

Propriétés physiques et chimiques des acides nucléiques.

Les propriétés de l'ADN sont dues d'une part à sa composition (nucléotides) et à sa structure (longues chaînes, double hélice).

1. Dénaturation-renaturation

Dénaturation

- Quand on chauffe une solution d'ADN, l'agitation thermique provoque la rupture des liaisons hydrogène et la séparation des deux brins d'ADN ; on parle de **dénaturation**.
- La dénaturation d'un ADN donné, provoquée par **l'augmentation lente de la température**, peut être suivie au moyen d'un enregistrement de l'absorption de la lumière ultraviolette (**UV**) à **260 nm** (longueur d'onde d'absorption maximale des bases puriques et pyrimidiques due aux systèmes de doubles liaisons conjuguées liant les atomes des hétérocycles).
- Lorsqu'on chauffe l'ADN, la viscosité diminue et la densité optique à 260 nm augmente. C'est **l'hyperchromicité ou effet hyperchrome**.
- L'ADN sous forme bicaténaire absorbe modérément la lumière ultraviolette alors que sa forme monocaténaire l'absorbe plus fortement en raison du démasquage des bases, conséquence de la dénaturation.
- La courbe d'absorption à 260 nm en fonction de l'élévation de la température est une sigmoïde qui reflète le passage d'un ADN double brin à un ADN simple brin (Fig.1.)
- La température qui provoque la dénaturation de la moitié des molécules d'ADN est appelée **température de fusion** ou **Tm (melting temperature)**.
- La température de fusion d'un ADN double brin dépend de sa composition en bases.
- Plus un ADN est riche en bases GC, plus la valeur de Tm est élevée. Cela vient du fait que les bases G et C sont appariées par trois liaisons hydrogène alors que les bases A et T ne sont associées que par deux liaisons hydrogène. Par conséquent, plus un ADN est riche en bases G et C, plus le nombre de liaisons H maintenant les deux brins liés est élevé et plus grande devra être la chaleur à fournir pour rompre l'ADN.
- La dénaturation dépend aussi de la concentration en sels du milieu, des traitements thermiques en présence de faibles concentrations salines ou des traitements avec des solutions concentrées en formamide ou en urée (Fig.2.) déstabilisent les liaisons hydrogène.
- À la température intermédiaires, ou en présence d'une concentration modérée d'argent déstabilisant l'ADN est partiellement dénaturé, les régions riches en bases AT se séparent en simples brins alors que les régions riches en GC restent appariées.

Facteurs de variation du Tm d'un ADN :

- le Tm dépend du pH et de la force ionique. En effet, la double hélice est d'autant plus stable que les forces de répulsion entre groupements phosphates de chaque brin vont être faibles.
- mais surtout, le Tm dépend de la composition en bases de l'ADN. On a vu que la température rompt les liaisons hydrogène entre chaque brin d'ADN. Or, il y a 2 liaisons à rompre entre chaque A-T et 3 entre chaque G-C ; ainsi, la **Tm dépend de la teneur de l'ADN en GC** : le Tm augmente de 0,4°C lorsque le % de GC augmente de 1%.

Applications :

- la mesure du Tm permet d'avoir une idée de la composition en bases de l'ADN.
- le % en GC est utilisé comme **critère de classification des bactéries**. En effet, des espèces d'un même genre bactérien ont des % en GC proches.

Renaturation (Hybridation)

Définition :

Une solution d'ADN dénaturé peut être refroidie. Deux cas sont possibles :

- refroidissement rapide (ex : mettre l'ADN ayant été chauffé dans la glace). L'ADN reste dénaturé en grande partie.
- refroidissement lent (ex : on laisse le tube sur la paille). Les 2 brins complémentaires se réassocient et on retrouve l'ADN db de départ. l'ADN est dit **renaturé ou encore rehybridé**.

