

Les acides nucléiques

1. DÉFINITION	1
2. LES NUCLÉOTIDES	1
2.1. LES BASES AZOTÉES	2
2.1.1. Les bases pyrimidiques et les bases puriques	2
2.1.2. Les bases modifiées dans l'ADN ou l'ARN	3
2.1.3. Des dérivés : molécules d'intérêt biologique	3
2.1.4. Des analogues synthétiques	4
2.1.5. Des propriétés importantes des bases azotées	4
2.2. LES NUCLÉOSIDES	7
2.2.1. Le pentose des nucléosides	7
2.2.2. La liaison osidique	7
2.2.3. Nomenclature	8
2.2.4. Les nucléosides naturels	8
2.2.5. Des nucléosides naturels et singuliers	8
2.2.6. Des analogues synthétiques	9
2.3. LES NUCLÉOTIDES	9
2.3.1. Nomenclature	10
2.3.2. Les nucléotides d'intérêt biologique	11
3. LES ACIDES NUCLÉIQUES	12
3.1. LA STRUCTURE PRIMAIRE DES POLYMÈRES	13
3.1.1. La taille des polymères nucléiques	13
3.1.2. La liaison phosphodiester	13
3.2. LES DIFFÉRENTS GROUPES IONISABLES DES ACIDES NUCLÉIQUES	14
3.2.1. Les groupes phosphates	14
3.2.2. Les azotes des cycles des bases pyrimidiques et puriques	15
3.2.3. Les groupes amino liés aux cycles des bases	15
3.2.4. Les formes tautomères (lactame et lactime)	15
3.2.5. En guise de conclusion	15
3.3. L'HYDROLYSE DES ACIDES NUCLÉIQUES	17
3.3.1. L'hydrolyse chimique	17
3.3.2. L'hydrolyse enzymatique	17
3.4. STRUCTURE SPATIALE DES ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES	19
3.4.1. Quelques résultats expérimentaux sur les acides désoxyribonucléiques	19
3.4.2. Les doubles hélices	21
3.4.3. Retour sur les quelques résultats expérimentaux sur l'ADN natif	25

3.4.4.	<i>Quelques exemples de molécules d'ADN</i>	26
3.4.5.	<i>Des propriétés physico-chimiques souvent utilisées</i>	26
3.4.6.	<i>Pour la suite</i>	26
3.5.	STRUCTURE SPATIALE DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES	27
3.5.1.	<i>Les hélices d'ARN</i>	27
3.5.2.	<i>Les motifs élémentaires de structure secondaire d'ARN</i>	28
3.5.3.	<i>Pour la suite</i>	29

Les acides nucléiques

1. Définition

Le médecin suisse MIESCHER isola en 1869, à partir de leucocytes de pus de plaies infectées, une substance organique remarquablement riche en phosphore qu'il baptisa nucléine. Sa nature chimique fut élucidée par les travaux initiateurs de KOSSEL à partir de 1882 jusqu'à ceux de LEVENE en 1927 : il s'agissait de l'**acide désoxyribonucléique** dont l'abréviation est **ADN** (DNA : anglo-saxon), polymère d'unités dénommées **nucléotides**.

Les polynucléotides biologiques sont :

- le support moléculaire de l'information génétique : l'ADN (et ARN pour certains virus) est le support de l'hérédité et du codage des composés biologiques (les ARN, les protéines)
- des effecteurs de l'expression de l'ADN en peptides et protéines : **acide ribonucléique** dont l'abréviation est **ARN** (RNA : anglo-saxon) regroupés en trois classes :
 - les ARN messagers (ARNm)
 - les ARN de transfert (ARNt)
 - les ARN ribosomiaux (ARNr)

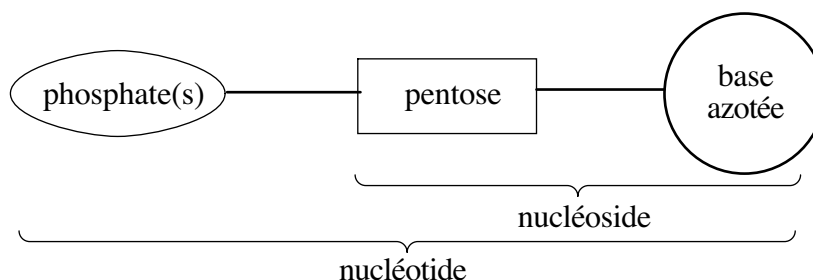
Les nucléotides ont des fonctions variées et importantes, ce sont :

- des composés à "haut potentiel énergétique" dont dépendent l'activation de molécules entrant dans des réactions endergoniques dans les réactions cellulaires,
- des composés structuraux de coenzymes,
- des seconds messagers intracellulaires de signaux et des médiateurs extracellulaires,
- des régulateurs d'activité de protéines lors de modifications covalentes.

2. Les nucléotides

Un nucléotide résulte de :

- 1) la condensation d'un ose (pentose) avec une base nucléique (hétérocycle azoté) qu'on appelle **nucléoside**.
- 2) l'estérification de l'ose d'un nucléoside par l'acide phosphorique produit un **nucléotide**.

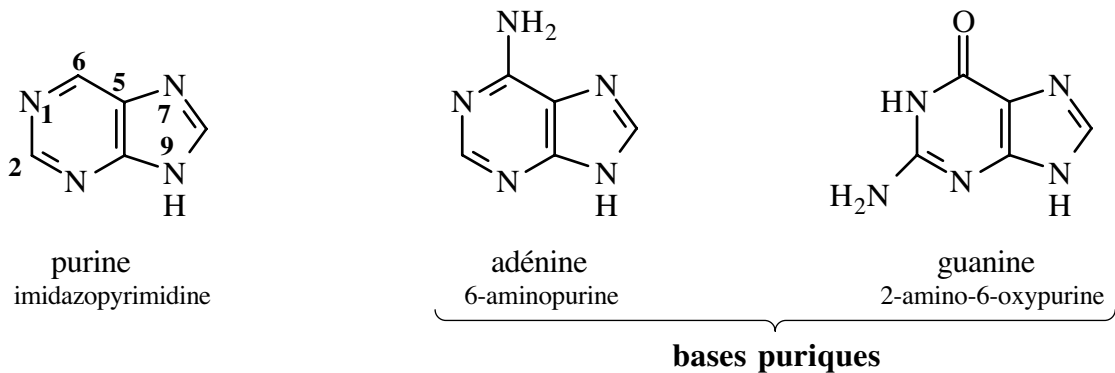
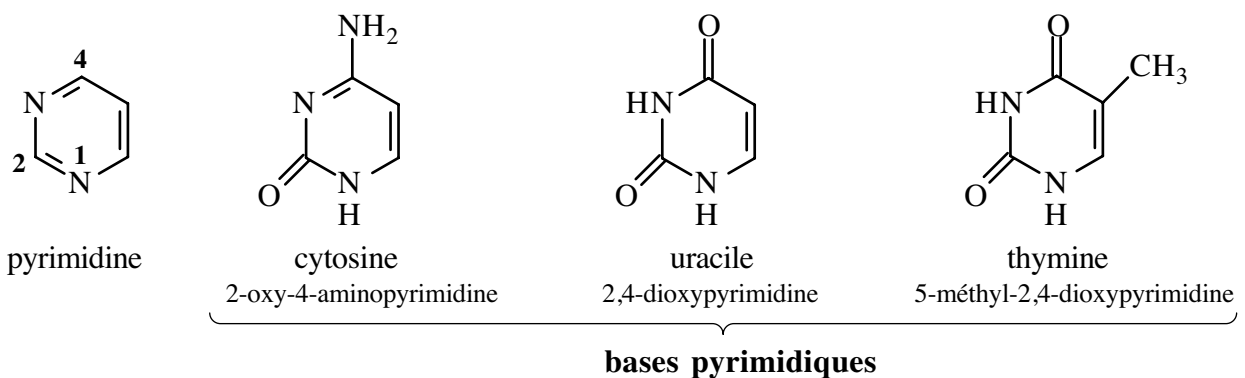


2.1. Les bases azotées

Cinq bases majeures, partagées en deux séries, entrent dans la composition des nucléotides et leurs polymères. Elles vont conférer aux composés biologiques dont elles font partie des propriétés capitales.

2.1.1. Les bases pyrimidiques et les bases puriques

Les dérivés **oxy** ou/et **amino** de la pyrimidine et de la purine forment les deux familles de base des nucléotides naturels.



Les noms courants des différentes bases n'ont aucun lien avec la nomenclature classique de la chimie organique, certains font référence à leurs conditions de découverte (thymine : thymus de veau).

Les nucléotides de l'ADN, comme ceux de l'ARN ne comportent que quatre de ces bases azotées :

- deux puriques communes aux deux types d'acides nucléiques
- une pyrimidique commune : la cytosine
- une pyrimidique spécifique : l'uracile pour l'ARN et son dérivé méthylé, la thymine pour l'ADN

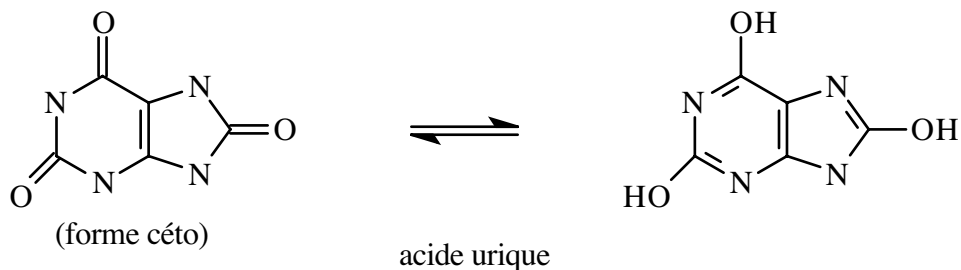
2.1.2. Les bases modifiées dans l'ADN ou l'ARN

Les modifications peuvent avoir lieu sur des sites cycliques ou exocycliques :

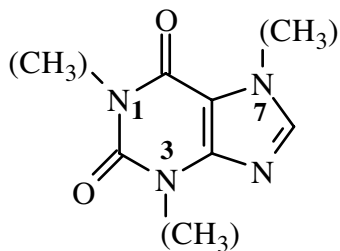
- la **5-méthylcytosine** est trouvée dans l'ADN des plantes et des animaux sauf les insectes. Cette méthylation est un signal négatif de la régulation de l'expression des gènes, le groupe méthyle favorisant une conformation de l'ADN qui ne peut fixer un facteur de transcription.
- la **N6-méthyladénine** est présente dans les bactéries. Cette méthylation permet aux enzymes de restriction de la bactérie de reconnaître son propre ADN vis-à-vis d'ADN étrangers (virus). D'autres méthylations permettent le fonctionnement d'un système de correction des éventuelles erreurs de réplication de fonctionner.
- Les ARN et principalement les ARNt contiennent une variété étendue de dérivés : des dérivés hydrogénés (5, 6-dihydrouracile) ou soufrés (**thiouracile** ou 2-oxy-4-thiopyrimidine) des pyrimidines, ou encore des formes altérées de la guanine, la **xanthine** (2, 6-oxypurine) et l'**hypoxanthine** (6-oxypurine).

