

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique

Université Mohamed Boudiaf - M'Sila



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة محمد بوضياف بالمسيلة

Cours de Génétique Moléculaire

Destiné aux étudiants de 2^e année Master Biodiversité et Physiologie végétale

2020-2021

Life begins with cells and cell begins with the secret of life:

"DNA"

☆

DNA begins with four nucleotides and nucleotide begins with five atoms:

"H, C, O, N, P"

☆

Atoms begins with electrons, protons, neutrons and other substructures

☆

So, Try to understand Life

Première partie:

Biologie Moléculaire

Chapitre I

Support de l'information génétique

Objectifs

- Expériences ayant conduit à la découverte de l'ADN comme matériel génétique.
- Composition chimique de l'ADN.
- Structure de l'ADN.
- Caractérisation et analyses de l'ADN.

1-Introduction

La variété des organismes vivants est extraordinaire, on estime qu'il ya de nos jours plus de 10 millions d'espèces. Chaque espèce est différente des autres. Cette différence est due au contenu en information génétique de chaque espèce. Les généticiens ont envisagé que des molécules spécifiques étaient porteuses de cette information génétique. Les êtres vivants sont subdivisés en deux groupes: les eucaryotes et les procaryotes, se différencient par la présence ou non d'un noyau.

2-ADN comme matériel génétique

En 1869: Fredrich Micher utilisa une protéase (pepsine: découverte en 1836) pour séparer le noyau du cytoplasme. Il a observé une petite tache de poudre grise qui s'était détachée d'un liquide claire jaunâtre (cytoplasme). Il l'appela nucléine.

En 1889: Le biologiste Altman a précisé que la nucléine c'est un acide nucléique.

En 1928 : L'expérience de Griffith a montrée que la souche S tuée ne tue pas la souris, mais lorsqu'elle est mélangée avec la souche R vivante, la souris injectée meurt (fig. 1). Comme conclusion la souche R est transformée en souche S, et le facteur transformant est l'ADN.

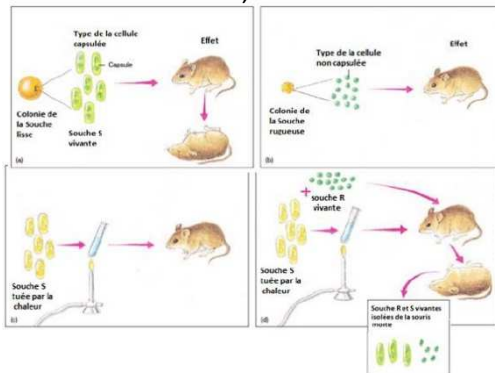


Fig.1: Expérience de F. Griffith en 1928 (Prescott , 2002).

En 1931: J. Hammerling, il travaille sur l'*Acetabularia* qui est une algue unicellulaire, verte ayant l'aspect d'une petite ombrelle (tige + chapeau). Il existe plusieurs formes selon le type d'algues.

- Il a mis les noyaux d'une souche de type A dans une souche de type B (différent chapeaux) dont les chapeaux furent coupés.

- Il a observé que des chapeaux de type A se développent sur le type B.

Les travaux de Hammerling ont démontré pour la première fois dans l'histoire que le noyau est le seul responsable de la production des êtres vivants (eucaryotes).

En 1944: Avery O.T., Macleod C. M. et Mc Carty M. (Rockefeller institute - New York) ont repris les expériences effectués en 1928 par Fred Griffith en utilisant les extraits de différentes biomolécules de la cellule S traités ou non par des enzymes spécifiques. Les résultats obtenus montrent qu'il ya transformation d'un nombre de souches R en souche S lorsque l'ADN purifié est utilisé (selon la fréquence de transformation). Les mêmes résultats ont été obtenus en dégradant les protéines et les ARN par des enzymes spécifiques. En conclusion, l'ADN est le facteur transformant et le support de l'information génétique

En 1952: Expérience de Hershey et Chase. L'utilisation de l'ADN et des protéines phagiques marqués, montre que seulement l'ADN qui est injecté dans les cellules bactériennes, entraînant la production des phages. C'est donc l'ADN qui est porteur de l'information génétique du virus. —

En 1946: Lederberg et Tatum ont recombinaison génétiquement des bactéries de souches auxotrophes incapables de pousser sur un milieu dépourvu de facteurs de croissance).