Application :

- Le chauffage de l'ADN suivi d'un refroidissement lent est à la base d'une technique importante de biologie moléculaire : **l'hybridation**.
- Celle-ci est possible dès que l'on dispose de 2 simples brins complémentaires (ADN/ADN ou ARN/ADN).
- Cela permet de repérer un fragment d'ADN ou d'ARN connu dans un milieu (sur un gel d'agarose, sur une coupe de tissus,...) en y fixant un fragment de séquence complémentaire, en général radioactif ou fluorescent que l'on appelle alors **sonde moléculaire**.
- Elles sont également mises à profit pour l'amplification d'un fragment d'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

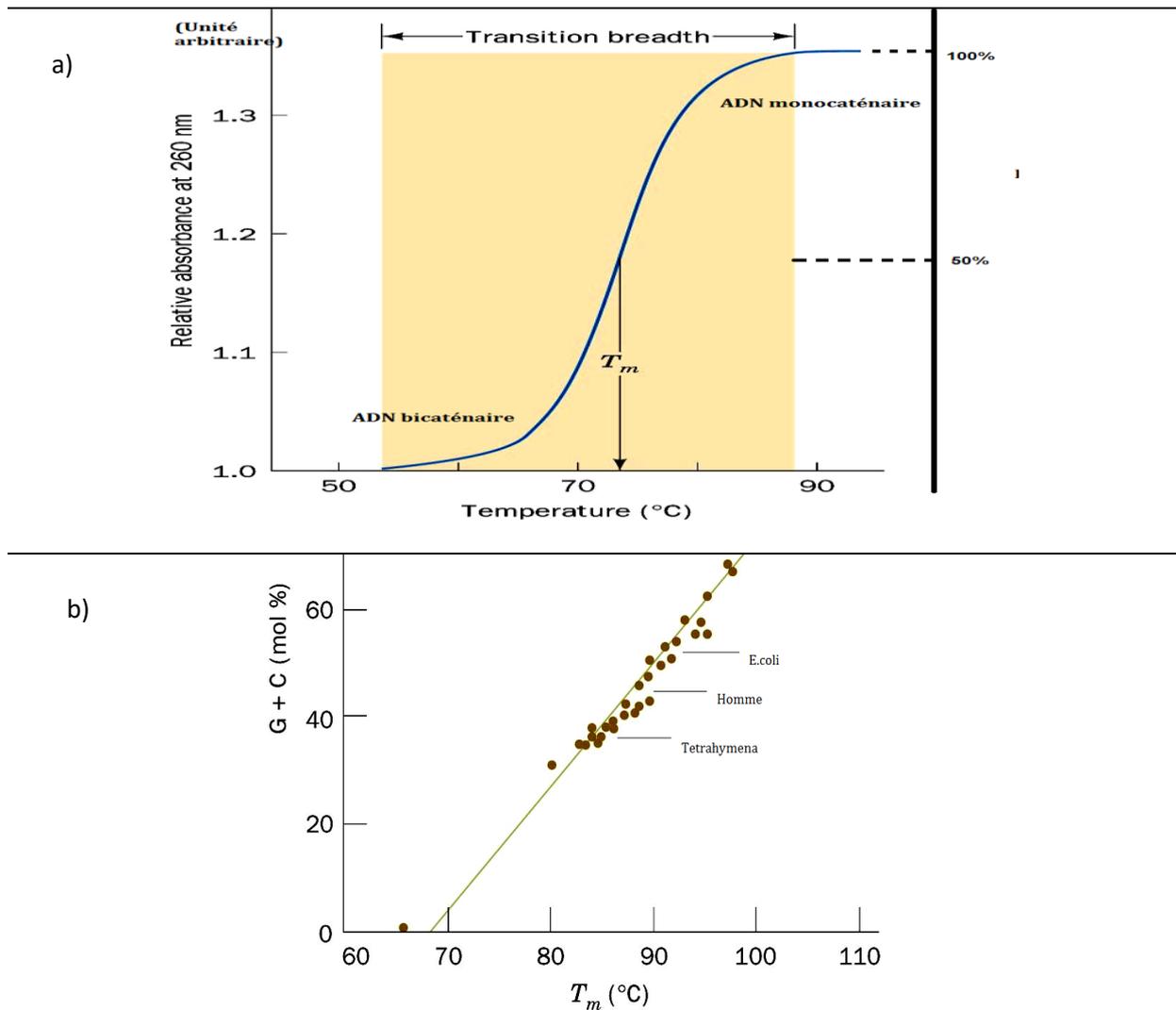


Fig.1. Courbe de dénaturation de l'ADN de différentes origines en fonction de la température.