2.1.3. Des dérivés : molécules d'intérêt biologique

- Lorsqu'elles ne sont pas recyclées, les bases puriques sont dégradées en **acide urique** par passage par des formes désaminées hypoxanthine et xanthine. Celui-ci, très peu soluble, est excrété par les primates.



- des produits de métabolisme des alcaloïdes végétaux sont des produits à usage pharmacologique : caféine (stimulant), théobromine et théophylline (stimulants cardiaques, relaxant des muscles lisses et vasodilatateurs)



1,3-diméthylxanthine ou théophylline

3,7-diméthylxanthine ou théobromine

1,3,7-triméthylxanthine ou caféine

produits de dégradation d'alcaloïdes végétaux

2.1.4. Des analogues synthétiques

Des analogues des bases nucléiques sont utilisés :

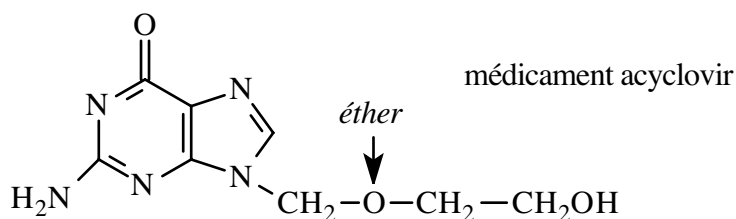
- comme molécules de marquage en biologie moléculaire : 5-bromouracile sur lequel peuvent être greffés des molécules marqueurs

- comme agents thérapeutiques, agissant en compétition avec les bases naturelles, ils bloquent la multiplication des bactéries, la mitose :

- antitumoraux : ce sont les dérivés fluorés (5-fluorouracile), thiols (6-thiopurine) ou encore aza (N remplace un C : 8-azaguanine) qui sont utilisés

- un antiviral classique (acyclovir) est un dérivé de la guanine :

(2-hydroxyéthoxyl)9-méthylguanine



2.1.5. Des propriétés importantes des bases azotées

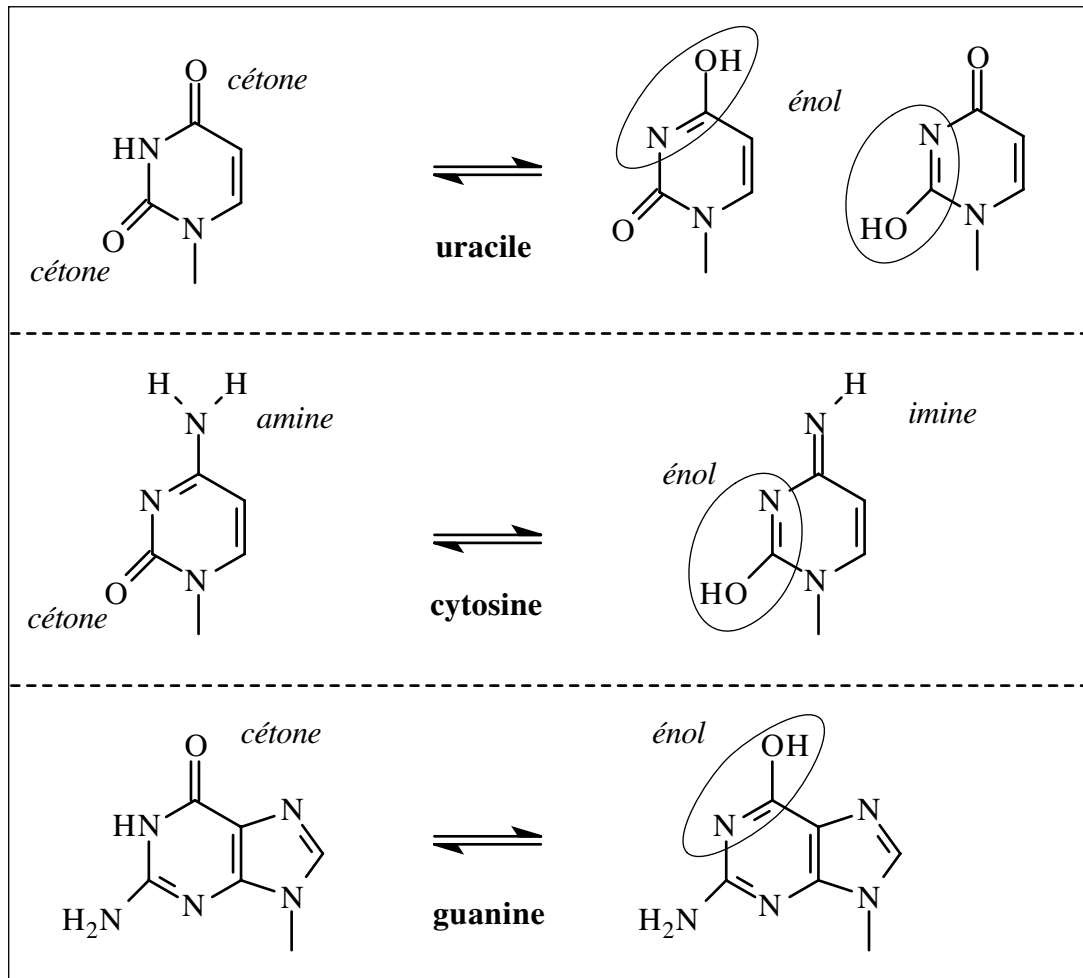
Leurs formules chimiques indiquent :

- les hétérocycles azotés sont susceptibles d'ionisation
- les doubles liaisons créent des systèmes conjugués pour lesquels certaines propriétés physiques sont remarquables (spectre, hydrophobicité, empilement (stacking))

La conjugaison des doubles liaisons

La résonance entre de nombreux atomes délocalise les électrons Π des doubles liaisons avec les conséquences suivantes :

- la molécule est fortement stabilisée dans une configuration plane
- la molécule existe sous différentes formes tautomères



Equilibres tautomériques à pH 7 des différentes bases liées à un ose (nucléoside ou nucléotide) :

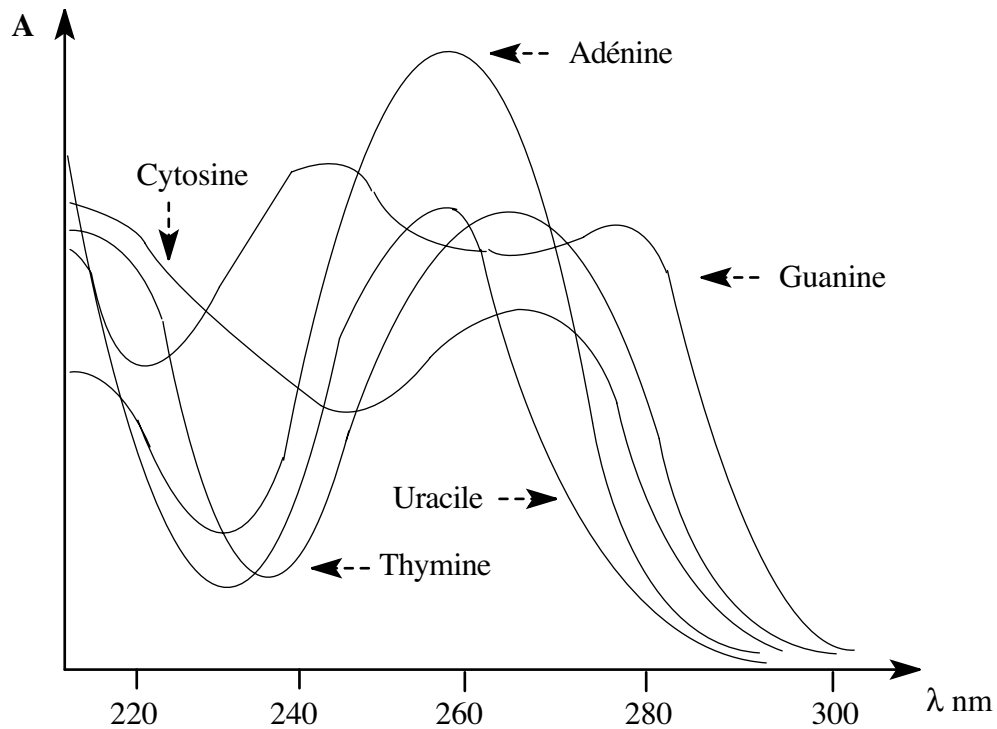
- forme **lactame** à gauche (cétone)
- forme **lactime** à droite (énol)

Les formes prépondérantes à pH7 sont les formes lactame (cétone) et amino.

Les propriétés spectrales

Les hétérocycles des différentes bases ainsi que leurs dérivés, nucléosides ou nucléotides, présentent des spectres d'absorption caractéristiques dans l'ultraviolet, spectres dépendant du pH. L'aire de ces spectres dans cette région est plus élevée pour les purines (à deux cycles) : leurs absorptions sont donc plus importantes. Ces propriétés optiques sont communément utilisées pour la détection, le dosage et le contrôle de pureté d'acides nucléiques.

La fluorescence de ces bases est par contre inutilisable : l'émission se situe dans la région UV 300-320 nm et elle est très faible (400 fois plus faible que celle du tryptophane pour les purines et 2500 fois pour les pyrimidines).



Les transformations chimiques des bases

1) la lente désamination est spontanée dans les cellules (100 fois moins importante pour les purines par rapport aux pyrimidines) :



2) les radiations altèrent les bases :

- l'irradiation dans l'ultraviolet ouvre les liaisons de deux bases superposées et les pontent par des liaisons covalentes
- les radiations ionisantes (rayons X ou gamma) ouvrent les cycles et les cassent.

3) de nombreux agents chimiques réagissent avec les bases :

- l'acide nitreux (HNO_2) et l'hydrogénosulfite de sodium HNO_2 ont une action désaminante. Ils font partie des conservateurs dans l'industrie alimentaire.
- les espèces réactives de l'oxygène (peroxydes, radicaux libres) font subir des dommages oxydatifs

2.2. Les nucléosides

Une liaison covalente (liaison N-osidique) fixe les bases à un pentose.

