

## Biologie Moléculaire

### Introduction :

La **biologie moléculaire** (parfois abrégée bio. mol.) est une discipline scientifique de la vie au croisement de la génétique, de la biochimie métabolique et de la physique, dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau **moléculaire**.

Le terme Bio mol utilisé pour la première fois en 1938 par Warren Weaver, désigne également l'ensemble des techniques de manipulation d'acides nucléiques (ADN, ARN), appelée aussi techniques de génie génétique. Pour cela ,les techniques d'étude et de modification des gènes et de leur expression font partie intégrante de la biologie moléculaire.

La biologie moléculaire est une discipline scientifique qui décrit la manière dont l'information génétique est conservée, transmise et exprimée.

La biologie moléculaire est apparue au XX<sup>e</sup> siècle, à la suite de l'élaboration des lois de la génétique, la découverte des chromosomes et l'identification de l'ADN comme support chimique de l'information génétique.

Après la découverte de la structure en double hélice de l'ADN en 1953 par James Watson (1928- ), Francis Crick (1916-2004), Maurice Wilkins (1916-2004) et Rosalind Franklin (1920-1958) la biologie moléculaire a connu d'importants développements pour devenir un outil incontournable de la biologie moderne à partir des années 1970.

Les chercheurs en biologie moléculaire utilisent des techniques spécifiques pour la biologie moléculaire (voir plus loin *Techniques de biologie moléculaire*), mais les combinent de plus en plus avec les techniques et les idées provenant de la génétique et de la biochimie. Il n'y a pas de frontière bien définie entre ces disciplines, bien qu'il y en ait eu à une certaine époque.

La figure ci-contre illustre une vue possible de la relation entre les domaines :

- La *biochimie* est l'étude des substances chimiques et des processus vitaux qui se produisent dans les organismes vivants.
- La *génétique* est l'étude des effets des différences génétiques entre les organismes. Souvent cela peut être déduit par l'absence d'un composant normal (par exemple un

gène). L'étude des « mutants » — organismes dont il manque un ou plusieurs composants fonctionnels par rapport au soi-disant « type naturel » ou au phénotype normal. Les interactions génétiques telles que les épistasies mettent souvent en défaut les interprétations simples de ces études par « élimination ».

- La *biologie moléculaire* est l'étude des processus de réplication, de transcription et de traduction du matériel génétique. Le dogme central de la biologie moléculaire où le matériel génétique est transcrit en ARN, puis traduit en protéines, bien qu'il soit une image très simpliste et sans fondement de la biologie moléculaire, fournit encore un bon point de départ pour comprendre ce domaine. Cette image, cependant, doit être révisée à la lumière des nouveaux rôles qu'on découvre à l'ARN.

L'essentiel du travail en biologie moléculaire est quantitatif, et récemment beaucoup de travaux ont été faits à l'intersection de la biologie moléculaire et de l'informatique, dans la bio-informatique et dans la biologie calculatoire. Depuis les années 2000, l'étude de la structure et de la fonction des gènes, la génétique moléculaire, fait partie des sous-domaines les plus saillants de la biologie moléculaire.