- a) La courbe de dénaturation est obtenue par la mesure de l'absorption à 260 nm de l'ADN en solution à différentes températures. La courbe sigmoïde obtenue reflète le passage d'un ADN double brin à un ADN monobrin. La forme de la sigmoïde dépend de l'homogénéité de composition de l'ADN. Plus un ADN est homogène plus la dénaturation sera brusque. L'allure de la courbe change avec l'origine de l'ADN (l'ADN bactérien comparé à l'ADN animal par exemple). T_m = température qui entraîne la dénaturation de la moitié de l'ADN.
- b) T_m dépend de la composition en bases GC de l'ADN. Un ADN riche en GC aura une T_m plus élevée qu'un ADN pauvre en GC.

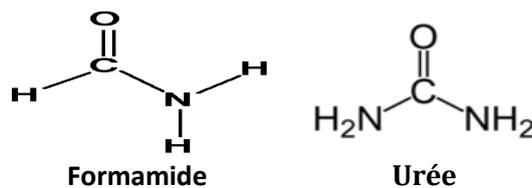


Fig.2. Agents dénaturants de la double hélice d'ADN. Ce sont des molécules capables de déstabiliser les liaisons hydrogène et d'induire une dénaturation de l'ADN.

2. Absorption de la lumière UV

Pour évaluer l'absorption de l'ADN, on effectue un balayage spectral entre 220 et 300 nm. Grâce à la présence de bases azotées, les acides nucléiques absorbent la lumière.

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.