2.2.1. Le pentose des nucléosides

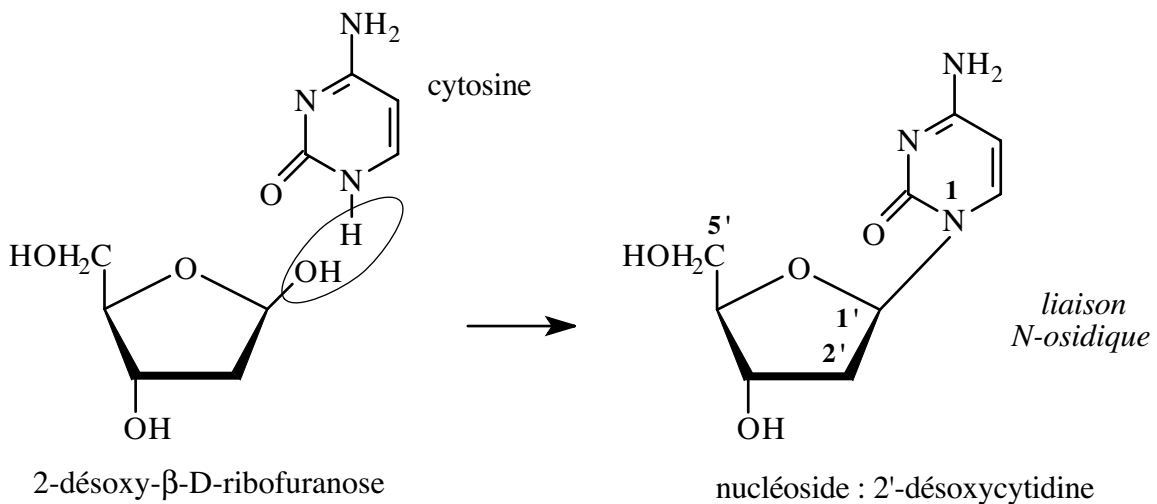
Il s'agit du ribose dans les acides ribonucléiques (ARN) et de son dérivé 2-désoxyribose dans les acides désoxyribonucléiques (ADN) avec les caractéristiques suivantes :

- l'énantiomère est de la série D
- l'ose est sous forme hémiacétalique (furanose)
- l'anomère est en conformation β

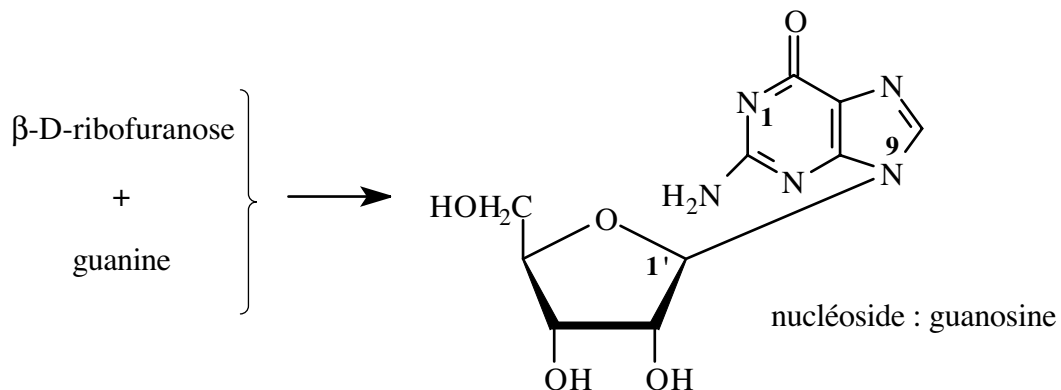
2.2.2. La liaison osidique

La liaison avec la base est de type **N-osidique** entre le carbone **1'** (carbone anomérique) du furanose en conformation β et l'azote **N1** des pyrimidines et **N9** des purines.

Exemple pour une base pyrimidique :



Exemple pour une base purique :



2.2.3. Nomenclature

Les noms des nucléosides ont comme suffixe :

- "osine" pour les nucléosides puriques
- "idine" pour les nucléosides pyrimidiques

Bases azotées		Ribonucléosides		Désoxyribonucléosides	
Nom	Symbole	Nom	Symbole	Nom	Symbole
cytosine	Cyt	cytidine	Cyd	2'-désoxycytidine	dCyd
uracile	Ura	uridine	Urd	2'-désoxyuridine	dUrd
thymine	Thy	thymidine*	Thd	(2'-désoxy)thymidine*	
adénine	Ade	adénosine	Ado	2'-désoxyadénosine	dAdo
guanine	Gua	guanosine	Guo	2'-désoxyguanosine	dGuo
xanthine	Xan	xanthosine	Xao	2'-désoxyxanthosine	dXao
hypoxanthine	Hyp	inosine	Ino	2'-désoxyinosine	dIno

* le nom de thymidine a été consacré pour la 2'-désoxythymidine : pour différencier ce ribonucléoside, on le désigne sous le nom de ribosylthymidine.

2.2.4. Les nucléosides naturels

Les nucléosides apparaissent en tant qu'intermédiaires dans le métabolisme des nucléotides, mais aussi comme cofacteurs ou coenzymes :

- la **S-adénosylméthionine** est un cofacteur de transfert de groupement méthyle. Le carbone 5' de l'adénosine est lié de manière covalente avec le groupement sulfhydryl de l'acide aminé méthionine.
- le coenzyme B12 (ou vitamine B12), dont la fonction permet de déplacer des groupes de manière intramoléculaire, est la 5'-désoxyadénosine liée au cobalt du noyau corrine.

2.2.5. Des nucléosides naturels et singuliers

- On trouve dans les ARN de transfert (ARNt) de l'uracile qui est lié au ribose non par l'azote mais par le carbone **C5** : c'est une liaison C-osidique. On trouve aussi des dérivés 2'-O-méthylés du ribose : la présence du méthyle donne une résistance à l'hydrolyse enzymatique ou même alcaline à l'ARNt.
- Certains microorganismes produisent des nucléosides libres dans lesquels l'ose est l'arabinose (quelquefois appelés spongonucléosides pour avoir été isolés dans des spongiaires).

L'arabinosylcytosine est utilisé comme médicament dans le traitement de l'herpès, l'arabosyladénosine dans les leucémies.

- La puromycine est un antibiotique sécrété par *Streptomyces*. La base est l'adénosine N-méthylée, le pentose la ribosamine dans lequel le carbone C3' est lié par une liaison amide à une O-méthyltyrosine.

2.2.6. Des analogues synthétiques

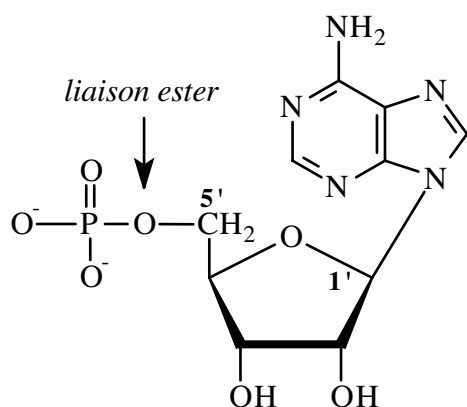
- les formes désoxy, halogénées ou non, des nucléosides puriques ou pyrimidiques sont des bactériostatiques, par exemple la 3'-désoxyadénosine.

- la 6-azauridine (carbone 6 remplacé par un azote) sont des médicaments utilisés dans les maladies prolifératives de l'épiderme.

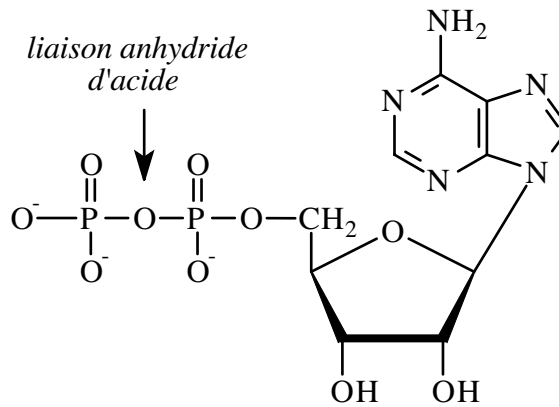
2.3. Les nucléotides

Ce sont des **esters-phosphates** de nucléosides (condensation alcool-acide).

Exemple de nucléotides :



adénosine 5'-monophosphate
(AMP)



adénosine 5'-diphosphate
(ADP)

- la phosphorylation peut concerner un ou plusieurs hydroxyles de l'ose.

- le groupe ester-phosphate peut être engagé soit :

- avec d'autres molécules d'acide phosphorique (ADP, ATP)

- avec un autre acide (adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate)

- avec un autre hydroxyle par une deuxième liaison ester dans les nucléotides cycliques

2.3.1. Nomenclature

Les noms des nucléotides obéissent à la règle suivante :

nucléoside **n'**[,n"] – **nb** phosphate : (n' numéro du carbone portant le phosphate)

nucléoside **n'**[:n"] – **nb** phosphate, cyclique pour les nucléotides cycliques

Les symboles ou abréviations classiques sont pour les nucléotides à une seule liaison ester :

- symbole **nucléoside n' P**[P]

- symbole **nucléoside** (une lettre) **N P** (N nombre de phosphate : M 1, D 2, T 3) pour le symbole à 3 lettres qui suppose que la liaison ester est porté par le carbone 5'.

Lorsque l'ose est le désoxyribose, le symbole est précédé de d (exemple dAMP)

Pour leur caractère acide, dû au groupement phosphate, les nucléotides monophosphates ont aussi la dénomination suivante :

acide **n'** [désoxy] (radical de la base) idylique : (n' numéro du carbone portant le phosphate)

Par exemple :

- **adénosine 3', 5'-biphosphate** : l'adénosine porte 2 groupements phosphate, l'un sur la carbone **C3** et l'autre sur le **C5**.

- **adénosine 3'-(mono)phosphate 5'-phosphosulfate** (PAPS) : l'adénosine porte un groupement phosphate en **C3'** et un groupement phosphate en **C5'** qui est lui-même lié à un sulfate par une liaison anhydride d'acide.

- **adénosine 5'-triphosphate** (Ado5' PPP ou ATP) : le plus connu des nucléotides où l'adénosine porte un groupement phosphate en **C5'**, lié à un autre phosphate par une liaison anhydride d'acide, lui-même lié à un autre phosphate par une liaison anhydride d'acide.

