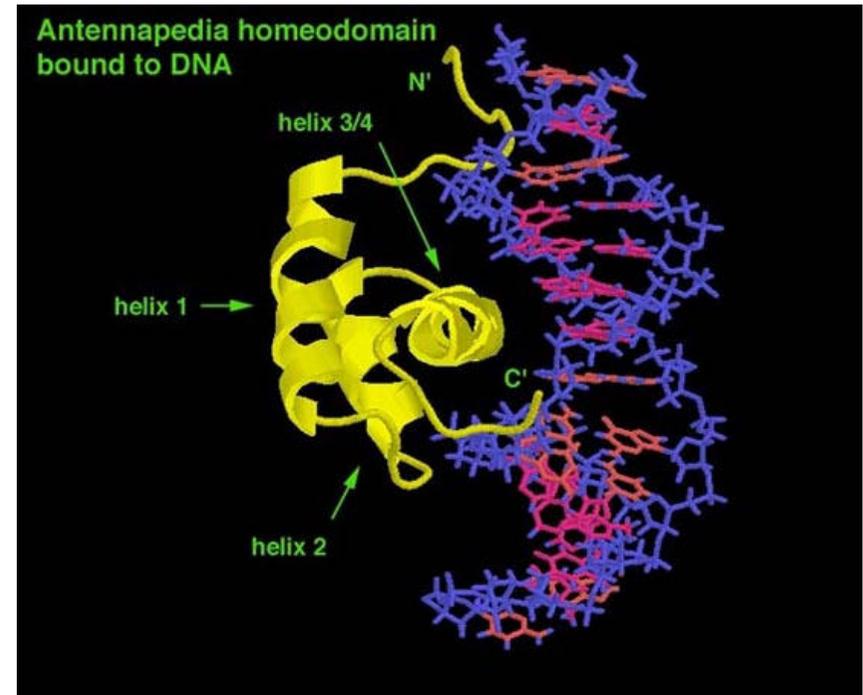
# Variations structurales

- **ADN-B**
  - Conformation habituelle majoritaire dans les conditions physiologiques
- **ADN-A**
  - Modification des conditions d'hydratation
- **ADN-Z**
  - Pas gauche (12 pb)



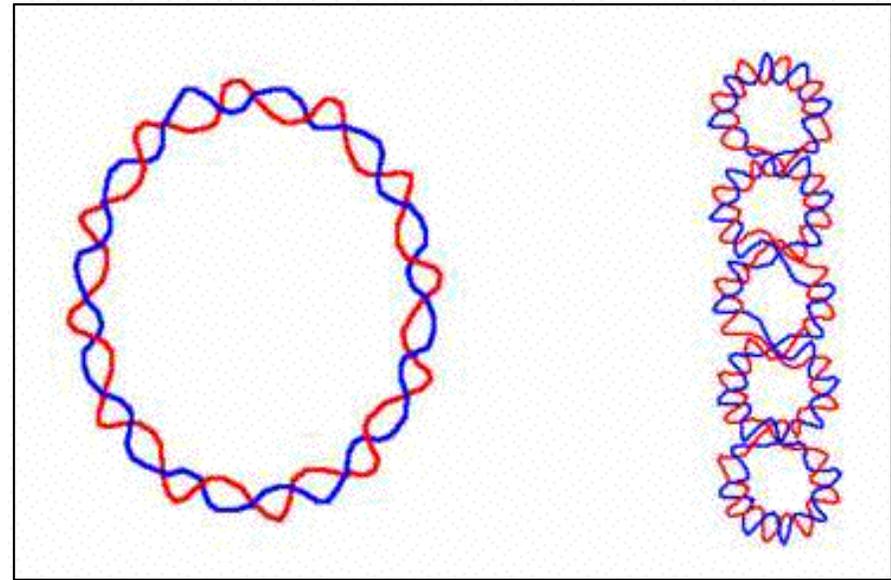
# Accessibilité de l'ADN

- Potentialité d'interactions nombreuses au niveau des zones accessibles
- Interactions avec des protéines
  - Interactions non spécifiques dans le petit sillon
  - Interactions spécifiques dans le grand sillon où les bases sont accessibles



# Structure tertiaire

- ADN natif
  - 2 possibilités : linéaire ou circulaire
  - Différentes conformations : Topoisomères
    - Etat relâché
    - Surenroulement
      - Positif
      - Négatif
    - Régulation
      - Enzymes : Topoisomérases
        - Topoisomérase I
        - Topoisomérase II



# ADN

- Structure primaire
  - Séquence de bases depuis l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'

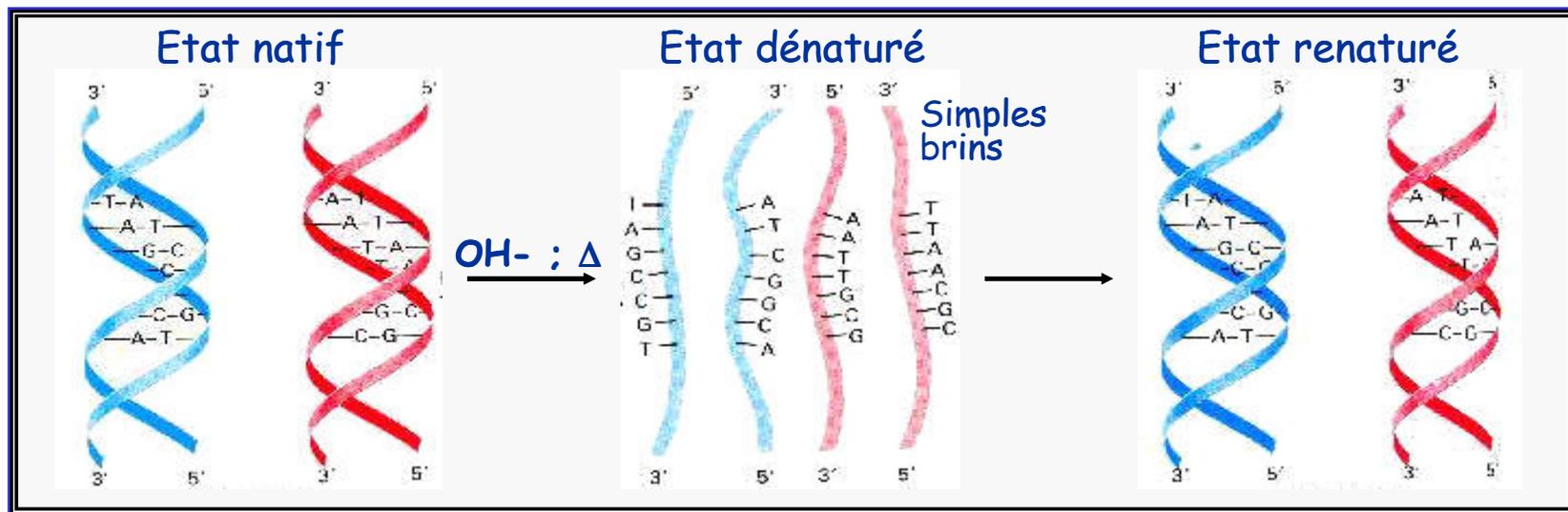
**= Information codante**

- Structure secondaire :
  - Enroulement en hélice
- Structure tertiaire
  - Repliement / enroulement

**= Information fonctionnelle  
(Compacter, Adapter, Réguler)**

# Propriétés physico-chimiques

- Absorbance : 260 nm
- **Dénaturation** : rupture des interactions faibles qui maintiennent les 2 brins associés
  - **Température**, solvant organiques, pH extrêmes
  - **T<sub>m</sub> : Température de fusion**
- **Renaturation** : réassociation des 2 brins si la cause dénaturante est supprimée