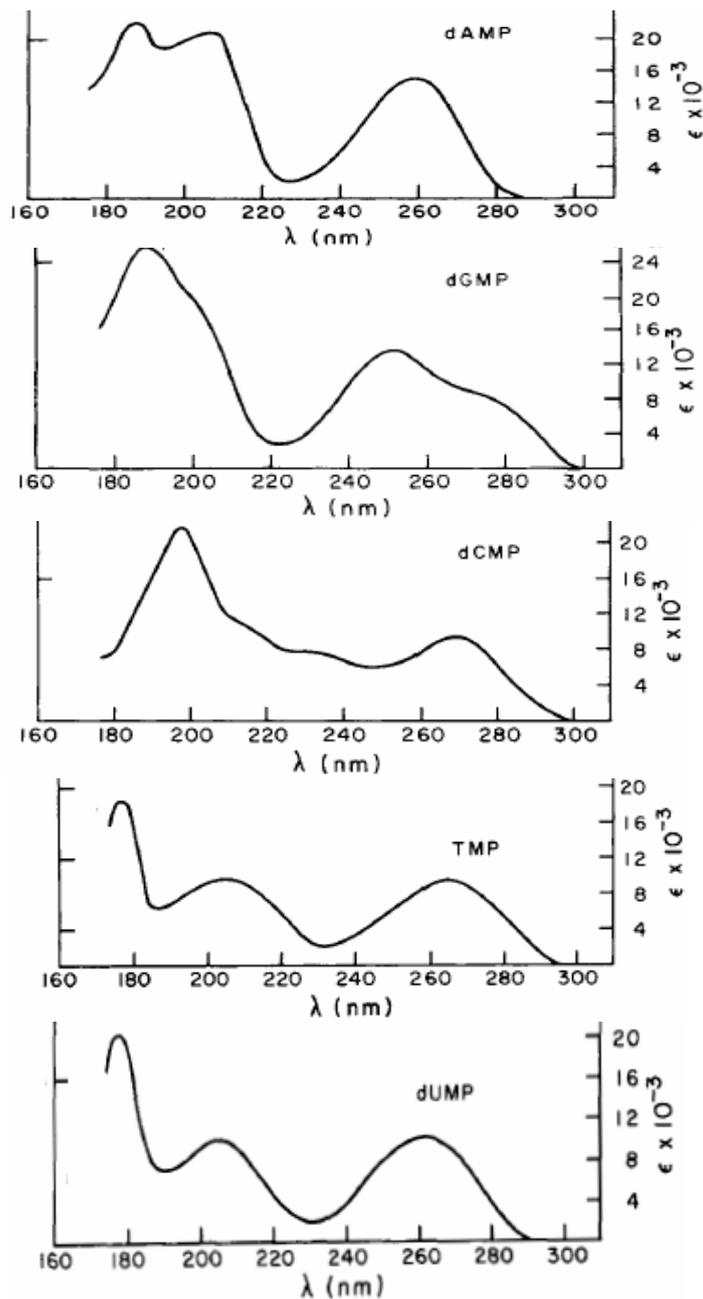


Fig.2. Spectres d'absorption des nucléotides

On suit l'absorbance d'une solution d'ADN monocaténaire et d'une solution bicaténaire en fonction de la longueur d'onde entre 220 et 300 nm. On obtient la courbe $A=f(\lambda)$ qui est appelé spectre d'absorption.

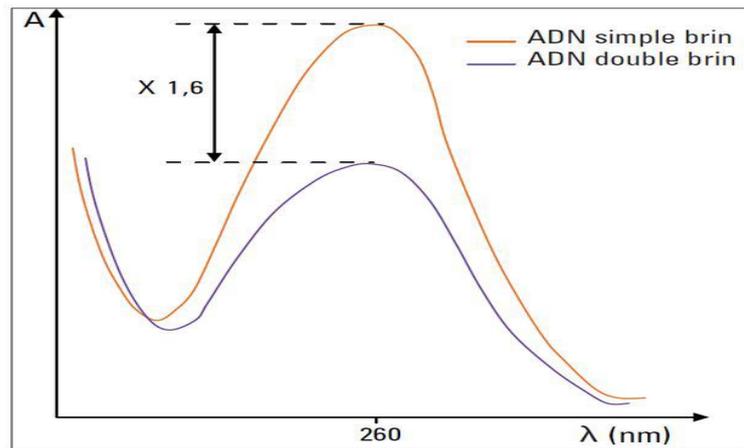


Fig.3. Spectres d'absorption de l'ADN simple brin et double brin

Les deux solutions d'ADN présente le maximum d'absorption à la longueur d'onde de 260 nm (longueur d'onde maximum des bases azotées). Pour une longueur d'onde donnée, l'ADN monocaténaire absorbe plus que l'ADN bicaténaire. (facteur 1,6).

Ce phénomène est appelé hyperchromie. Dans l'ADN double brin, les bases sont masquées ou se chevauchent, il se produit un phénomène de quenching. Alors que dans l'ADN simple brin il n'y a pas de structure qui cache les bases, le quenching est moins important, donc l'absorbance est plus importante.

Cet effet semble pouvoir s'expliquer de plusieurs façons :

- L'effet hyperchrome peut se voir comme un effet dû à un effet de chromaphore : un groupe d'atomes présentant une absorption caractéristique. La coupure en 2 brins libère les liaisons hydrogène jusque-là engagées entre les plans, ce qui pourrait avoir comme effet de renforcer l'effet de chromaphore.
- Les bases étant des amines, cet effet semble être une bonne explication (en effet les groupes NH₂ ont un effet hyperchrome), d'autant plus que les liaisons hydrogène bloquent probablement des transitions optiques.

3. Solubilité

- La présence de groupement phosphate dont les groupements hydroxyles sont sous forme ionisés donne un caractère acide à ses acides nucléiques. De ce fait, ils sont solubles dans l'eau et les solutions salines à faible concentration.
- La présence dans l'eau de sel dissout plus de l'ADN entraîne une neutralisation des charges négatives des groupements phosphates. On obtient la formation de sel d'ADN ou d'ARN. Les sels d'ADN ou d'ARN précipitent (phénomène de « relargage »), et peuvent donc être récupérés. On peut les récupérer après centrifugation. On obtient le même résultat avec un traitement à l'alcool (éthanol ou isopropanol) à chaud car l'ADN y est insoluble.
- Ces propriétés sont utilisées dans les protocoles de purification et de fractionnement de l'ADN.
- Remarque : Dans les cellules, les charges négatives de l'ADN sont neutralisées par les charges positives portées par les histones.
- Application :
Un procédé classique de purification de l'ADN consiste à traiter une solution aqueuse d'ADN par le phénol qui dénature les protéines. Le mélange phénol-chloroforme est généralement utilisé car il est plus efficace.