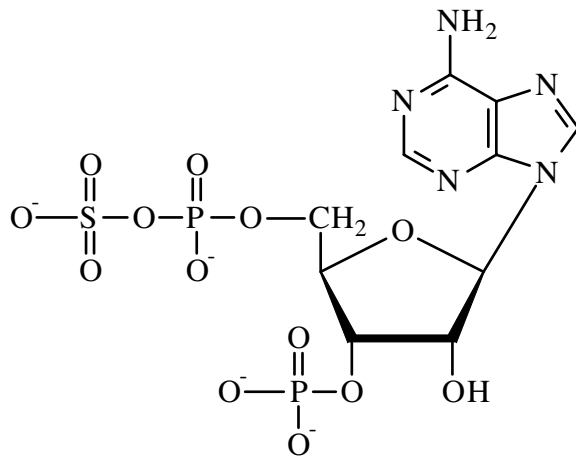
- **adénosine 3':5'-(mono)phosphate, cyclique** (Ado3':5' P ou AMPc) : 2 liaisons esters sur les carbonnes **C3'** et **C5'** avec un seul groupement phosphate

- **désoxyadénosine 5'-(mono)phosphate** (dAdo5' P ou dAMP) : l'adénosine porte un groupement phosphate en **C5'**, (ou encore acide 5' désoxy adénylique)

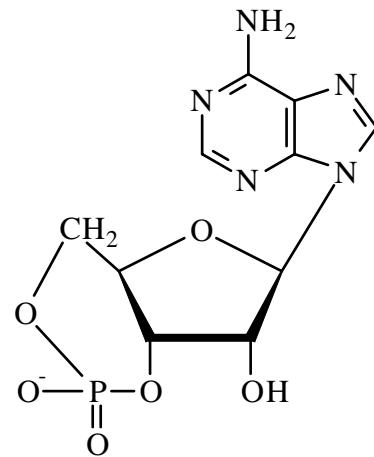
- **adénosine 5'-(mono)phosphate** (Ado5' P ou AMP) : l'adénosine porte un groupement phosphate en **C5'**, (ou encore acide 5' adénylique)

- **cytidine 5'-(mono)phosphate** (Cyd5' P ou CMP) : la cytidine porte un groupement phosphate en **C5'**, (ou encore acide 5' cytidylique)

- **uridine 5'-(mono)phosphate** (Urd5' P ou UMP) : la cytidine porte un groupement phosphate en **C5'**, (ou encore acide 5' uridylique)



adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate



adénosine 3': 5'-(mono)phosphate, cyclique

2.3.2. Les nucléotides d'intérêt biologique

Les nucléosides monophosphates

La phosphorylation sur le carbone C5' est la plus courante. L'AMP est l'un des composés que l'on trouve dans de nombreuses réactions du métabolisme.

Les nucléosides 5'-phosphates sont les éléments de bases de polymères tels que l'ADN et l'ARN que l'on trouve dans tous les organismes vivants.

Les nucléosides diphosphates

Le PAPS (adénosine 3'-(mono)phosphate 5'-phosphosulfate) est impliqué dans des réactions de sulfatation des glycannes et des lipides.

L'ADP (et les autres nucléosides PP classiques) est un composé qui a de nombreuses différentes fonctions, citons parmi elles :

- molécule à haut potentiel énergétique (hydrolyse de la liaison anhydride d'acide)
- molécule intermédiaire dans la production d'ATP
- activateur d'enzyme allostérique comme la L-glutamate-déshydrogénase

Les nucléosides triphosphates

- L'une des molécules les plus "universelles" est l'ATP : ses deux liaisons anhydride d'acide (enthalpie libre d'hydrolyse d'une liaison de l'ordre de $30\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) sont une source d'énergie utilisable :

- par des réactions de catalyse enzymatique impossibles sans couplage
- pour le transport transmembranaire actif
- pour la contraction musculaire
- etc...

D'autres nucléosides 5' triphosphates jouent un rôle identique à celui de l'ATP mais à un degré beaucoup plus minoritaire.

Les nucléosides 5' triphosphates sont aussi des donneurs de phosphates.

- Les nucléosides 5' triphosphates sont les précurseurs de base dans la biosynthèse des acides nucléiques.

Des constituants de coenzymes

Citons :

- l'adénosine 3'-phosphate 5'-diphosphate est une partie de la molécule d'un coenzyme d'acétylation, le **coenzyme A**.

- l'adénosine 5'-diphosphate fait partie de la structure de deux coenzymes d'oxydo-réduction : le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et le flavine adénine dinucléotide (FAD)

- le PAPS est impliqué dans des réactions de sulfatation des glycanes et des lipides

Les seconds messagers

Un second messenger est une molécule qui assure le relais intracellulaire d'un signal extracellulaire. L'AMPc fut identifié comme le second messenger universel et dans quelques cas, ce fût le GMPc. Il est produit sur la face intracellulaire de la membrane plasmique après fixation externe d'une molécule signal.

3. Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des enchaînements de nucléosides 5'-phosphates dont l'assemblage est réalisé par une **liaison phosphodiester**. Les deux types d'acides nucléiques sont :

- **ADN** (acide désoxyribonucléique) composé de :

- un ose qui est le 2'-désoxyribose

- la base est soit : **adénine ou guanine** (purine), soit **cytosine ou thymine** (pyrimidine)

- **ARN** (acide ribonucléique) composé de :

- un ose qui est le ribose

- la base est soit : **adénine ou guanine** (purine), soit **cytosine ou uracile** (pyrimidine)

Remarquons que l'ADN peut contenir des bases méthylées et que l'ARN contient de nombreuses différentes bases modifiées (voir le paragraphe des bases).

La différence entre les 2 oses a des conséquences très importantes entre ces deux polymères : la présence de l'hydroxyle en 2' du ribose interdit tout appariement pour former des duplex de chaînes.

3.1. La structure primaire des polymères

3.1.1. La taille des polymères nucléiques

La taille des acides nucléiques est exprimée en trois unités selon l'usage :

- la longueur
- la masse moléculaire en Dalton (Da)
- le nombre de nucléotides (ou bases), noté *b*, pour les molécules simple brin et le nombre de paires de base, noté *pb*, pour les molécules double brin.

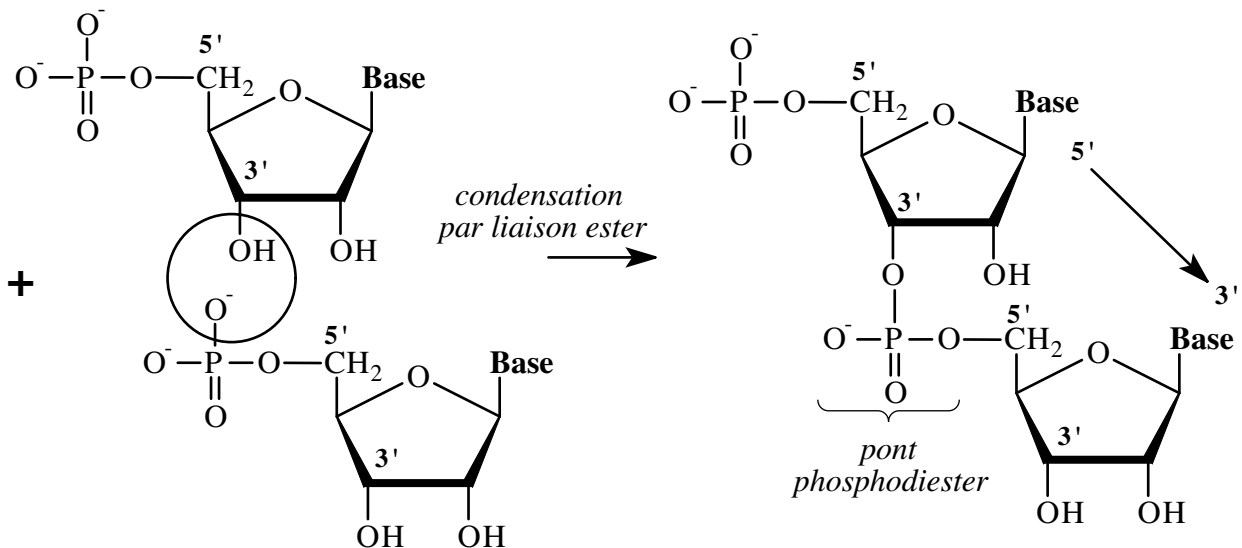
Pour les ARN, le nombre de nucléotides varie de plusieurs dizaines à plusieurs milliers :

- ARN ribosomique : de 100 à 5000 *b*
- ARN de transfert : de 75 à 90 *b*
- ARN messagers : fonction du gène transcrit

Pour les ADN, le nombre de nucléotides varie de 5000 à plus de 100 millions de *pb*.

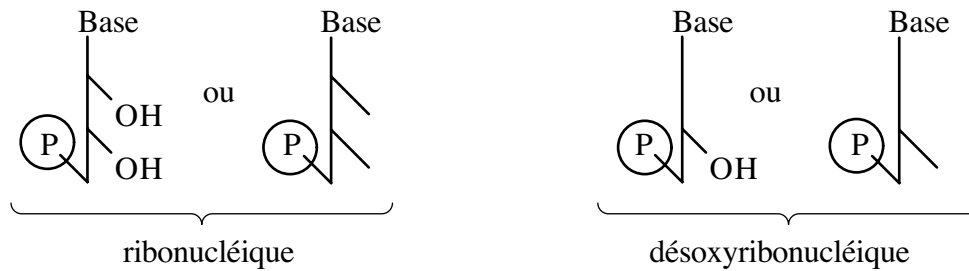
3.1.2. La liaison phosphodiester

Les acides nucléiques sont des enchaînements de nucléosides 5'-phosphate dont l'assemblage est réalisé par une liaison phosphodiester :

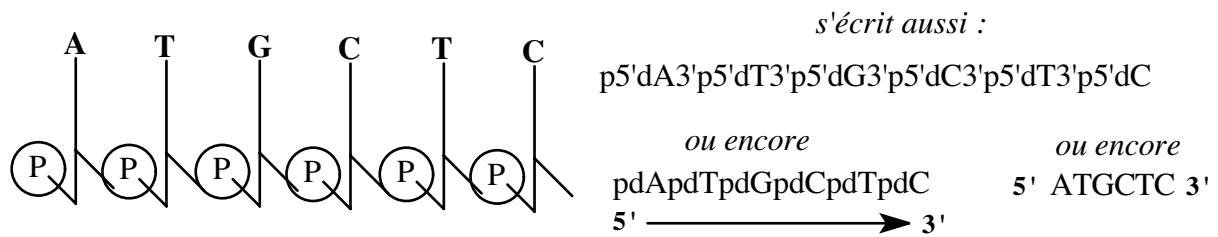


La chaîne est **vectorisée** : elle est écrite de gauche à droite et dans le sens, extrémité phosphate 5' → 3'. C'est le sens dans lequel les séquences d'acides nucléiques sont utilisées comme molécules informationnelles (transcription, traduction).