En 1950: Chargaff a fait l'équivalence en bases dans l'ADN des animaux, végétaux, bactéries et phages. En conclusion il a trouvé que :

- Le rapport $A + G / T + C \approx 1$ (purines / pyrimidines ≈ 1) chez tous les organismes testés.
- Le rapport AT / GC est variable selon les espèces.

En 1952-1953: - Franklin a obtenu une excellente photographie d'ADN par diffraction des rayons X.

- La même année Watson et Crick utilisant les données de Chargaff et l'image obtenue par Franklin ont établi le modèle de la double hélice (la forme B).

3-Composition chimique de l'ADN

Les travaux de Kornberg révélèrent que les précurseurs de l'ADN étaient des nucléotides riches en énergie (dNTP, dCTP, dTTP, dGTP). Chaque nucléotide est composé d'acide phosphoriques (3), base azotée (A, T, C, G) et un pentose(2'-désoxy- β -D-Ribose). La liaison formée entre deux phosphates donne un anhydride avec une liaison très riche en énergie, et la liaison entre le groupement acide du phosphate et l'hydroxyle du sucre donne une liaison ester. La liaison formée entre le sucre et la base est une liaison osidique de type β -N-glycosidique (fig. 2, 3 et 4).



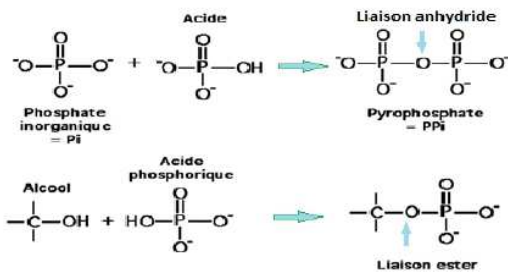
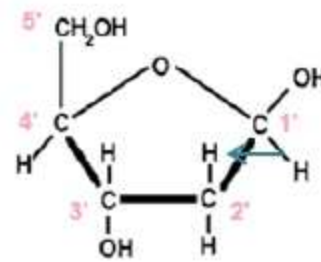
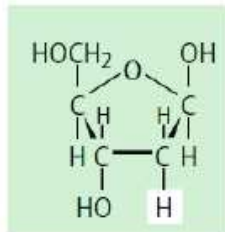
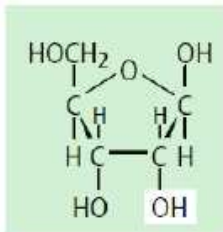


Fig.2: Formes du phosphate et les liaisons formées.

AB



β -D-Ribose β -D-Désoxyribose

2'-désoxy- β -D-Ribose

Fig.3:A- Les pentoses qui rentrent dans la composition des acides nucléiques (ADN,ARN).B-Numérotation d'un sucre, le prime (') est ajouté dans la numérotation pour la distinguer à celle des bases.

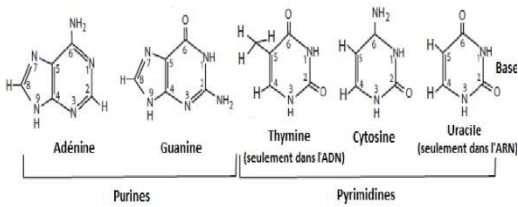


Fig.4:Les cinq bases azotées de l'ADN et l'ARN (Purines [A et G], Pyrimidines [C, T et U])