Les phases sont séparées par centrifugation :

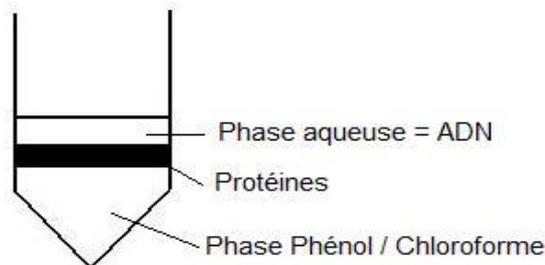


Fig.4. Centrifugation de l'ADN

4. Viscosité

Les solutions d'ADN ont une grande viscosité en raison de la grande longueur de la double hélice et de sa rigidité ; les mesures de viscosité permettent de suivre la dénaturation de l'ADN.

5. Hydrolyse des acides nucléiques

La dégradation d'un poly-nucléotide peut être chimique ou enzymatique, elle concerne :

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

5.1. 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.

5.2. 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**.

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

Enzymes de restriction

- Les enzymes de restriction sont d'origine bactérienne. Elles ont la particularité de couper les molécules d'ADN bicaténaire (ou appelées encore double brin) à des sites spécifiques de la séquence : ce sont des endonucléases.
- Chaque enzyme de restriction reconnaît et coupe une séquence nucléotidique donnée.
- Le nom des enzymes de restriction provient du nom de genre et d'espèce de la bactérie de laquelle elles ont été isolées.
- Il existe trois types d'enzymes de restriction. Les types I et III sont des protéines complexes coupant l'ADN double brin en dehors de leur site de reconnaissance.
- Les enzymes de restriction de type II sont des outils indispensables au génie génétique.
- Elles reconnaissent une séquence spécifique de 4, 6 ou 8 pb et coupent à l'intérieur de cette séquence, appelée site de restriction. Une particularité de ces sites est qu'ils sont généralement palindromiques, c'est-à-dire que l'on a la même séquence sur les deux brins, mais en sens inverse.

- De très nombreuses enzymes de restriction sont disponibles dans le commerce. Elles sont généralement fournies avec leur tampon d réaction et la température optimale de fonctionnement est indiquée sur les catalogues. Il est possible de digérer un même fragment d'ADN par deux enzymes de restriction différentes. Si elles fonctionnent dans des conditions analogues (concentrations en sels, pH, température...), les deux digestions se déroulent simultanément. Sinon, le fragment d'ADN doit être digéré par les deux enzymes successivement, en changeant entre chaque réaction enzymatique les conditions de l'expérience.
- Les enzymes de restriction utilisées coupent dans la séquence selon deux modes :
- **Coupure franche** : sont obtenues des extrémités franches par coupure au même endroit sur les deux brins.

Exemple :

L'enzyme Hae III isolée de *Haemophilus aegyptius* coupe l'ADN double brin au niveau de la séquence GG/CC .

- **Coupure décalée sur les deux brins** : sont générées des extrémités monocaténares (simple brin) ayant des séquences complémentaires appelées extrémités cohésives ou bouts collants.

Exemple :

1. L'enzyme de restriction EcoRI isolée de la bactérie *Escherichia coli* coupe l'ADN double brin dans la séquence palindromique G/AATTC.
2. L'enzyme de restriction Pst I isolée de la bactérie *Providencia stuarti* coupe l'ADN double brin dans la séquence palindromique CTGCA/G

- Soit la séquence suivante : GGTACC, cette séquence est coupée par l'enzyme **Kpn I** et l'enzyme **Acc65 I** :

Kpn I:

5'-G-G-T-A-C/C-3'
3'-C/C-A-T-G-G-5'

Acc65 I:

5'-G/G-T-A-C-C-3'
3'-C-C-A-T-G/G-5'

Ces enzymes sont des **isoschizomères**, elles reconnaissent en effet la même séquences nucléotidique GGTACC, on voit tout de suite que les extrémités des fragments obtenus diffèrent.