L'usage a consacré des représentations simplifiées d'un polymère à l'aide d'abréviations ou sigles suivants :



Exemple d'une polymère de type ADN :

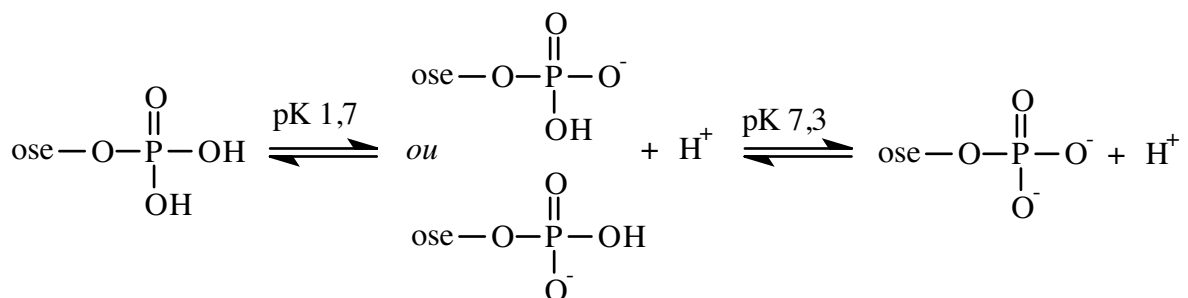


3.2. Les différents groupes ionisables des acides nucléiques

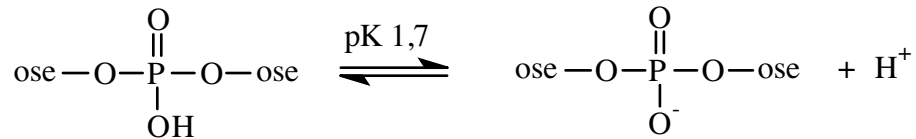
Les différents groupes ionisables des acides nucléiques sont de trois types et d'un type particulier correspondant aux formes tautomères de l'équilibre forme céto et forme énol (lactame et lactime). La nature de l'ose n'a aucun effet pour ces phénomènes d'ionisation.

3.2.1. Les groupes phosphates

- le groupe phosphomonoester possède deux fonctions acides dont les valeurs des pK sont respectivement 1,5 à 2 et 7,2 à 7,5.



- le groupe phosphodiester, participant aux ponts phosphodiester, possède une seule fonction acide de pK égal à 1,5 à 2



Chacun de ces groupes possède donc au pH physiologique (6,5) un seul groupement ionisé : l'acide nucléique portera un nombre de charges négatives (contribution des phosphates) égal au nombre de nucléotides.

3.2.2. Les azotes des cycles des bases pyrimidiques et puriques

Lorsque les bases puriques ou pyrimidiques sont liées à un ose (liaison N-osidique), la protonation d'un azote du cycle correspond au cas plus simple des bases de type pyrrole ou pyridine. Il faut noter que la conjugaison des liaisons du doublet libre de l'azote avec les doublets des électrons π aboutit à la règle simple suivante :

- la protonation d'un azote d'un cycle empêche la protonation des autres azotes.
- l'uracile et la thymine n'ont aucun azote protoné.

3.2.3. Les groupes amino liés aux cycles des bases

Les groupements amino liés au cycle peuvent être protonés et ce plus facilement qu'un azote du cycle. Le doublet de l'azote de ce groupement amino peut se conjuguer partiellement avec les électrons du cycle, empêchant la protonation des autres azotes.

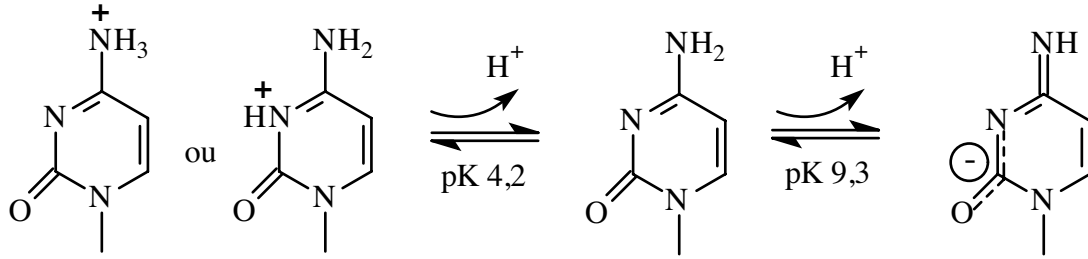
3.2.4. Les formes tautomères (lactame et lactime)

Nous avons vu (page 5) que la présence d'un groupement céto lié à un cycle entraînait l'existence de formes tautomères par le passage de la forme céto en forme énol. Cette dernière fonction peut libérer un proton à pH basique (acide faible de pK d'environ 9,2 à 9,5), entraînant l'apparition d'une charge négative.

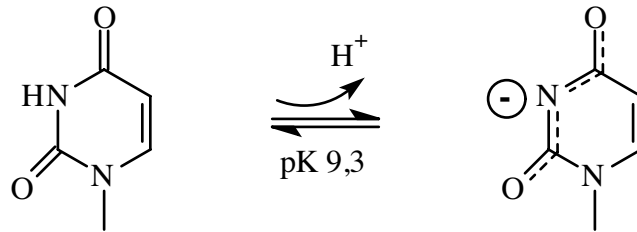
3.2.5. En guise de conclusion

Les bases puriques et pyrimidiques, liées à un ose (liaison N-osidique), portent des groupes ionisables qui peuvent libérer des protons :

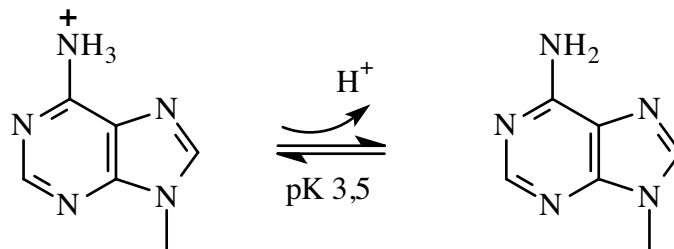
Cytosine



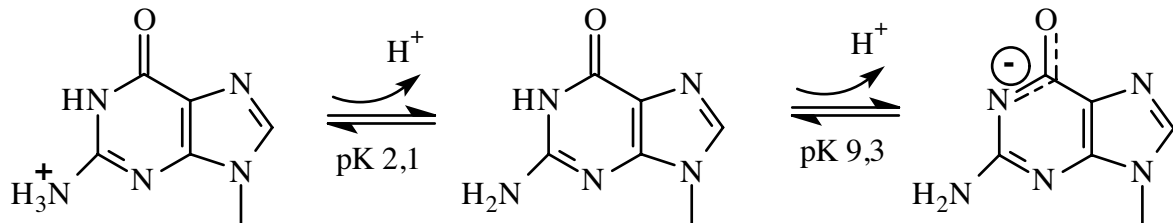
Uracile ou thymine



Adénine



Guanine



A un pH voisin du pH physiologique (6,5), les bases puriques ou pyrimidiques ne portent aucune charge.

Les acides nucléiques dans une solution dont le pH est voisin du pH physiologique sont des **polymères chargés négativement**, charges dont la contribution est uniquement due aux groupements phosphates.

3.3. L'hydrolyse des acides nucléiques

La dégradation d'un polynucléotide peut être chimique ou enzymatique, elle concerne :

- l'enchaînement phosphodiester
- les unités nucléotidiques : composants et liaison osidique

3.3.1. L'hydrolyse chimique

Le traitement acide affecte de la même façon les ADN et les ARN

- la dégradation du squelette phosphodiester est obtenue dans des conditions drastiques (acide concentré et chauffage) auxquelles ne résistent pas les autres liaisons, cette dégradation conduit à la libération d'un mélange de phosphates, oses et bases.
- dans des conditions douces (pH 4), seules les liaisons N-osidique avec les purines sont hydrolysées.

Les ARN et les ADN réagissent différemment à l'hydrolyse alcaline

- les ADN résistent aux pH basiques : par exemple, à pH 13 et à 37°C on a une dizaine de coupures de ponts phosphodiester par million de ponts
- les ARN sont totalement hydrolysés en leurs ribonucléotides en quelques minutes à 37°C et à pH 11. C'est la présence de l'hydroxyle libre en 2' qui permet cette hydrolyse qui donne un intermédiaire cyclique 2':3' P, aboutissant à des nucléotides 2' P ou 3' P.

3.3.2. L'hydrolyse enzymatique

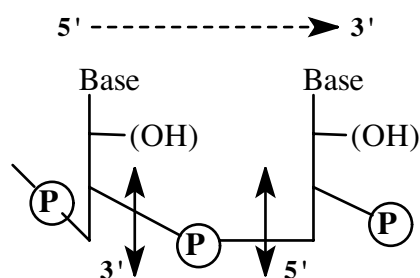
Les enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison phosphodiester des acides nucléiques, présents dans la plupart de toutes les cellules, sont des phosphodiesterases spécifiques appelées **nucléases**. Des endonucléases de très haute spécificité sont présentes dans les bactéries, ce sont des désoxyribonucléases désignées sous le nom **d'enzyme de restriction**.