# ARN

- Caractéristiques générales
  - Sucre : **ribose** (stabilité)
  - Bases : A, G, C, **U**
  - Monocaténaire, pas de structure secondaire typique
  - Poids moléculaire variable
  - Linéaire

**Grande diversité et souplesse structurale**
- Caractéristiques des chaînes
  - Self complémentarité partielle
  - Arrangements tridimensionnels préférentiels

# ARN : éléments structuraux

- Structure primaire
  - séquence nucléotidique orientée 5' -> 3'
- Structure secondo-tertiaire
  - Organisation en partie sous forme bicaténaire au niveau de fragments courts

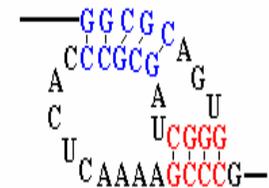
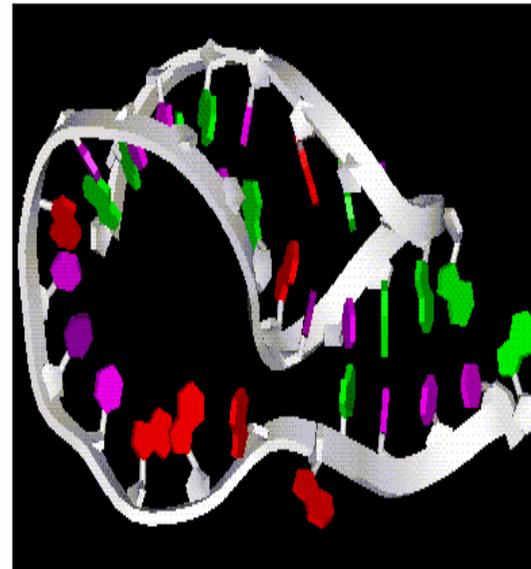
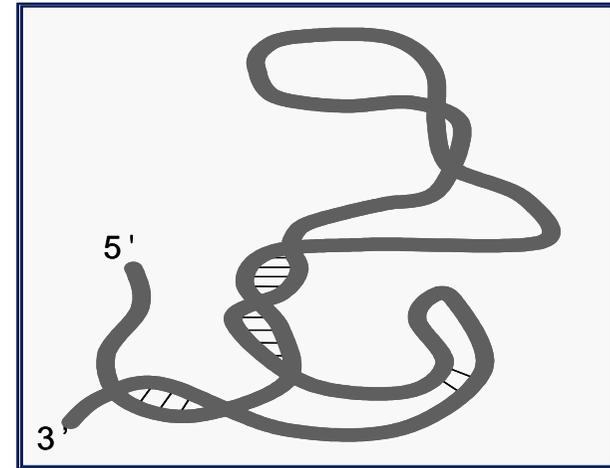
Adénine — Uracile  
Guanine — Cytosine

seules associations  
présentes dans les ARN  
= bases appariées

- Hélices de conformation A privilégiée (favorisée par le ribose)
- Motifs tiges-boucles (épingles à cheveux)
- Stabilisation
  - Interactions Hydrogènes
  - Le phénomène d'empilement
  - Ions : Cations

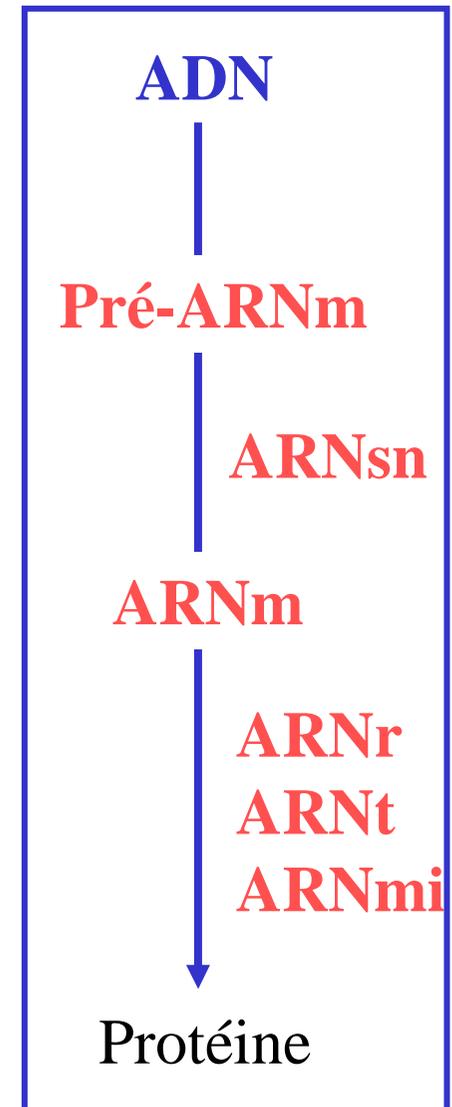
# Organisation spatiale des ARN

- Des complémentarités entraînent des repliements
  - Interactions faibles mais qui assurent la cohérence de l'édifice
- Motifs structuraux
  - Tige-boucle
  - Régions hélicoïdales
  - Pseudo-noeuds
- Rôles
  - Stabilisation
  - Interaction ARN-protéineEx : ancrage spécifique à une protéine pour former une structure ribonucléoprotéique



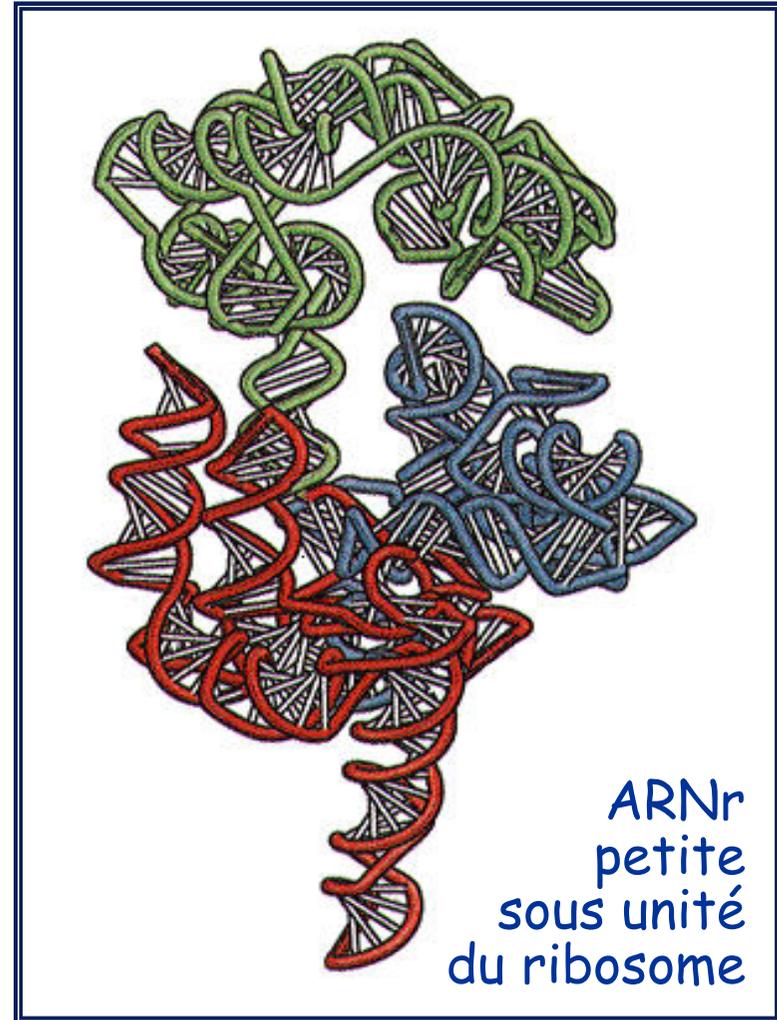
# Classification des ARN

- Grande diversité et souplesse structurale
- 3 groupes importants
  - ARN ribosomal (82%) : associé à des protéines pour former les ribosomes
  - ARN messenger (2%) : vecteurs de l'information génétique entre l'ADN et les protéines
  - ARN de transfert (16%) : transport des acides aminés sous forme d'ester au cours de la synthèse des protéines
- Autres ARN (<1%)
  - sn ARN
  - mi ARN