PALINDROME

- RADAR
- LAVAL
- ELU PAR CETTE CRAPULE
- MADAM I'M ADAM

Sont des mots ou des phrases qui peuvent être lus d'une manière identique dans les deux sens. Dans l'ADN, les palindromes se présentent sous forme de séquences répétées et inversées où la même séquence (en gras) se trouve inversée si l'on passe d'un brin à son complément à partir d'un centre de symétrie.



Certains palindromes sont courts. C'est le cas des séquences reconnues par certaines **enzymes de restriction**. D'autres sont beaucoup plus longues séquences nucléotidiques. Ils marquent pour certaines la fin d'éléments génétiques mobiles, pour d'autres le lieu de recombinaisons spécifiques.

ENZYMES DE RESTRICTION

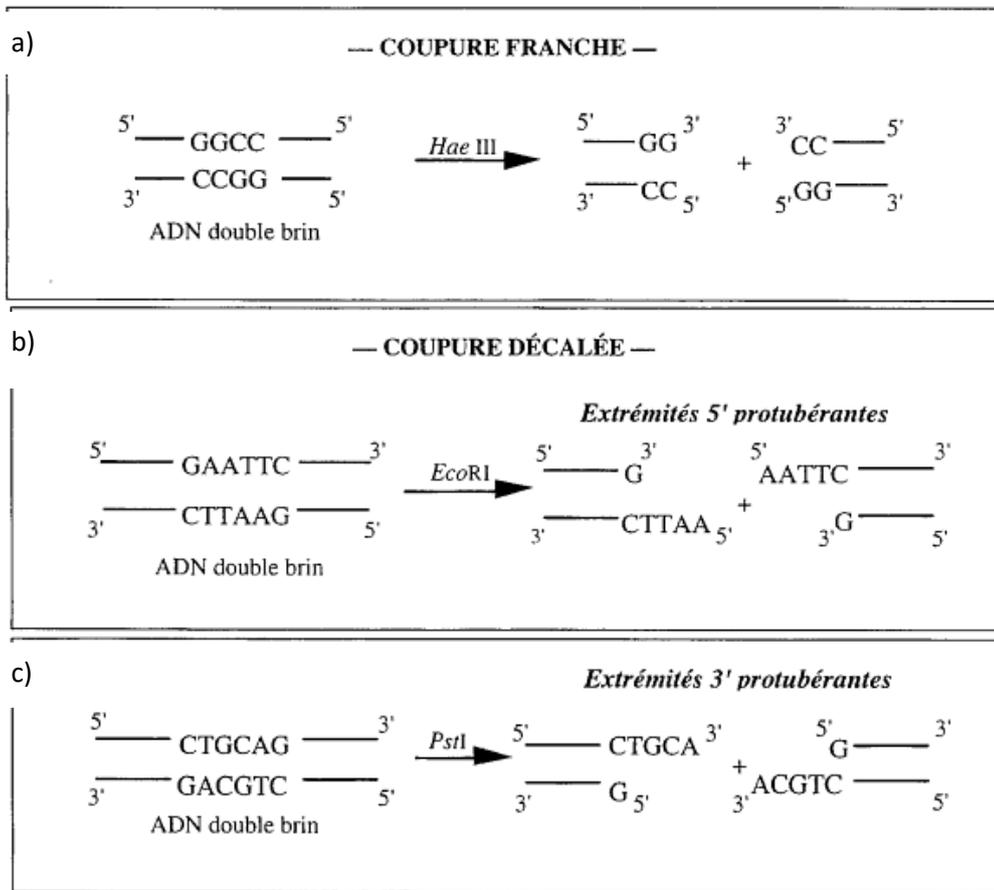


Fig.5. Clivage de l'ADN par des endonucléases de restriction. Dans l'ADN existent des séquences reconnues par des endonucléases de restriction. Ces séquences peuvent être de 4 ou 6 paires de bases. Les exemples présentés ont des sites à 6 paires de bases. Les trois types de clivage se distinguent par la nature des fragments obtenus : a) fragments à bords francs b) fragments protubérants en 5' c) fragments protubérants en 3'

Construction de la carte de restriction (cartographie)