Les nucléases

Elles présentent des niveaux de spécificité et sont classées par :

- leur mode d'attaque de la chaîne : extrémité (exo) ou intérieur (endo)
- leurs spécificité vis-à-vis du substrat : ADN, ARN ou les deux et de la structure, simple ou double brin

- leur spécificité de reconnaissance des sites : bases ou leur enchaînement
- le type de coupure de la liaison phosphodiester



Différents types de coupure d'un pont phosphodiester

Exemple de quelques nucléases avec leurs spécificités :

nucléases	substrats	type coupure	spécificité coupure
exonucléases			
phosphodiesterase de venin	ARN, ADN (s)	3'	extrémité 3'
phosphodiesterase de la rate	ARN, ADN (s)	5'	extrémité 5'
exonucléase I d' <i>E.Coli</i>	ADN (s)	3'	extrémité 3'
exonucléase III d' <i>E.Coli</i>	ADN (d)	3'	extrémité 3'
endonucléases			
endonucléase S1 d' <i>Aspergillus</i>	ARN, ADN (s, d)	3'	aléatoire
ARNase T1 d' <i>Aspergillus</i>	ARN (s)	5'	-G # N-
ARNase de pancréas	ARN (s)	5'	-Pyr # N-
ADNase II de thymus	ADN (s)	5'	-dPyr # dPur-

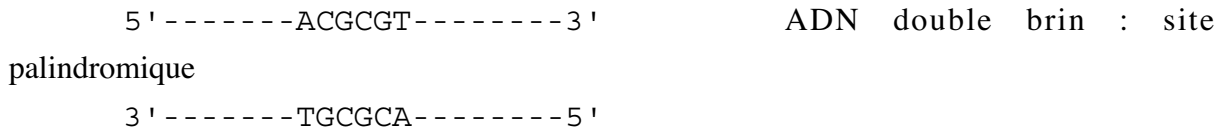
s : simple brin, d : double brin

N : représente n'importe lequel des nucléotides

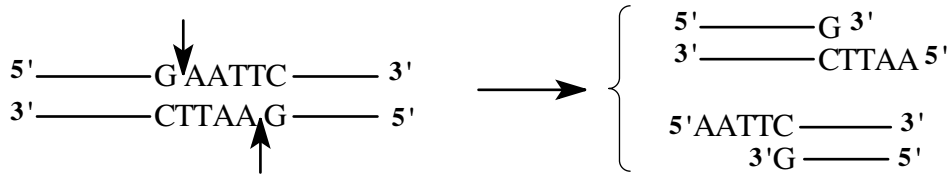
Les enzymes de restriction

Chaque espèce de bactéries produit une collection d'endo-désoxyribonucléases, dont le site est **spécifique d'une séquence de 4 à 10 nucléotides**, 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.

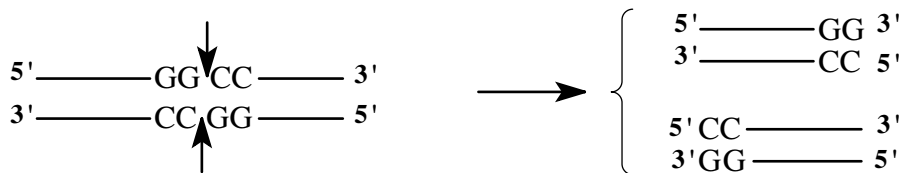
Ces désoxyribonucléases hydrolysent un pont phosphodiester de chacune des 2 chaînes d'acide désoxyribonucléique dont la structure est un double brin. L'ADN double brin est formé de deux chaînes complémentaires de sens opposé (voir plus loin). La plupart du temps la séquence nucléotidique reconnue (lue dans le même sens) est identique sur les deux brins, on dit que le site est **palindromique** :



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)

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

3.4. Structure spatiale des acides désoxyribonucléiques

3.4.1. Quelques résultats expérimentaux sur les acides désoxyribonucléiques

La composition en bases

Les molécules d'ADN présentent la caractéristique suivante :

- quelle que soit l'origine de l'ADN, le nombre de purines est toujours égal au nombre de pyrimidines : [Pur] = [Pyr] ou encore [A] + [G] = [T] + [C]

- de plus, les fractions molaires des bases sont telles que :

$$A = T \text{ et } G = C$$

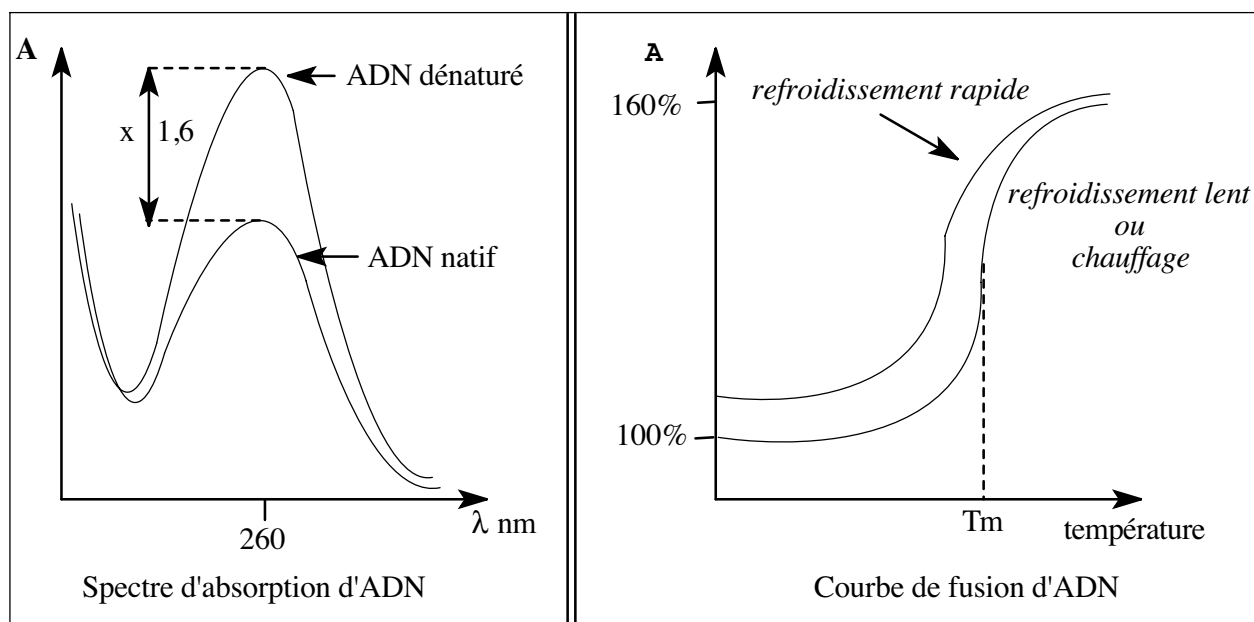
Cette caractéristique est désignée sous le nom de règle de Chargaff qu'il observa en 1940. Les bases A et T sont dites **complémentaires**, il en est de même pour G et C. Bien sûr les proportions ([A] + [T]) et ([G] + [C]) ne sont pas égales et varient de 35 à 75% selon l'ADN étudié.

Le titrage des groupes basiques

Si on titre les bases de l'ADN (charge moyenne de la molécule en fonction du pH) en présence d'un agent dénaturant, comme l'urée, le pK moyen obtenu est de l'ordre de 4,5.

Si on titre les bases de l'ADN dans des conditions non dénaturantes, on trouve un pK moyen augmenté d'une unité, environ 5,5

L'effet hyperchrome



- Le spectre d'absorption de l'ADN natif n'est pas identique à celui du même ADN dénaturé par la chaleur (chauffage à 100°C) ou par l'urée ou encore à pH très alcalin. L'ADN dénaturé a une absorption à 260 nm plus élevée que l'ADN natif, d'un facteur 1,6. Cette propriété est appelée **l'effet hyperchrome** ou **hyperchromicité**.

- L'absorption de l'ADN natif, à 260 nm, en fonction de la température (courbe de fusion), présente l'allure d'une sigmoïde : le point d'inflexion de cette courbe, qui correspond à la demi-variation d'absorbance, est la température de fusion de la molécule, notée T_m .

- Lors d'un refroidissement lent, l'absorption suit la courbe de fusion en sens inverse. Lors d'un refroidissement rapide, l'absorption ne suit pas la courbe de fusion en sens inverse mais une autre courbe qui n'aboutit à la même valeur originale de l'absorption, mais à une valeur plus élevée : c'est le phénomène d'**hystérésis**.

- Il faut noter que la température de fusion T_m est dépendante de la force ionique du milieu et qu'elle diminue lorsque cette dernière augmente (dans des milieux où $[NaCl] > 1M$).

- La valeur de la température de fusion T_m est d'autant plus élevée que le pourcentage de bases G + C est grand :

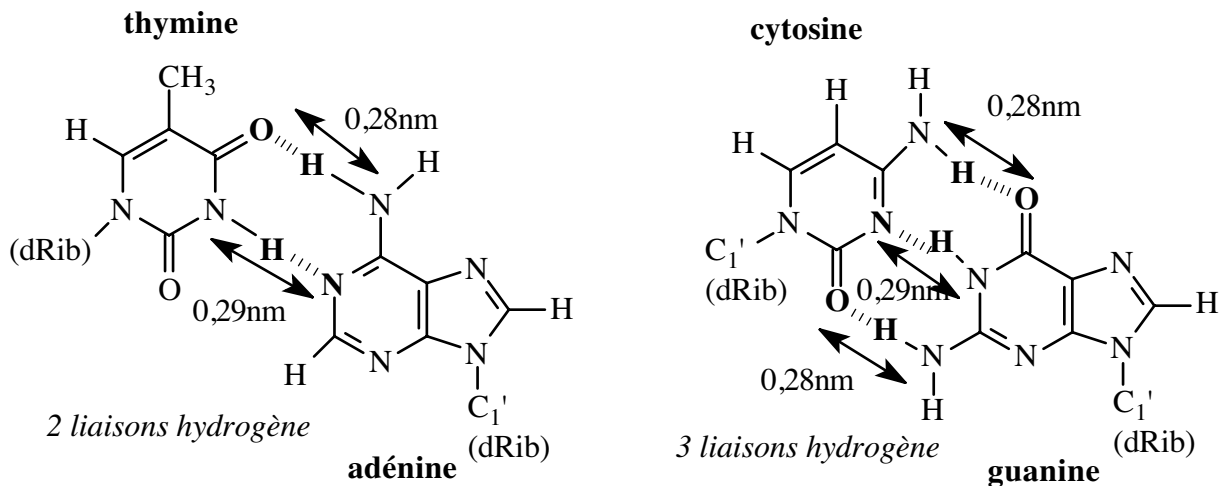
- 65 °C pour l'ADN de *E. Coli* où G+C est égal à 50%,

- 76 °C pour l'ADN de *P. aeruginosa* où G+C est égal à 68%

La structure révélée par la diffraction aux rayons X

L'analyse aux rayons X de cristaux de molécules d'ADN, réalisée en 1953 par Watson et Crick, indique une structure ayant la configuration suivante :

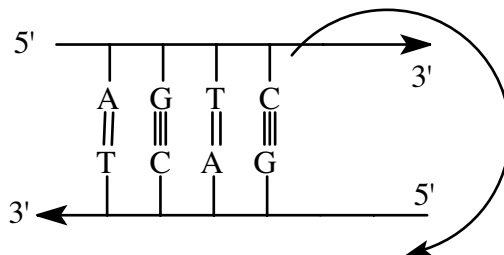
- une double hélice formée de deux chaînes d'ADN dont les paires de bases sont complémentaires
- les deux chaînes sont antiparallèles
- les enchaînements oses-phosphates forment les squelettes hélicoïdaux parallèles extérieurs, les plans des oses étant presque perpendiculaires au plan des bases
- les plans des bases sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice et chacune des bases d'une chaîne est appariée à celle de l'autre chaîne par des liaisons hydrogène, les deux bases étant situées dans un même plan
- les bases appariées sont complémentaires (A / T) et (G / C) et sont à l'intérieur du cylindre central de l'hélice.