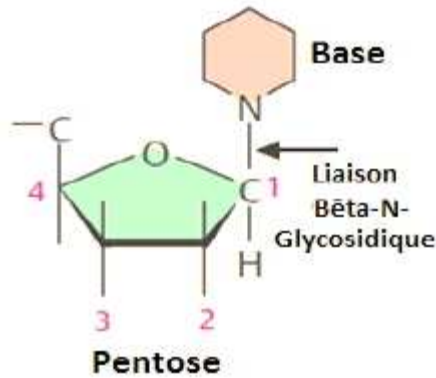
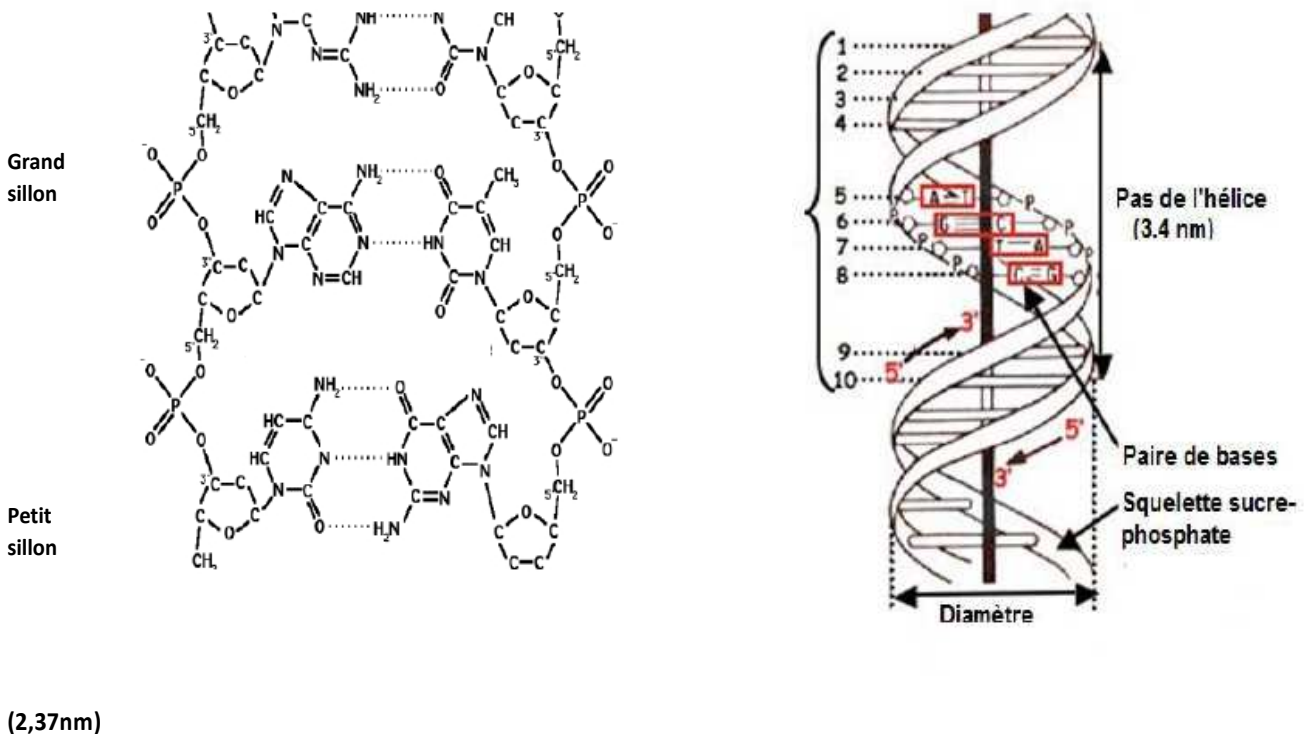


Fig.5 : Nucléoside. Le sucre se lie à la base azotée par une liaison impliquant un des azotes (l'azote n°1 des pyrimidines ou azote n°9 des purines) et le carbone 1' de l'ose (carbone réducteur ou fonction semi-acétalique). C'est une liaison N-osidique.