Soit une molécule d'ADN linéaire de 5000 paires de bases

Une digestion avec l'enzyme

- -EcoRI (E) permet d'obtenir 4 fragments : 2100, 1400, 1000, et 500 pb, il existe donc 3 sites de coupure (sites de restriction) pour cette enzyme.
- Bam HI (B) possède deux sites de restriction, elle coupe l'ADN en 3 morceaux : 2500, 1300 et 1200 pb.
- En ajoutant les deux enzymes en même temps dans le milieu d'incubation. Après digestion complète (tous les sites reconnus par l'une ou l'autre enzyme sont coupés) l'électrophorèse permet de séparer des fragments de 1900, 1000, 800, 600, 500 et 200 pb.
- Le raisonnement repose sur l'additivité parfaite des tailles : si le fragment E 2100 possède un site B à 200 pb de l'extrémité, les fragments générés par la double digestion seront de 200 et 1900 pb.
- On remarque que les fragments 1000 et 500 se trouvent à la fois dans la double digestion, il s'agit donc des extrémités.
- La suite repose sur le chevauchement des fragments produits par l'une ou l'autre enzyme, si l'on choisit 1000 pb comme premier site de coupure pour E, on doit trouver dans la double digestion un fragment « n » tel que $1000 + \text{« n »} = \text{taille d'un fragment B}$ qui correspond au 1^{er} site reconnu par B200 est candidat et l'on place un site B à 1200 pb de l'extrémité...et ainsi de suite.