Appariements pyrimidines-purines selon Watson et Crick

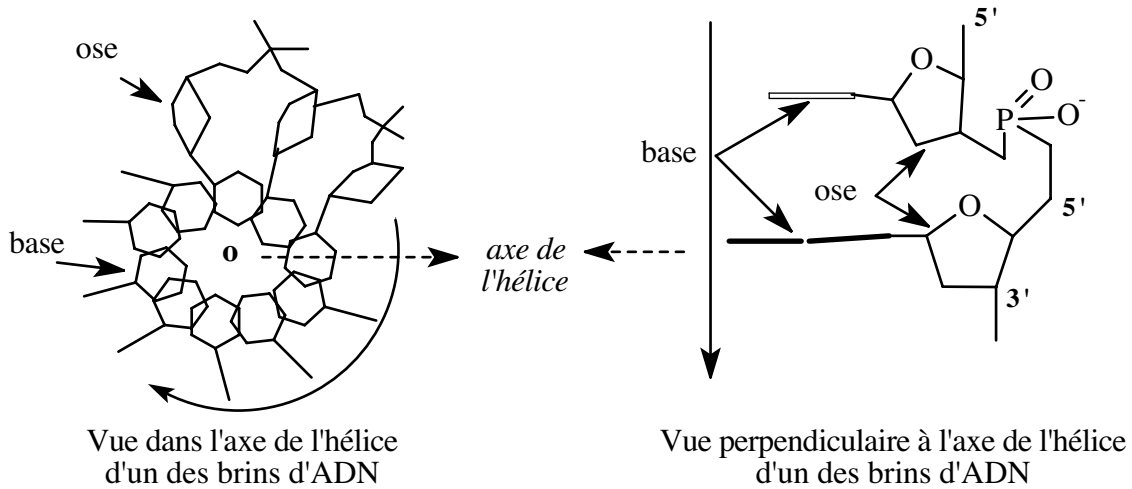
3.4.2. Les doubles hélices

Une double hélice est formée de deux chaînes antiparallèles d'ADN qui s'enroulent soit à droite (sens du tire bouchon ou sens des aiguilles d'une montre) soit à gauche.

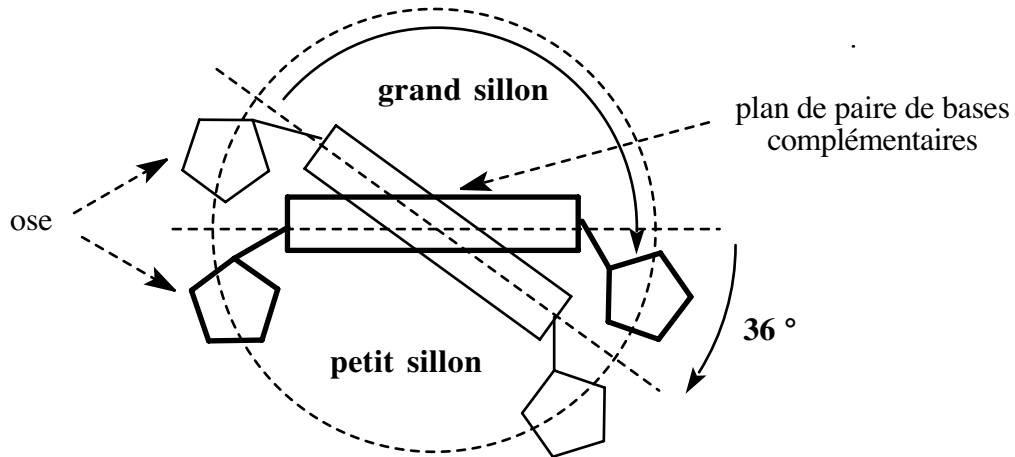


Cette double hélice est caractérisée par :

- son axe principal,
- le sens d'enroulement,
- le pas.



Du fait de la position de l'axe au centre de chaque paire de base complémentaire et de leur attachement dissymétrique sur le squelette ose-phosphate, deux sillons d'ouverture et de profondeurs différentes vont alterner sur les flancs de la double hélice :



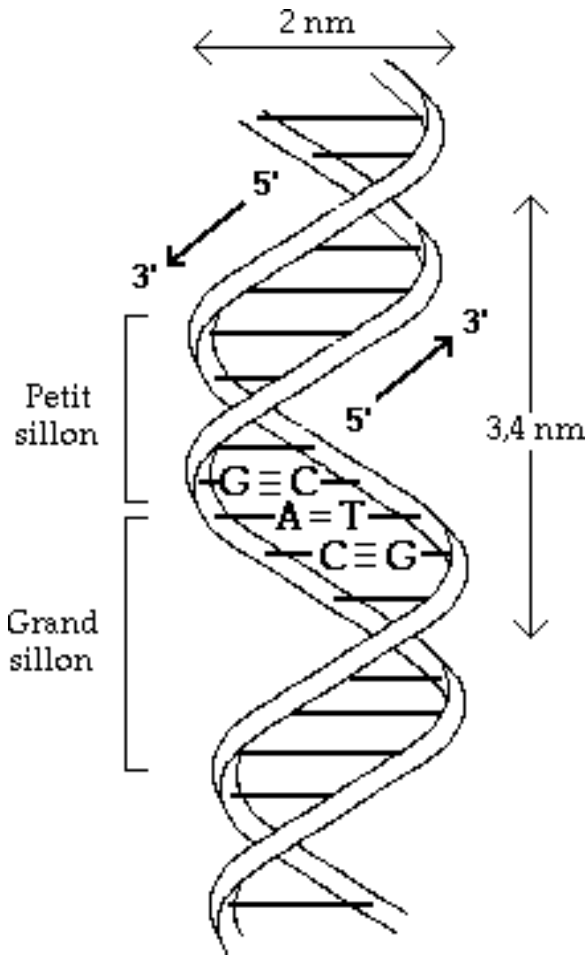
Vue dans l'axe de la double hélice : représentation d'un enchaînement

La stabilité de la structure secondaire de ces différentes double hélices d'ADN est essentiellement due aux :

- liaisons hydrogène entre les bases complémentaires de chacun des brins
- interactions hydrophobes et électrostatiques des bases successives empilées dans la structure de l'hélice, dont la distance des plans varie de 0,26 à 0,37 nm.

Cette stabilité n'entraîne pas une rigidité de la molécule d'ADN et celle-ci peut adopter des conformations différentes selon les régions.

Plusieurs conformations correspondant à des sens d'enroulement différents ou des pas différents ont été trouvées, les principales étant :



Modèle de Watson et Crick

Conformation B :

c'est le modèle de Watson et Crick, le plus stable dans les conditions physiologiques.

- enroulement droit
- pas : 3,4 nm
- 10 pb par tour
- rotation du plan des bases : 36°

Conformation A :

- enroulement droit
- pas : 2,8 nm
- 11 pb par tour
- rotation du plan des bases : 33°

Conformation Z :

- enroulement gauche
- pas : 4,5 nm
- 12 pb par tour
- rotation du plan des bases : -30°

La stabilité de la structure secondaire de ces différentes double hélices d'ADN est essentiellement due aux :

- liaisons hydrogène entre les bases complémentaires de chacun des brins
- interactions hydrophobes et électrostatiques des bases successives empilées dans la structure de l'hélice, dont la distance des plans varie de 0,26 à 0,37 nm.

Cette stabilité n'entraîne pas un rigidité de la molécule d'ADN et celle-ci peut adopter des conformations différentes pour différentes régions.

Conformation B

C'est celle du modèle décrit par Watson et Crick et que l'on trouve comme la forme principale native dans les conditions physiologiques.

C'est une hélice droite de pas égal à 3,4 nm (10 pb par tour).

- L'inclinaison des bases par rapport à leur axe de rotation perpendiculaire à l'axe principal de l'hélice est de 1°.

- La distance entre deux plans de bases successifs est de 0,34 nm.

Conformation A

Lorsque la teneur en eau d'une solution contenant une molécule d'ADN est diminuée, par exemple lors de la cristallisation, la molécule change de conformation et adopte une conformation notée A. Ce changement est réversible.

La conformation A a les spécificités suivantes :

- hélice droite (idem conformation B)

- hélice plus compacte

- pas de 2,8 nm (11 pb par tour)

- distance entre les plans de bases successives de 0,26 nm

- les plans des bases sont tournés de 180° par rapport à la conformation B

- l'inclinaison des bases par rapport à leur axe de rotation perpendiculaire à l'axe principal de l'hélice est de 20°.

Cette conformation est trouvée *in vivo* dans :

- l'ADN de certaines spores bactériennes, formées en réponse à la dessiccation du milieu

- les hybrides ADN-ARN qui se forment transitoirement à l'amorce de la réplication, et pendant la transcription.

Conformation Z

Cette conformation est présente dans des régions courtes de l'ADN dans une conformation générale de type B (native). Ces régions spécifiques sont en général des segments de séquence alternée Pur/Pyr (G-C-G-C).

La conformation Z a les spécificités suivantes :

- **hélice gauche**

- pas de 4,5 nm (12 pb par tour) : la molécule est plus étirée dans cette conformation

- distance entre les plans de bases successives de 0,37 nm

- l'inclinaison des bases par rapport à leur axe de rotation perpendiculaire à l'axe principal de l'hélice est de 9°.

Cette conformation est trouvée *in vivo* pour des segments de la molécule d'ADN, avec des enchaînements alternés Pur/Pyr dont les bases sont souvent méthylées. Celle-ci aurait un rôle dans l'expression des gènes.

Ces différentes conformations décrivent la structure secondaire des molécules d'ADN double brin. Ces conformations sont très stables, mais possèdent une flexibilité assez grande qui peut définir des structures tertiaires (structure dans l'espace d'une double hélice) différentes :

celles-ci vous seront décrites dans des cours ultérieurs et vous verrez, par exemple, les phénomènes de surenroulement.