4-Structure de l'ADN

Les acides désoxyribonucléiques sont de très grandes molécules composées de deux chaînes polynucléotidiques enroulées l'une autour de l'autre pour former une double hélice régulière (La forme B a un diamètre de 2,47 nm) (fig. 6).



(2,37nm)

Fig.6: Structure détaillée de la double hélice de l'ADN (forme B). Un tour d'hélice recouvre environ 10.5 pb (34 Å). Le squelette de chaque brin est formé de sucre et de phosphate. Les bases azotées sont projetées vers l'intérieur de la molécule mais restent accessibles au solvant par les deux sillons (petit et grand sillon).

5-Interactions entre C-G et A-T

Deux types de paires de bases, souvent appelées paires de bases complémentaires prédominants dans la plupart des ADN A-T et C-G. Le paire de base A-T est associé par deux liaisons hydrogène et le G-C par trois.

5-1-Liaison hydrogène

Les liaisons hydrogène entre les bases complémentaires sont l'une des caractéristiques fondamentales de la double hélice, car elles assurent la stabilité thermodynamique de l'hélice et la spécificité de l'appariement. Une liaison hydrogène est formée entre un atome ou groupement donneur d'hydrogène chargé positivement et un autre accepteur chargé négativement (fig.7). Dans l'ADN, les liaisons hydrogène stabilisent les paires de base de la double hélice. La complémentarité entre les bases repose sur des raisons stériques.

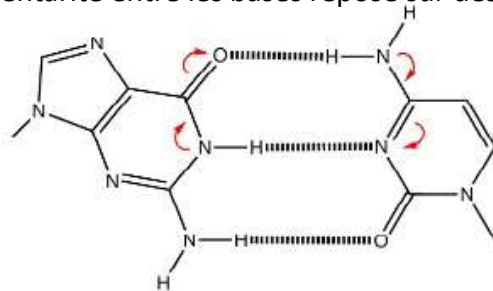


Fig.7: Mise en évidence des groupements impliqués dans les liaisons H

L'appariement de base entre deux purines, deux pyrimidines ou des bases non complémentaires A-C ou G-T est défavorisé, parce que les liaisons hydrogènes appropriées ne peuvent se former sous peine de rompre la géométrie de l'hélice. Une conséquence de cette règle d'appariement des bases est que la séquence d'un brin définit la séquence des bases de l'autre brin.

5-2-Stabilisation de la double hélice de l'ADN

La stabilisation de la double hélice s'effectue par des liaisons chimiques faibles et non covalentes à la fois internes et externes:

- 1- Liaisons hydrogène entre les bases.
- 2- Interactions hydrophobes et électroniques entre les bases
- 3- Interactions des groupements sucre et phosphate avec le milieu aqueux (interactions hydrophiles).

6-Formes de l'ADN

Dans l'espace les deux chaînes présentent une configuration hélicoïdale. Elles s'enroulent autour d'un axe imaginaire pour constituer une double hélice à rotation droite (Ex. Forme A et B) ou bien à rotation gauche (Ex. Forme Z). Il existe plusieurs structures hélicoïdale de l'ADN jusqu'à maintenant présent, six formes ont été décrites (A → E et Z), mais la plupart d'entre elles ont été trouvées dans des conditions expérimentales contrôlées.



Forme B

La forme B de l'ADN est la forme biologique la plus importante, elle correspond à la forme décrite par Watson et Crick en 1953. Cette forme est caractérisée par un pas (tour) d'hélice de 10.5 pb (34 Å) et un diamètre de 2,37nm (fig. 8). La forme B de l'ADN est caractérisée aussi par la présence de deux sillons, le petit sillon et le grand sillon (fig. 9).