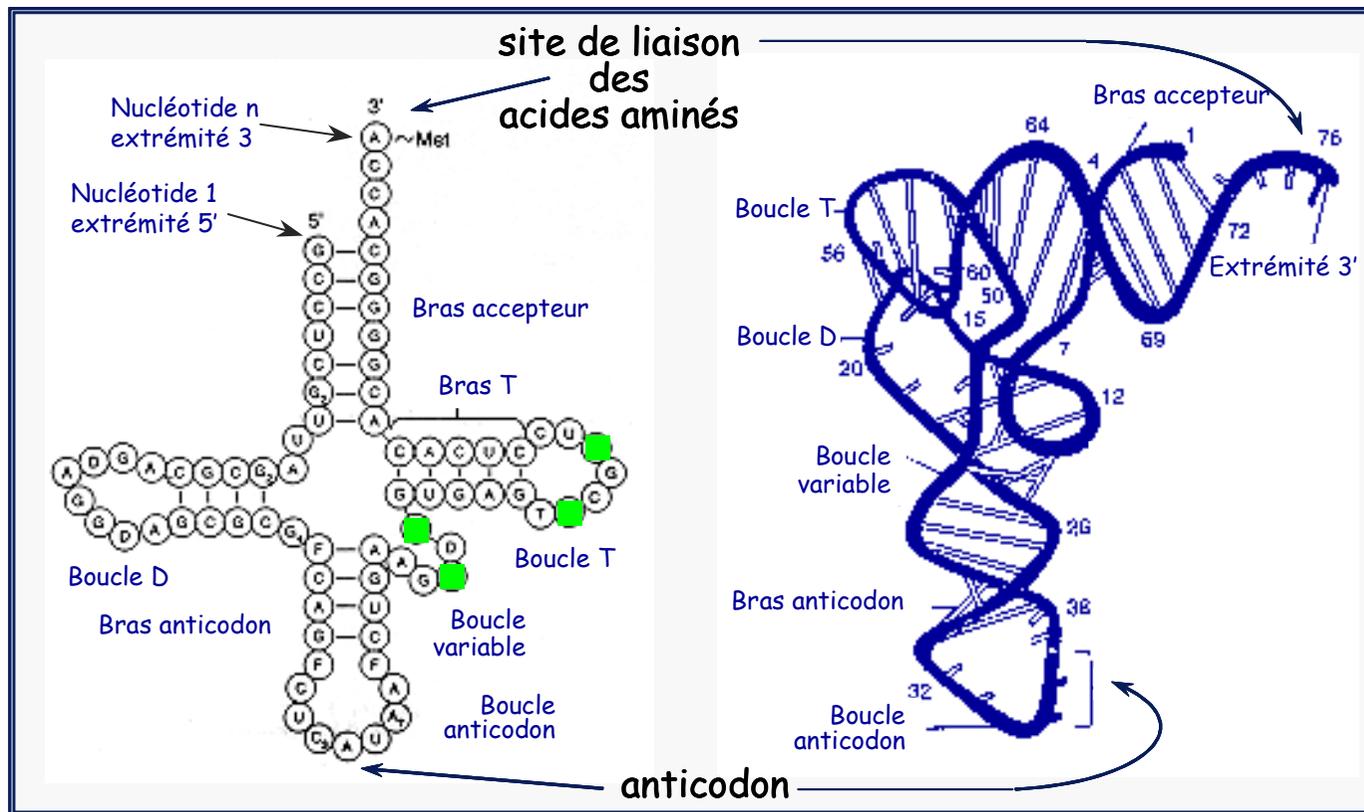
# ARN ribosomal

- Taille variable  
100 – 5000 nucléotides
- Eucaryotes :4 ARN r  
18S - 5S; 5,8S; 28S
- Associés au protéines
- Rôles
  - Structural
  - Reconnaissance



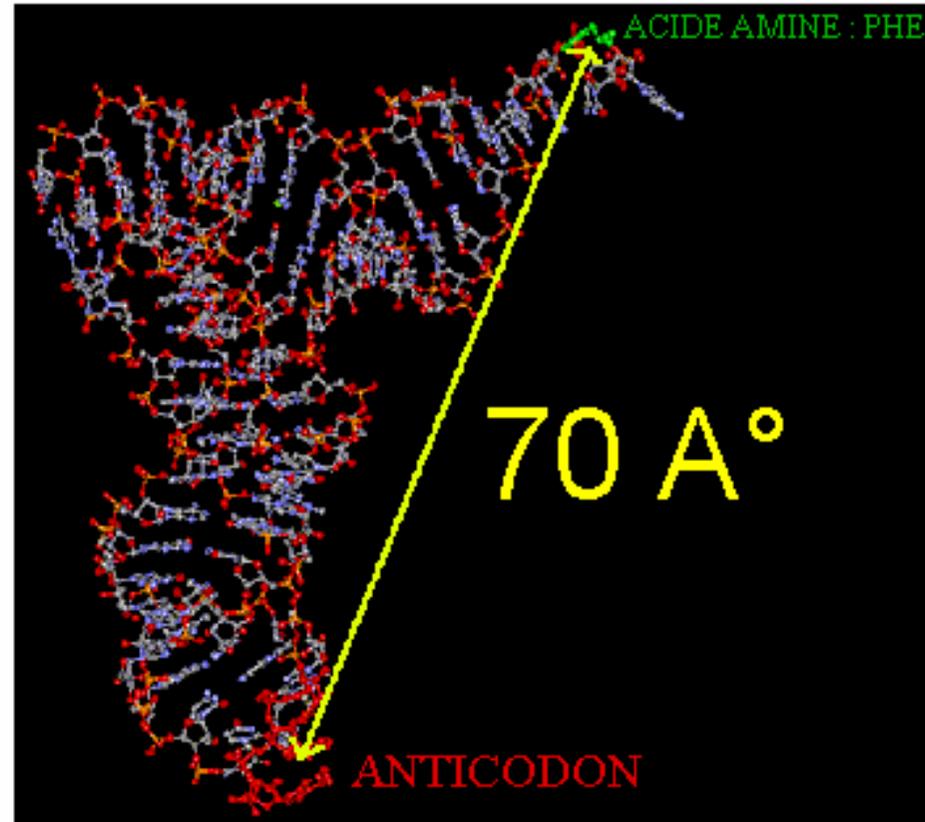
# ARN de transfert

- Petite taille : 70 – 90 nucléotides
- Structure
  - Primaire : bases atypiques, extrémité 3' CCA
  - Secondo – tertiaire
  - Triplet caractéristique : anticodon



# ARN de transfert

- Synthèse par 20 Aminoacyl-ARNt synthétases
- Spécificité : domaines structuraux
  - Anticodon, le bras D, le bras accepteur, le bras supplémentaire



# ARN messenger

- Taille variable correspondant à longueur du gène
- Structure
  - Primaire : séquence complémentaire du simple brin d'ADN matriciel
  - Secundo-tertiaire : forme linéaire
- Maturation
- Durée de vie courte