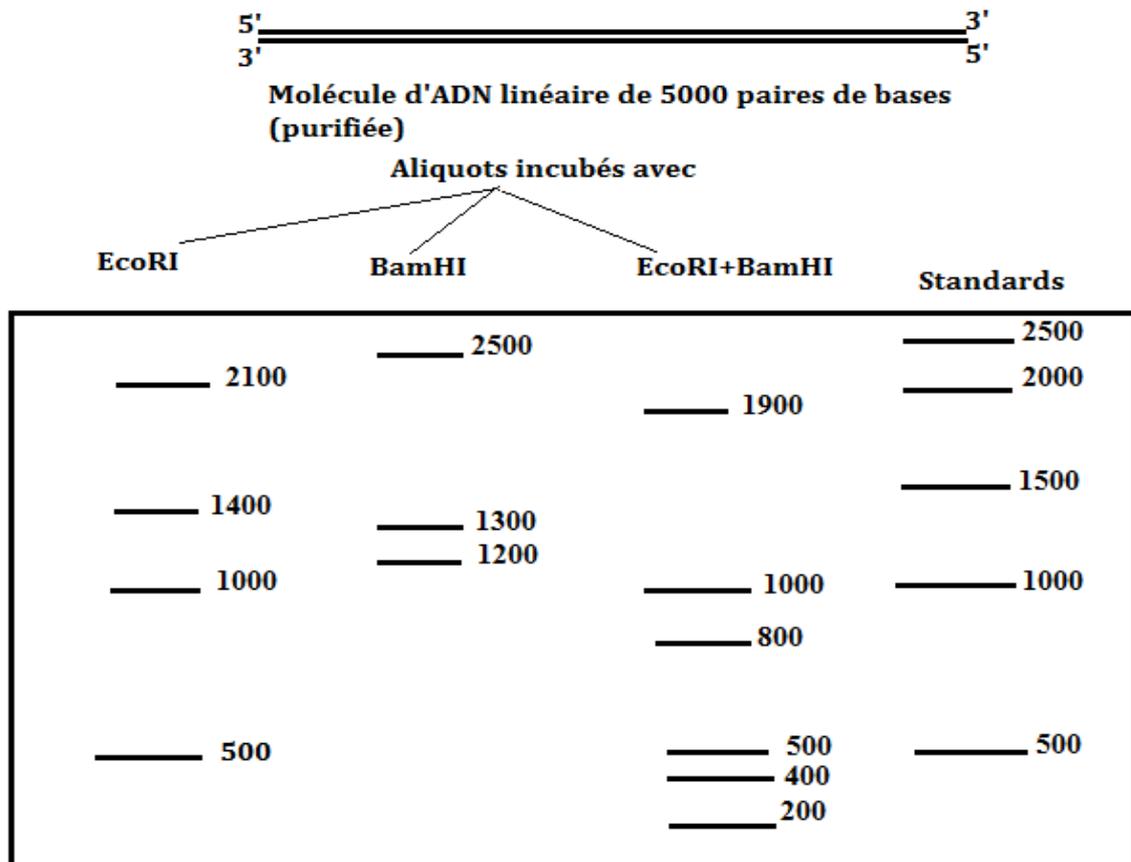
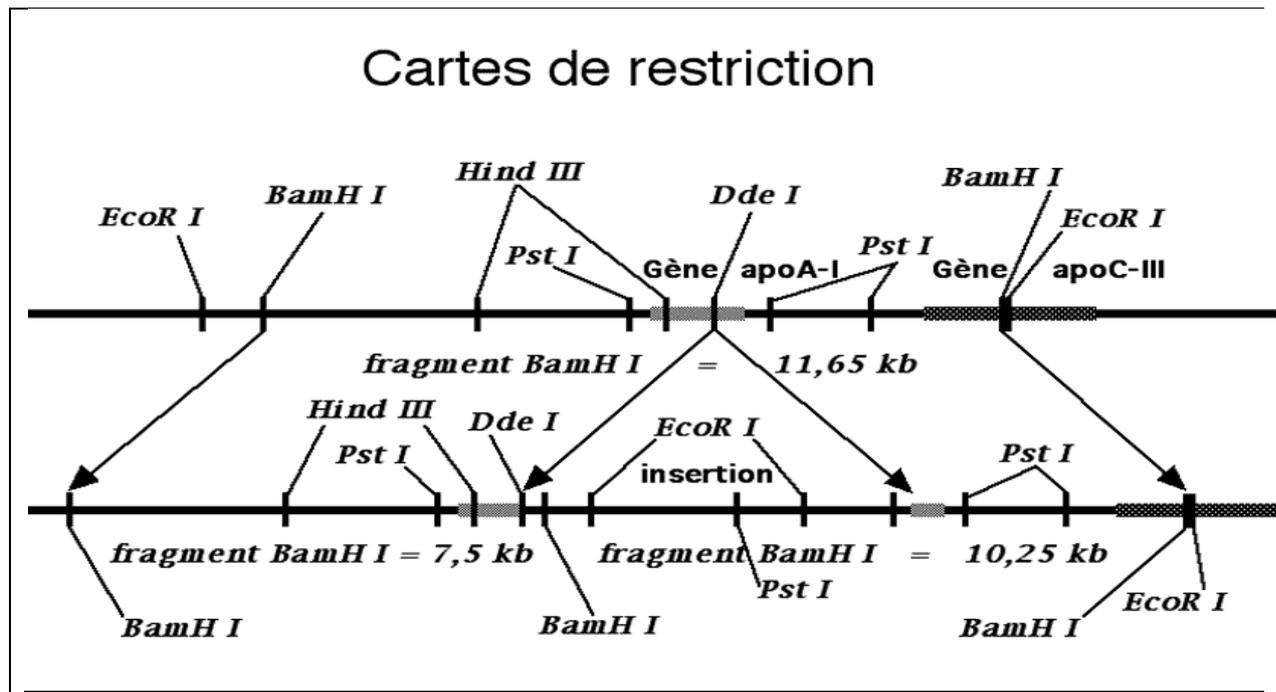


Fig.6. Electrophoregramme des séquences nucléotidiques



Tab.1. Quelques nucléases de restriction couramment utilisées

Nucléase	Source (rappelée dans le nom de l'enzyme)	Site reconnu
Hæ III	<i>Hæmophilus ægyptus</i>	GGCC CCGG
Mbo I	<i>Moraxella bovis</i>	GATC CTAG
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC CCTAGG
Eco RI	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC CTTAAG
Eco RII	<i>Escherichia coli</i>	GCCTGGC CGGACCG
Hpa II	<i>Hæmophilus parainfluenzæ</i>	CCGG GGCC
Taq I	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA AGCT
Bgl II	<i>Bacillus globiggi</i>	AGATCT TCTAGA
Hin dIII	<i>Hæmophilus infleuzæ</i>	AAGCTT TTCGAA
Pst I	<i>Providentia stuartii</i>	CTGCAG GACGTC