Pas d'hélice
de 10.5 pb
(34 Å)

2,37nm

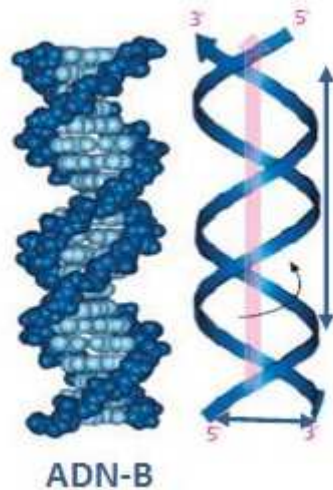
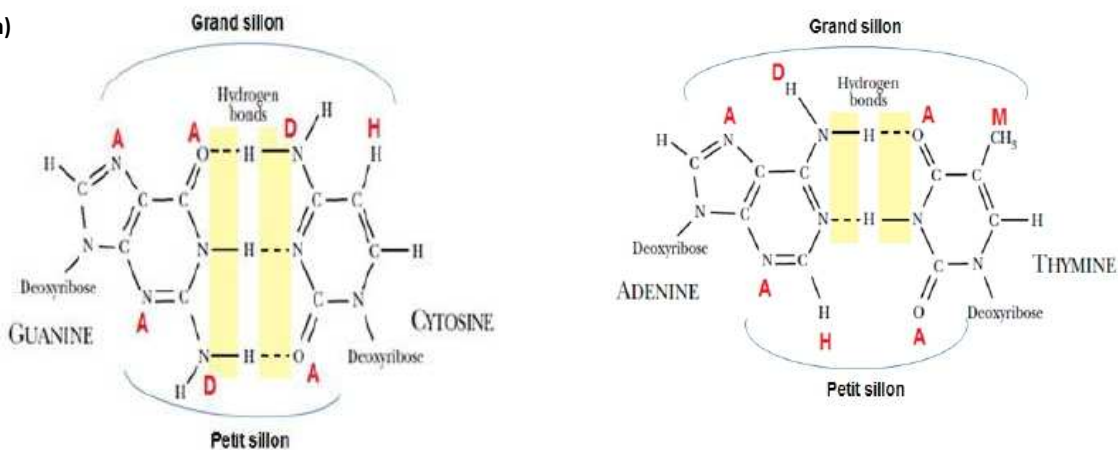


Fig.8: ADN forme B. Toutes les bases ont la même conformation par rapport à l'ose et sont à l'intérieur de l'hélice. Les groupements phosphate et les désoxyriboses sont à l'extérieur (Passarge, 2007).

(1.2nm)



(0.6 nm)

Fig.9: Les groupements chimiques des bases exposés au solvant (projetés vers l'extérieur) dans la double hélice. A: atomes accepteurs d'hydrogène, D: atomes donneurs d'hydrogène, H: hydrogène non polaire, M: groupements méthyles.

Les protéines font des liaisons avec l'ADN au fond des sillons (le grand, le petit ou les deux), ces liaisons sont spécifiques (liaisons hydrogène) ou non spécifiques (interactions de Vander Waals, et interactions électrostatiques générales).

Les différentes formes de l'ADN se distinguent par:

- 1- Nombre de paires de bases dans chaque tour d'hélice.
- 2- Pas de l'hélice (longueur)

- 3- Diamètre hélicoïdal de la molécule
- 4- Sens de la double hélice (droit, gauche).

Forme Z

Forme une double hélice à rotation gauche (fig. 10); nombre de paires de bases par tour d'hélice est de 12, le pas d'hélice est de 4.56 nm, et un diamètre de 1.8 nm. Cette forme présente les caractéristiques suivantes:

- Le squelette présente une conformation en zigzag favorisée par un taux de GC élevé (moins lisse que l'ADN-B).
- Il ya un seul sillon, qui ressemble au petit sillon de l'ADN-B
- Les phosphates sont plus proches les uns des autres que dans l'ADN-B.
- L'ADN-Z ne peut pas former de nucléosomes.
- La transformation de l'ADN-B en ADN-Z se fait lors de la transcription des gènes (au site d'initiation de la transcription).