# Acides nucléiques

## Méthodes d'analyse

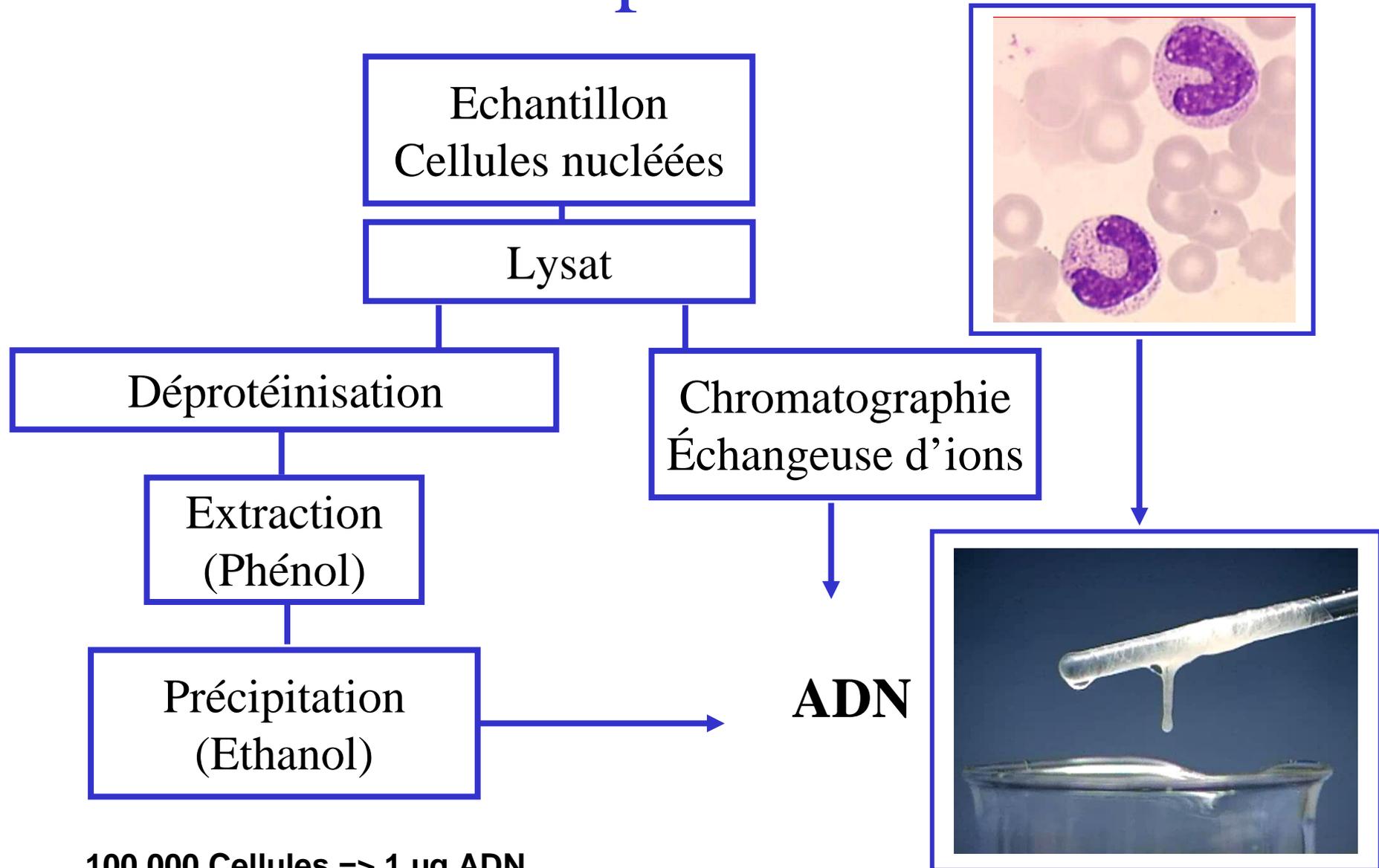
Sensibilité

Spécificité

# Méthodes d'analyse

- Principes de base et outils
  - Extraction et purification des acides nucléiques
  - Hydrolyse et nucléases
  - Hybridation et sondes
  - Réplication, transcription, amplification et polymérases
- Applications
  - Hybridation d'ADN
  - Amplification d'ADN (PCR)
  - Séquençage

# Extraction et purification d'ADN



100 000 Cellules => 1 µg ADN

# Spécificité

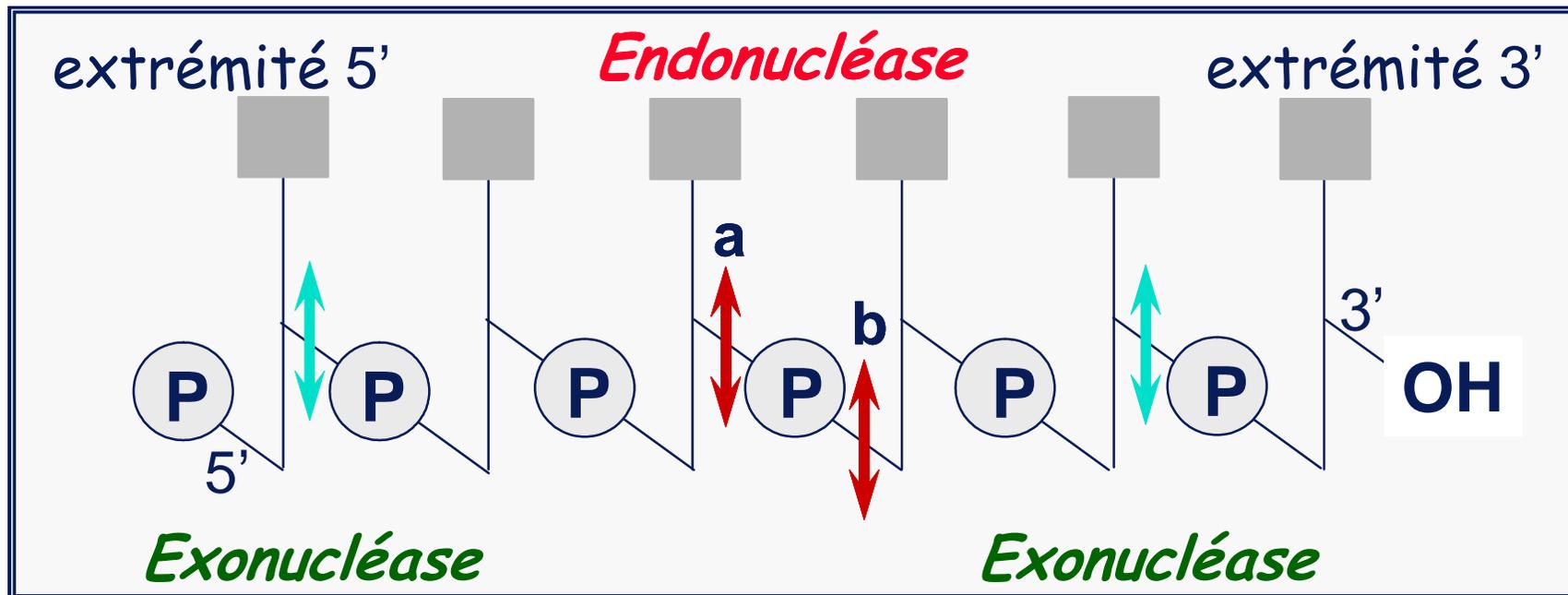
- 1/ Les enzymes de restriction
- 2/ Les sondes nucléiques

# Hydrolyse des acides nucléiques

- Rappels
  - Polymères
  - Enchaînement de nucléotides unis par des liaisons phosphodiester
- (Chimiques)
- Enzymatiques
  - Nucléases = Hydrolases de type estérases
  - 2 types selon l'acide nucléique
    - DNases      Désoxyribonucléases
    - RNases      Ribonucléase

# Nucléases

- Exonucléases : libèrent par hydrolyse le nucléotide situé à l'extrémité 5' ou 3'
- Endonucléases : hydrolyses une liaison ester interne



# Nucléases

- Spécificité

- Large

Nucléase de venin (ADN, ARN)