3.4.3. Retour sur les quelques résultats expérimentaux sur l'ADN natif

La structure en double hélice, les liaisons hydrogène entre les bases complémentaires et les interactions hydrophobes entre bases successives peuvent éclairer les observations du paragraphe 3.4.1 (Quelques résultats expérimentaux sur les acides désoxyribonucléiques) :

- composition en bases : évident
- titrage : l'engagement de l'hydrogène d'un azote dans une liaison hydrogène avec la base complémentaire fait apparaître un doublet électronique sur cet hydrogène qui par délocalisation renforcera la liaison avec un hydrogène supplémentaire. L'ion H^+ sera plus difficilement libéré et le pKa de ce groupe augmentera.
- effet hyperchrome : l'arrangement spatial des bases successives dans la double hélice d'un brin d'ADN, empilement des plans avec une distance pouvant varier de 0,24 à 0,37nm, permet des interactions hydrophobes entre bases successives (contact de Van der Waals) qui ont des répercussions sur le nuage électronique des cycles et donc sur leurs propriétés spectrales. Ce phénomène diminue l'absorption des bases dans l'ultraviolet : effet hyperchrome. Cet effet peut être enlevé en dénaturant la molécule : destruction de la double hélice qui supprime les interactions entre bases qui retrouvent leurs propriétés spectrales originales. La dénaturation, qui libère chacun des deux brins d'ADN, est obtenue par destruction des liaisons hydrogènes soit :
 - par addition d'urée en concentration $> 6M$
 - par augmentation de la température
- phénomène d'hystérésis : après dénaturation par chauffage, les deux brins d'ADN sont libres. Un refroidissement lent permet un réappariement des deux brins d'ADN qui aboutit à la double hélice originale. Un refroidissement rapide ne permet pas un réappariement total des deux brins, seules certaines régions complémentaires des deux brins reforment des doubles hélices partielles. L'absorption de la molécule aura une valeur intermédiaire entre celle de la molécule native et de la molécule dénaturée : phénomène d'hystérésis.
- température de fusion : la température de fusion de molécule d'ADN en double hélice est dépendante de la composition du pourcentage de bases G + C. Elle est d'autant plus élevée que celui-ci est élevé : ceci peut s'expliquer par le fait que les appariements de ces bases fait intervenir trois liaisons hydrogène alors que les appariements A-T en font intervenir seulement deux. Une présence importante d'ions dans la solution (force ionique élevée : NaCl 1M) perturbera les liaisons hydrogène et provoquera une diminution de la température de fusion.

3.4.4. Quelques exemples de molécules d'ADN

Les molécules d'ADN des organismes vivants sont toutes des molécules double brin à de rares exceptions près, comme par exemple l'ADN du phage ϕ X174.

Taille de génome en nombre de bases

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	

Les molécules d'ADN peuvent être circulaires par formation de liaison ester 3'-5' de ses extrémités : certains virus ou bactéries, etc.. L'ADN des organites (chloroplastes ou mitochondries) sont circulaires à l'exception de génomes mitochondriaux de quelques algues et protozoaires.

3.4.5. Des propriétés physico-chimiques souvent utilisées

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
- la densité des molécules d'ADN est telle qu'on peut les séparer par ultracentrifugation dans des gradients de densité (chlorure de césium)
- la charge de ces molécules à pH physiologique est négative et directement proportionnelle à leur longueur (nb de nucléotides). Cette propriété est utilisée pour les séparer par électrophorèse.
- clonage et séquençage (structure primaire) de l'ADN qui exploitent la complémentarité des bases

3.4.6. Pour la suite

Dans ce module, nous nous sommes intéressés uniquement aux propriétés essentiellement physico-chimiques de l'ADN. Dans des cours ultérieurs, seront développées les propriétés biologiques de ces molécules :

- molécule support d'information : code génétique, régions spécifiques de régulation, recombinaison génétique
- interactions ADN-protéines et régulation de l'expression génique

3.5. Structure spatiale des acides ribonucléiques

L'ARN à deux brins appariés est l'exception de quelques rares virus. Les différents types d'ARN sont des molécules formées d'un seul brin et quelquefois des molécules faisant partie d'hybrides ARN-ADN.

Les principaux types de molécules d'ARN présentes dans les cellules d'organismes vivants sont :

- les **ARN génomiques** : virus (poliovirus, virus de la grippe, etc..), rétrovirus (oncogènes, sida, herpès, etc..)
- les **ARN ribosomiques** (ARNr) [80% ARN totaux] : les ribosomes sont des complexes nucléo-protéique contenant 3 types d'ARNr, qui sont le siège de la biosynthèse des protéines (traduction)
- les **ARN de transfert** (ARNt) [15% ARN totaux] : interviennent dans l'élongation de la chaîne polypeptidique, lors de la traduction
- les **ARN messagers** (ARNm) [5% ARN totaux] : support de l'information transcrite à partir de l'ADN, qui interviennent dans la traduction
- les **ARN hétérogènes nucléaires** (ARNhn) [< 2% ARN totaux] : sont les précurseurs des ARNm
- et les **petits ARN stables** [< 2% ARN totaux], soit cytosoliques (ARNsc), soit nucléaires (ARNsn) qui existent sous forme de ribonucléoprotéines appelées snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*).

L'usage a consacré de caractériser les ARNr, ARNt par leurs propriétés de sédimentation qui sont liées à leur masse volumique, y compris l'eau d'hydratation, et on parle par exemple d'ARN 23S où est le Svedberg ($1 S = 10^{-13}$ seconde).

Type d'ARN	Nb nucléotides	coeff sédimentation
ARNm	variable	
ARNr	120 - 5000	(5S, 16S, 23S)* (5,8S, 18S, 28S)**
ARNt	75 - 90	4S
ARNhn	variable	
ARNsc	90 - 330	
ARNsn	58 - 220	

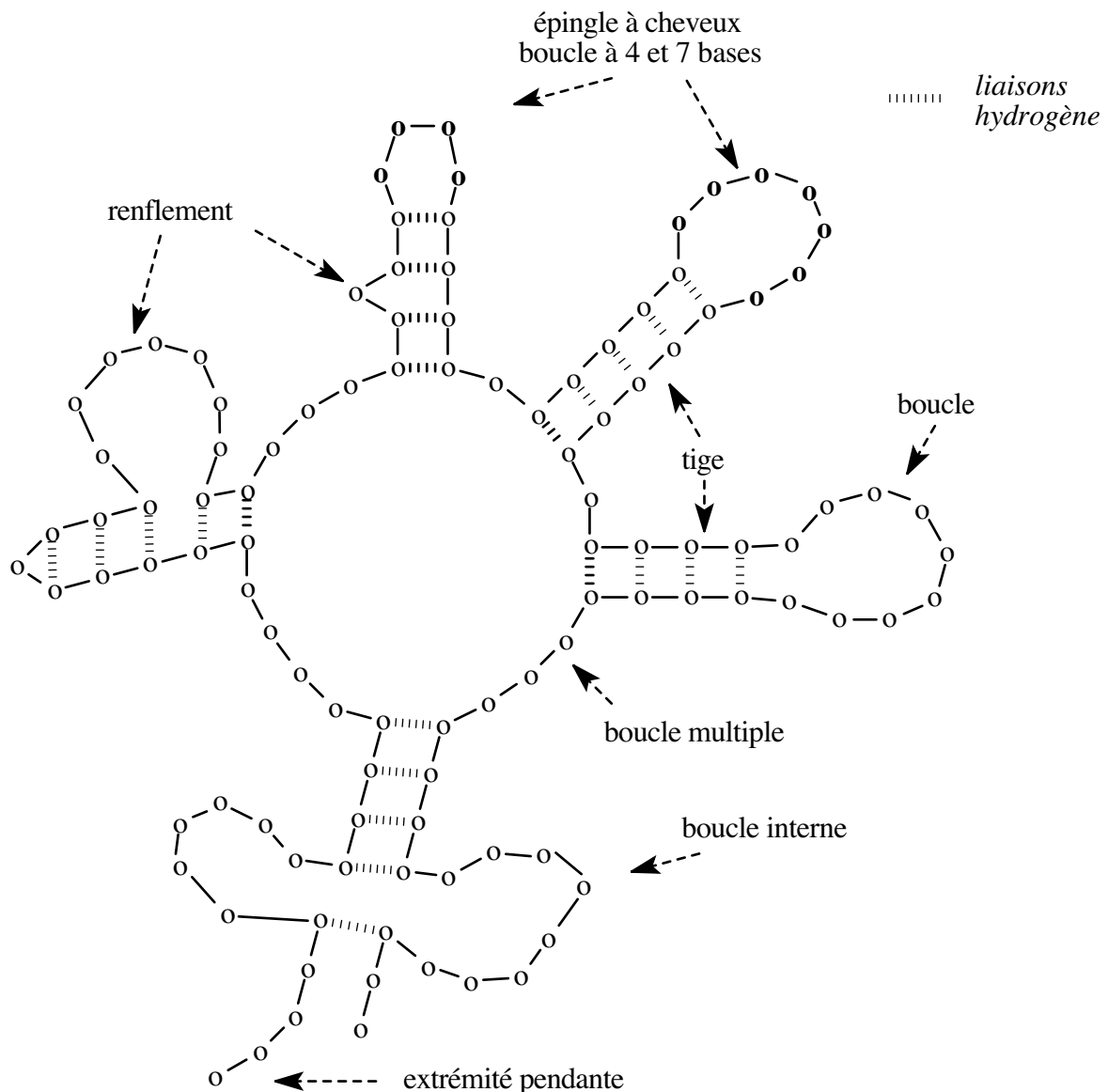
* : procaryotes - ** : eucaryotes

3.5.1. Les hélices d'ARN

Sous l'action des forces d'empilement (interaction de Van der Waals) entre bases successives, le squelette d'une molécule d'ARN tend à former spontanément une hélice simple droite irrégulière.

Les conformations stabilisantes sont des régions en double hélice que l'on trouve, en dehors de deux brins d'ARN ou hydrides ARN-ADN, dans des régions où **deux segments distants du même brin d'ARN présentent une complémentarité suffisante** pour un nombre d'appariements supérieur ou égal à 3 (appariement A/U par deux liaisons hydrogène et G/C par trois liaisons hydrogène). Ce type de conformation implique des structures secondaires de type épingle à cheveux.

3.5.2. Les motifs élémentaires de structure secondaire d'ARN



Ces différents motifs de structure secondaire ont été trouvés dans les ARN ribosomiques et les ARN de transfert :

- les tiges sont des hélices dont la conformation est proche de celle de la conformation A de l'ADN : les hydroxyles en 2' des riboses s'opposent à un enroulement de type B.

- les boucles : celles participant à un motif d'épingle à cheveux stabilisent cette structure, en particulier les tétraboucles de séquence UNCG (N représentant l'une des quatre bases).

3.5.3. Pour la suite

Dans des cours ultérieurs, seront développées les propriétés biologiques et les structures des molécules d'ARN :

- molécule support d'information : transcription de l'ADN en ARN et traduction des ARN messagers
- interactions ARN-protéines : biosynthèse des protéines avec en particulier la structure des ARN ribosomiques et des ARN de transfert (feuille de trèfle).