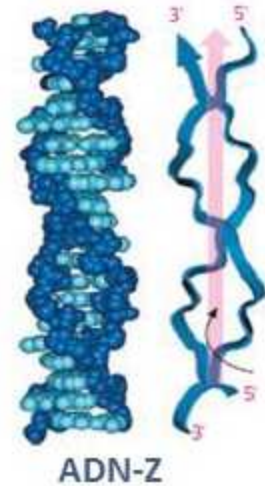


Fig. 10: Forme Z de DNA
(Passarge, 2007)

7- Propriétés physico-chimiques de l'ADN

Les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes qui maintiennent la structure en double hélice sont des forces faibles et des quantités relativement petites d'énergie peuvent séparer les deux brins, un processus appelé dénaturation.

7-1- Température de fusion

Si une solution d'ADN est chauffée, à une certaine température, les liaisons hydrogène qui assurent la cohésion des 2 brins appariés se rompent. On parle de fusion de l'ADN caractérisée par la température de fusion (T_m : melting temperature) (fig. 11).

La dénaturation et la renaturation des brins d'ADN en solution sont des reconstitutions critiques pour diverses fonctions biologiques normales (réplication; transcription ...etc.).

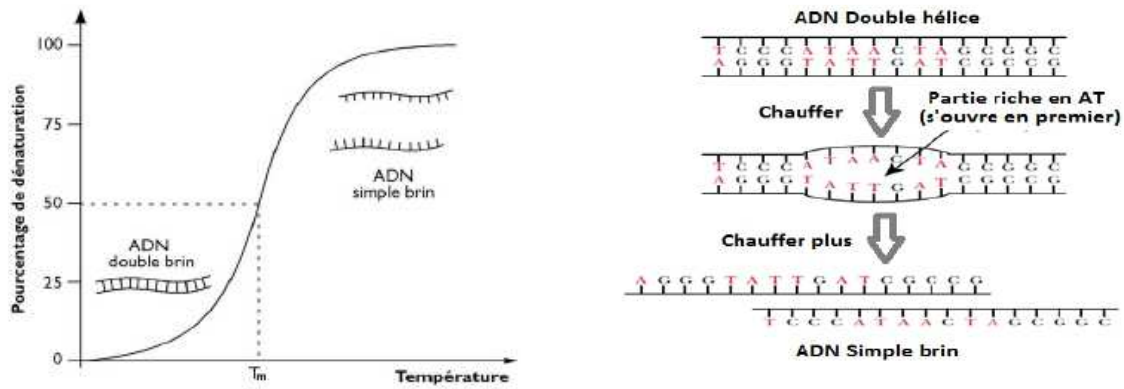


Fig.11: La séparation des brins d'ADN en fonction de la température. T_m est la température pour parvenir à 50% de séparation des deux brins. Il ya une augmentation de l'absorption à 260 nm. Les régions riches en A et T s'ouvrent plus rapidement à celles riches en C et G (Clark, 2005).

7-2- Facteurs influençant la T_m

La température de fusion est influencée par plusieurs facteurs :

- C + G % : la T_m augmente avec l'augmentation du% CG (fig.11). Pour les petites séquences comme les amorces (17 à 31) $T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$
- Les cations (mono ou divalent).
- Les polyamines.
- Les protéines.

7-3- Absorption de la lumière ultraviolette

La propriété d'absorption des purines et pyrimidines dans l'UV à 260nm (fig. 13), et les protéines à 280nm permet de doser les acides nucléiques (C: concentration), et aussi bien d'estimer la contamination par les protéines lors de la purification des acides nucléiques.

$$C = A_{260} * DF * 100 \quad (\text{unité: } \mu\text{g}/\mu\text{l} \quad A: \text{Absorbance, DF: facteur de dilution})$$

$$P_{(\text{pureté})} = A_{260} / A_{280} \quad (\text{Une solution d'ADN est considérée pure si } 1.7 \leq P \leq 2)$$