Type : exonucléase (a) extrémité 3'

- **Etroite** : Spécifique d'une séquence

## **Endonucléases de restriction**

Origine : Bactéries (système de protection)

Nomenclature : **E**scherichia **co**li **R** y13 => **EcoR** I

Spécificité : séquence palindromique

Activité : Hydrolyse d'une liaison phosphodiester sur les 2 brins

<b>EcoRI</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	-G -CTTAA	AATTC- G-
<b>HaeIII</b>	<b><i>Haemophilus aegyptius</i></b>	5'-GGCC-3' 3'-CCGG-5'	-GG -CC	CC- GG-

# Enzymes de restriction : application

---GTCTATACTCGGGAATTC CGCATACGTC---  
---CAGATATGAGCCTTAAGGCGTATGCAG---

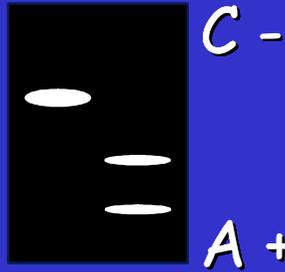
↓ *EcoRI*

AATTC CGCATACGTC---  
GGCGTATGCAG---

+

---GTCTATACTCGG  
---CAGATATGAGCCTTAA

- +



C -  
A +

*Electrophorèse*

- **Disparition ou modification de la séquence**
  - 1/ Mutation ponctuelle
  - 2/ Méthylation

# Dénaturation, Hybridation et Sondes

- Rappels
  - Bicaténaire
  - Chaînes complémentaires antiparallèles stabilisées par des interactions faibles
- Dénaturation
  - Température de fusion ( $T_m$ )
  - Chauffage 3 minutes à  $95^\circ\text{C}$
- Hybridation
  - Renaturation
  - **Sondes**
    - **Acide nucléique de synthèse (~ 20 – 30 bases)**
    - **Séquence spécifique d'une région ou d'un gène**
    - **Complémentaire et antiparallèle**
    - **Un traceur (Isotope ou Fluorophore)**
    - **Température d'hybridation**

5'-ATGCTCGCTCAGACACAAATGCATCTGT-3'  
3'-TACGAGCGAGTCTGTGTTTACGTAGACA-5'

↓ **Dénaturation**

5'-ATGCTCGCTCAGACACAAATGCATCTGT-3'  
3'-TACGAGCGAGTCTGTGTTTACGTAGACA-5'

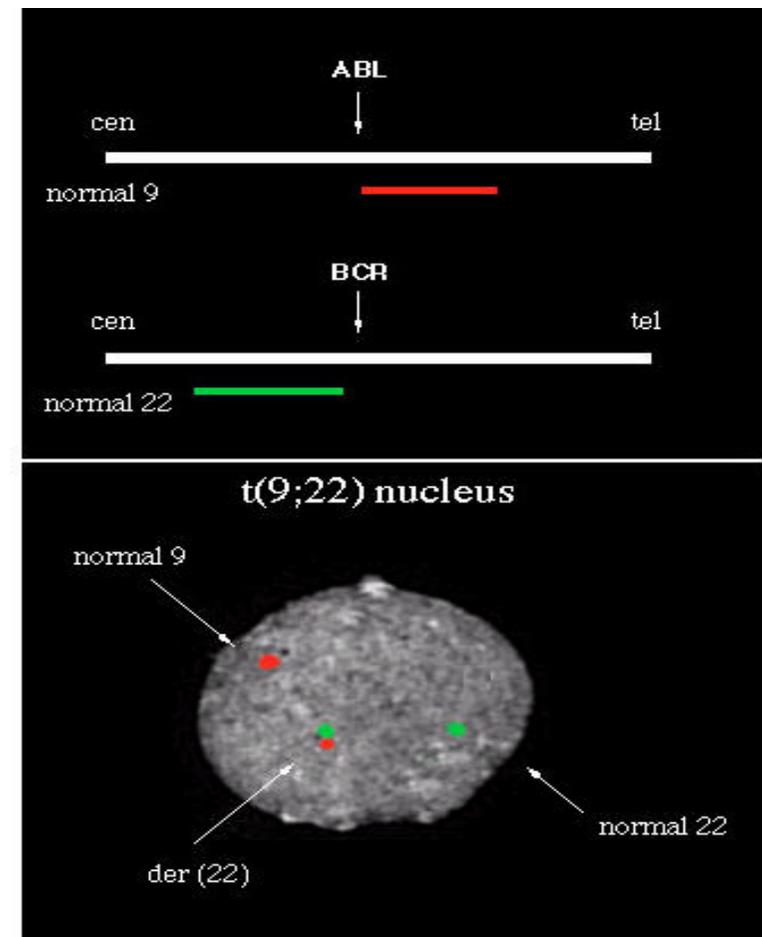
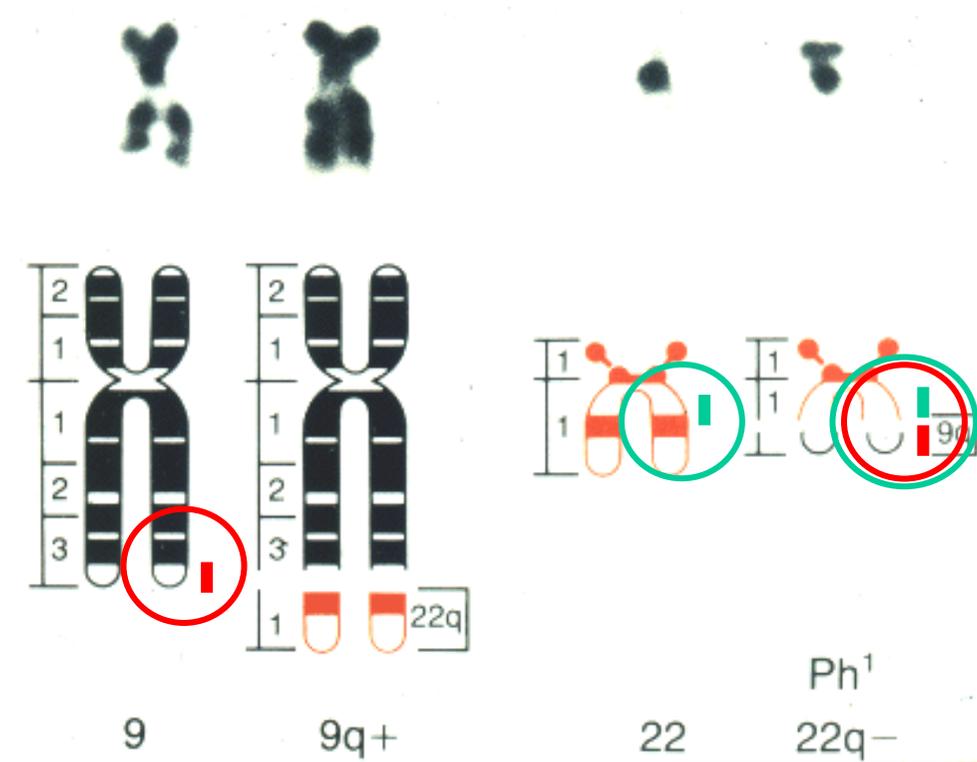
↓ **Hybridation**

5'-ATGCTCGCTCAGACACAAATGCATCTGT-3'  
3'-TACGAGCGAGTCTGTGTTTACGTAGACA-5'  
5'-CTCAGACACAAATGC<sub>C</sub>  
**Sonde hybridée** <sub>A</sub>  
T<sub>G\*</sub>-3'

\* **Atome radioactif ou molécule fluorescente**

# Hybridation sur cellules

- Détection d'une anomalie chromosomique  
(ex : translocation 9;22)

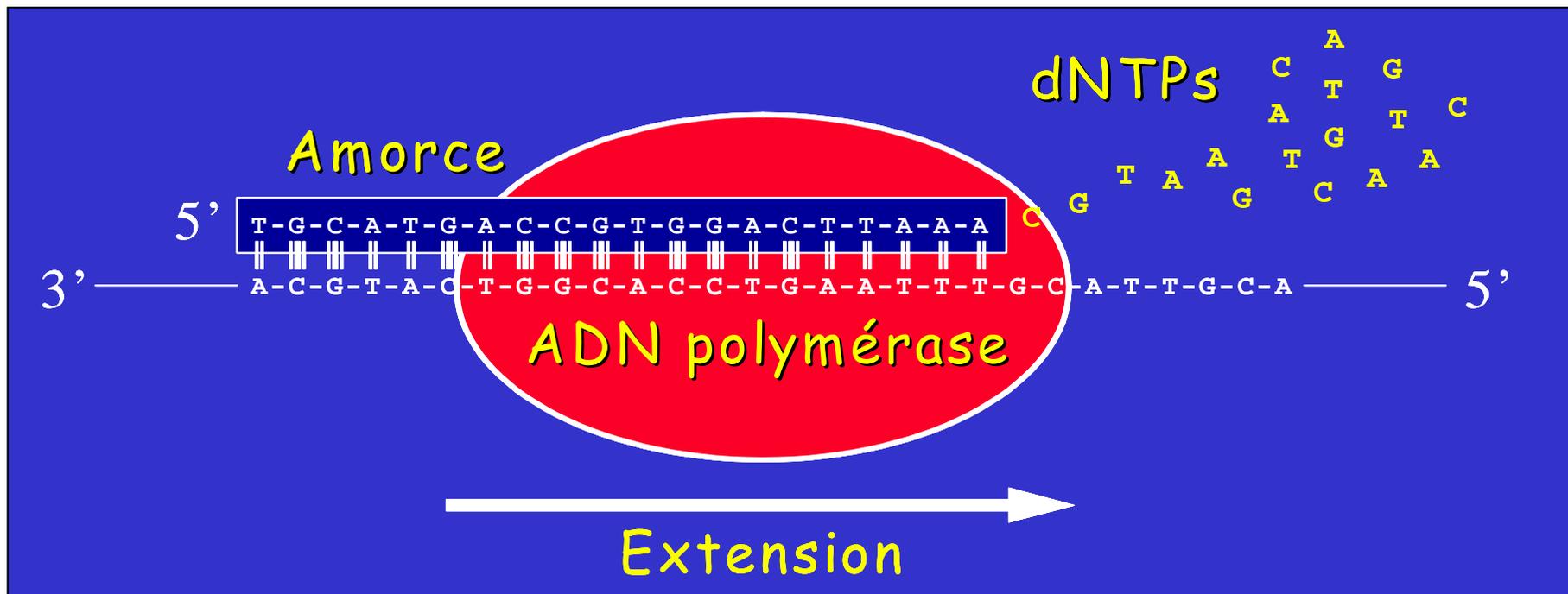


# Sensibilité

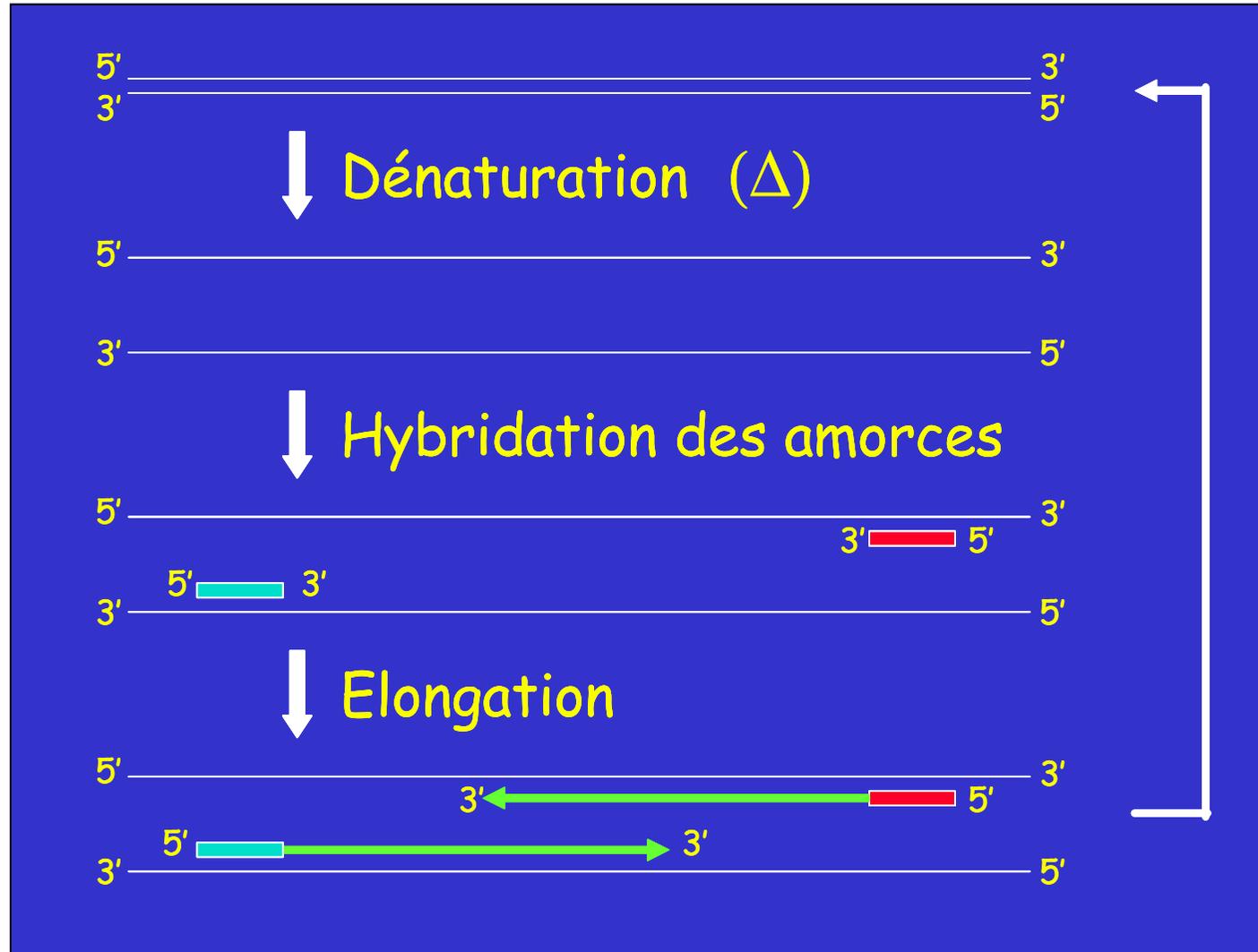
- La réplication et l'amplification

# ADN polymérase

- 2 types
  - ADN-polymérase ADN - dépendante
  - ADN-polymérase ARN- dépendante (transcriptase inverse)
- Eléments nécessaires
  - Matrice, désoxynucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), une amorce, une polymérase

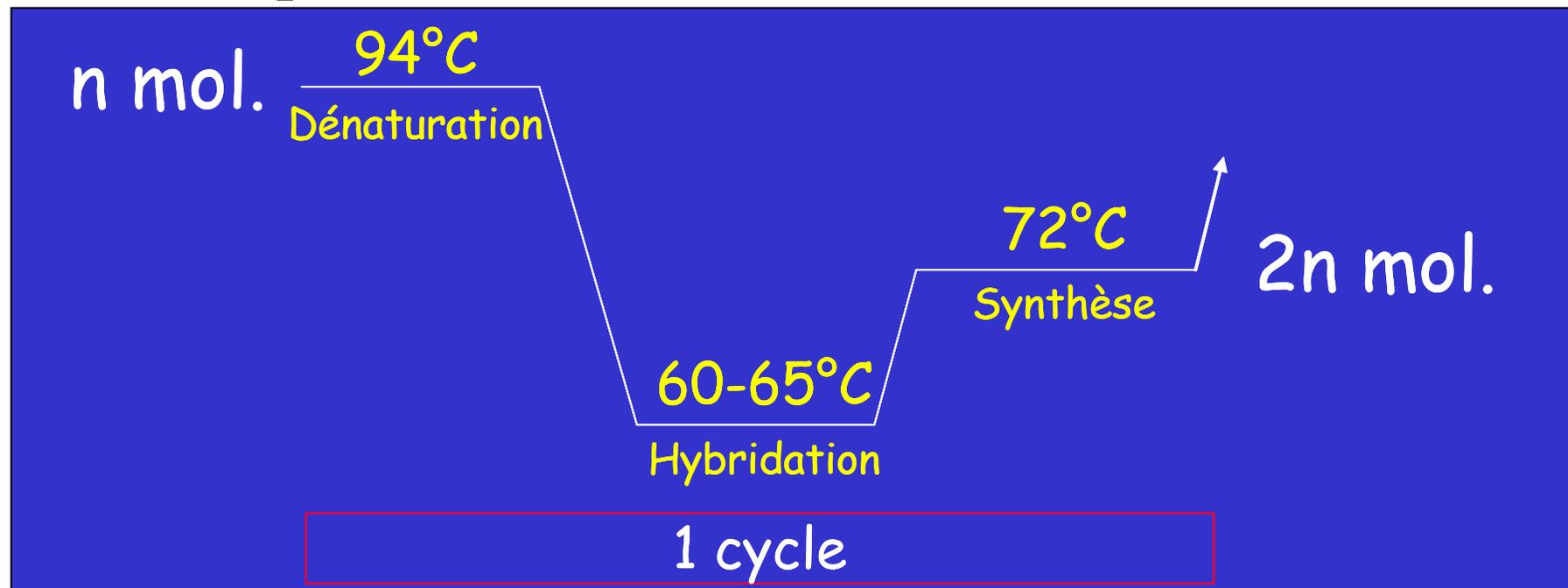


# Synthèse d'ADN par une ADN-polymérase ADN dépendante



# Amplification d'ADN par PCR

- Une enzyme clé : l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq polymérase)
  - Facteur d'amplification = 2
  - n cycles = facteur d'amplification théorique de  $2^n$
  - 30 cycles = facteur d'amplification de  $10^6 - 10^8$
- Les étapes



# Exemple d'application

- Détection de l'altération génétique responsable de la drépanocytose

# Détection d'une mutation par PCR et enzymes de restriction

- **Etape 1** : Extraction de l'ADN
- **Etape 2** : Amplification de la région concernée par la mutation ( ex : région de 260 pb )
- **Etape 3** : Digestion (Hydrolyse) par une enzyme de restriction spécifique du codon concerné par la mutation
- **Etape 4** : Electrophorèse et détermination de la taille des amplicons

# Détection de la mutation responsable de la drépanocytose

Séquence des codons 5, 6 et 7 du gène normal de la chaîne Bêta de l'Hb

5' CCT GAG GAG 3'  
3' GGA CTC CTC 5'

Séquence des codons 5, 6 et 7 du gène muté (Drépanocytose)

5' CCT GTG GAG 3'  
3' GGA CAC CTC 5'

Spécificité de l'enzyme de restriction *Ddel* 5' CTNAG 3' 5' C TNAG 3'  
3' GANTC 5' 3' GANT C 3'

Possibilité d'hydrolyse par *Ddel*

Gène Normal

OUI

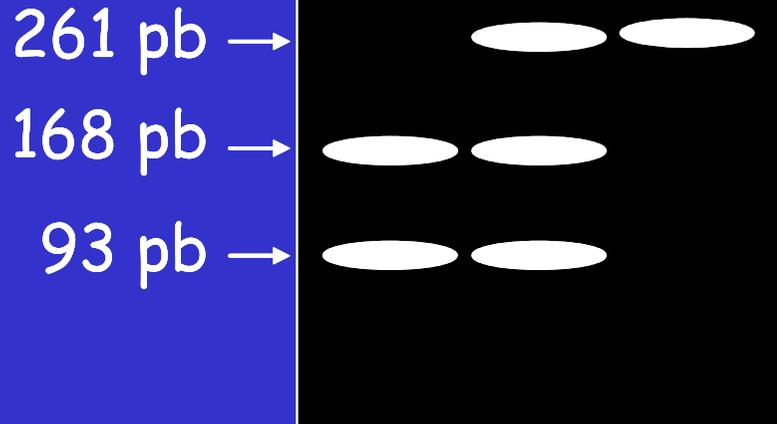
Amplicon hydrolysé

Gène muté

NON

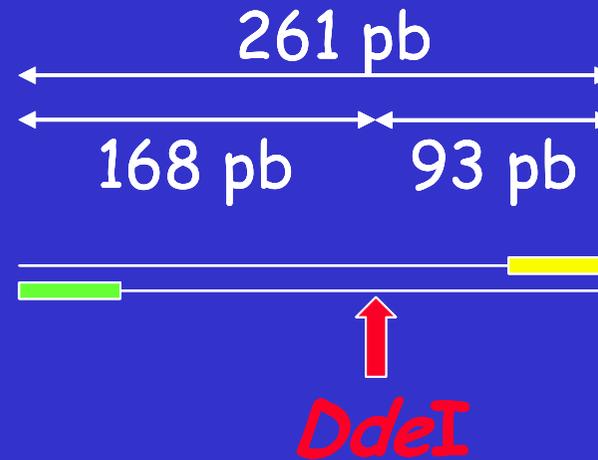
Amplicon non hydrolysé

AA AS SS



Electrophorèse

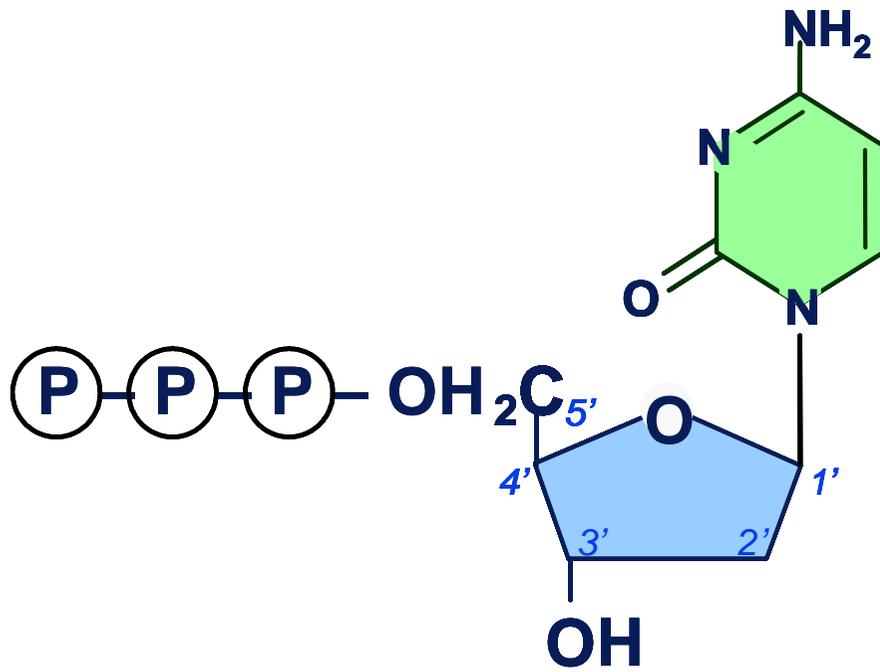
Codon normal coupé par *DdeI*  
Mutation abolit coupure



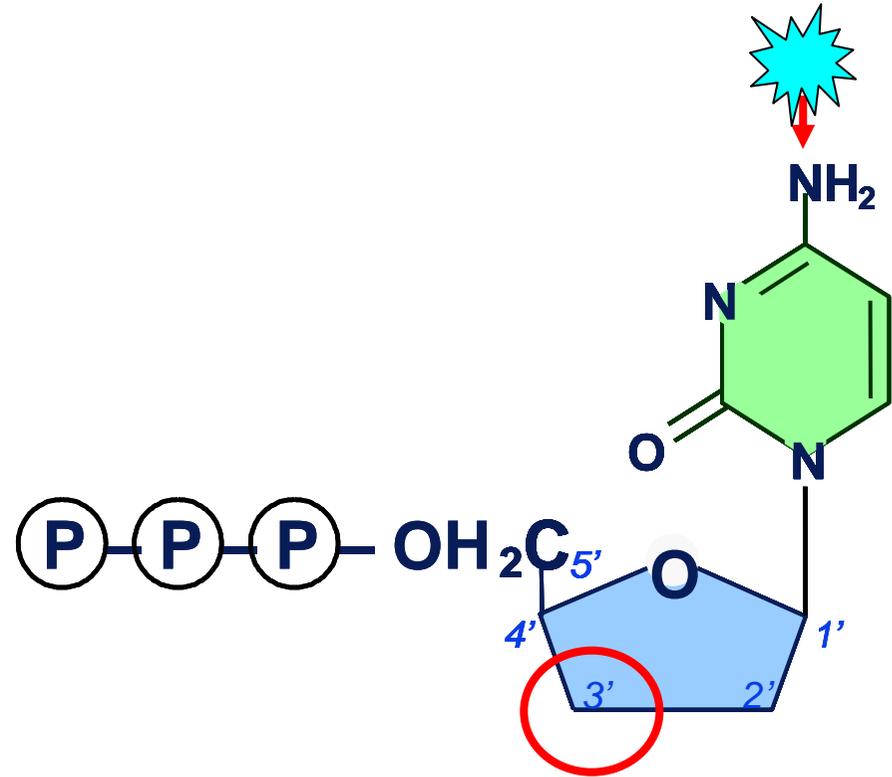
# Technique de séquençage

- Principe
  - Méthode enzymatique (de Sanger)  $\Rightarrow$  méthode de terminaison de chaîne aux didéoxynucléotides.
- Outils
  - Fragment simple brin (dénaturé) amplifié
  - Amorce
  - ADN polymérase ADN dépendante (Séquenase)
  - Désoxyribonucléotides (dNTP)
    - (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
  - **2'-3'-didéoxyribonucléotides fluorescents** (ddNTP)
    - (ddATP\*, ddCTP\*, ddGTP\*, ddTTP\*)  $\Rightarrow$  1% / dNTP

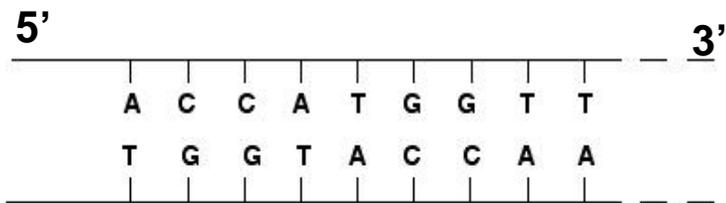
# dNTP vs ddNTP



**dCTP**

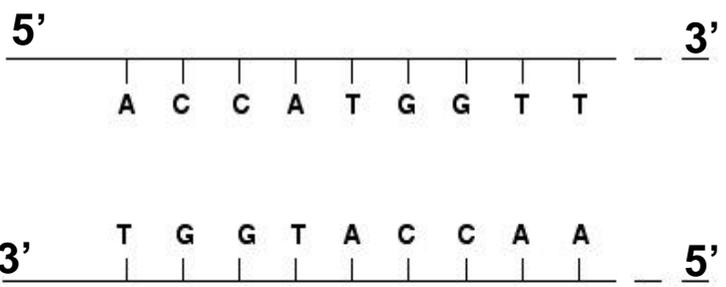


**2'-3'-ddCTP**

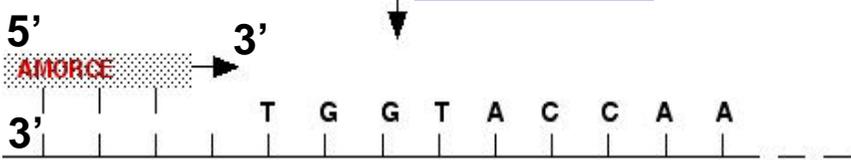


3'

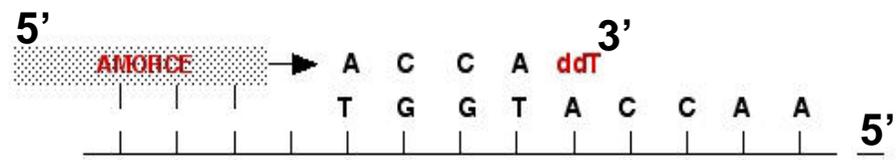
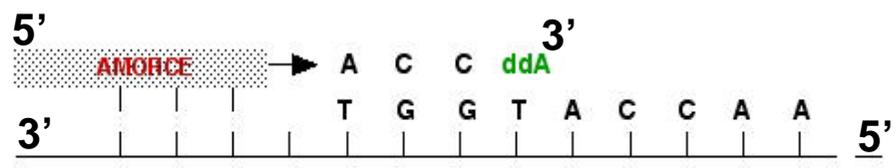
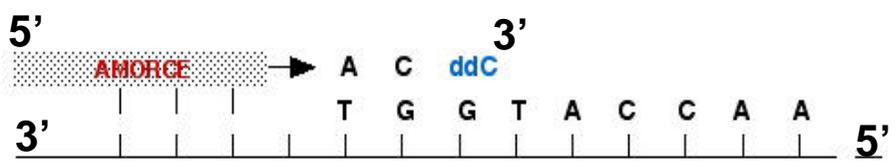
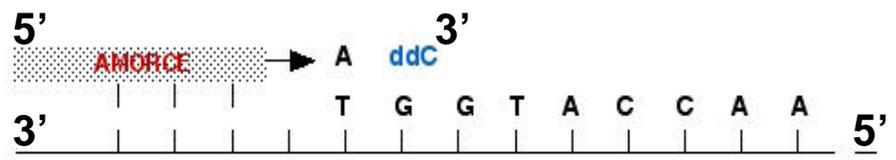
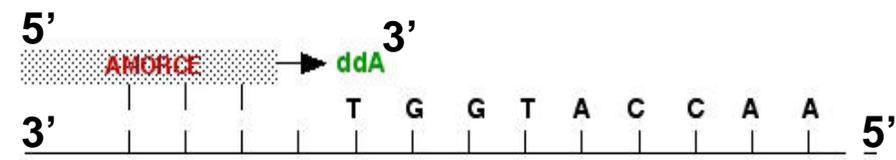
dénaturation



hybridation



synthèse





# Exemples d'applications

- **Microbiologie**
  - Détection et quantification de microorganismes
    - Virus, bactéries, parasites
  - Caractérisation génomique
- **Génétique**
  - Recherche de polymorphisme, de mutations
- **Cancérologie**
  - Recherche d'altérations génétiques
- **Médecine légale**
- **AVANTAGES**
  - Sensibilité                      Facteur d'amplification
  - Spécificité                      Amorces et Enzymes de restriction
  - Rapidité