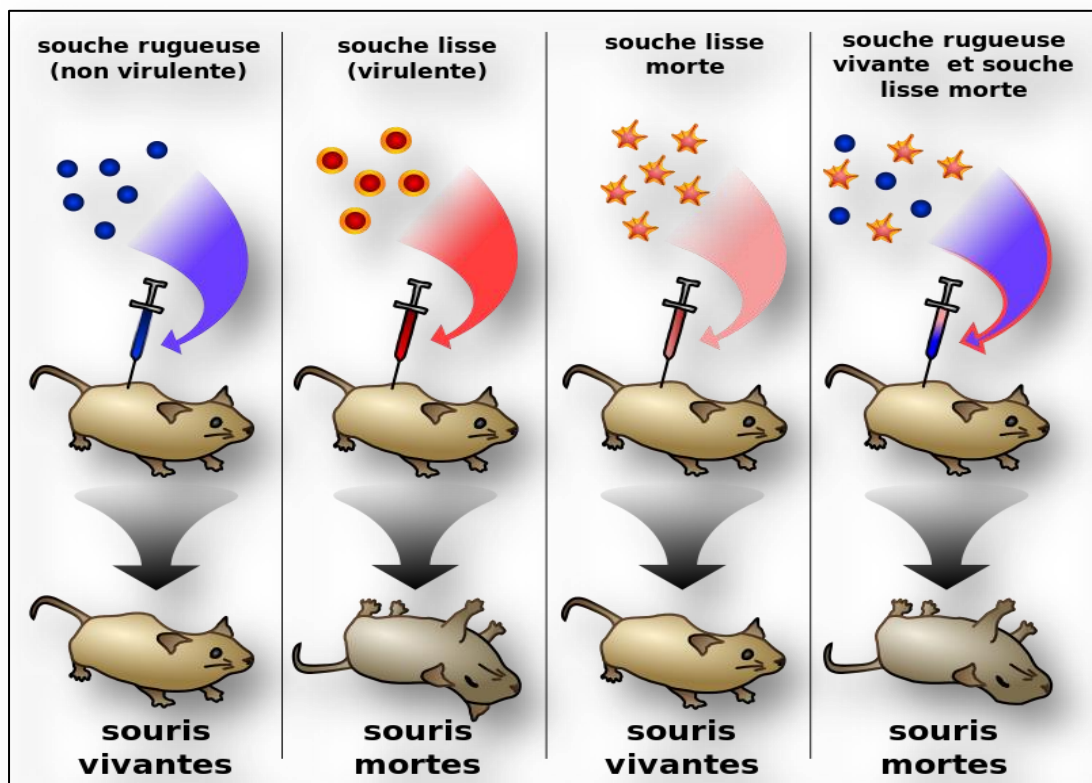
De plus en plus, de nombreux autres domaines de la biologie se concentrent sur les molécules, soit directement, en étudiant leurs interactions propres comme en biologie cellulaire et en biologie du développement, soit indirectement, quand les techniques de la biologie moléculaire sont utilisées pour déduire les attributs historiques des populations ou des espèces, comme dans les domaines de la biologie de l'évolution telles que la génétique des populations et la phylogénie. Il y a également une longue tradition d'étude des biomolécules « à partir du bas » en biophysique.

## Chapitre 01 :

### Bases moléculaire de l'hérédité : le génome

#### 1.1. L'ADN, Support de l'information génétique

En 1928, **Frederick Griffith** a constaté qu'en injectant à une souris des **pneumocoques** de souche **R** ("**rough**" et non virulents) ainsi qu'une petite quantité de pneumocoques **S** ("**smooth**", encapsulés et virulents) tués, la souris meurt et on récupère des pneumocoques des deux souches dans son sang (**figure 01**). De plus, si la souche **R** non virulente dérive d'un pneumocoque de **type antigénique III** par exemple, et qu'on y ajoute du pneumocoque de type S (virulent) tué de **type II**, les pneumocoques encapsulés que l'on récupère seront de type antigénique II. Ainsi les deux caractères d'une souche bactérienne, la virulence et l'antigène de type II ont été transférés à une autre souche. Griffith en a déduit l'existence d'un "principe transformant" appelé transformation.



**Figure 01:** Expérience de F. Griffith en 1928.

C'est en 1944 qu'**Oswald Avery** reprendra les travaux de **Fred Griffith** et mettra en évidence le stockage de l'information génétique sur l'ADN grâce à plusieurs expériences où il utilisera des souches de pneumocoques **S (smooth)** virulents et **R (rough)** non virulents. À la différence des travaux de Griffith il injectera des mélanges des 2 souches (par exemple souche R + acides nucléiques de S). Il en déduira grâce à cette suite d'expériences que l'ADN est le support de l'information génétique car il constatera que les souris meurent lorsqu'on leur injecte les acides nucléiques (qui composent l'ADN) de S, la souche virulente.

L'expérience d'Avery est basée sur le test du système que celui réalisé par Griffith. En bref, Griffith utilisé dans les études *Streptococcus pneumoniae*. En particulier, deux de ses souches:

- la souche *S*, peut causer pneumonie chez le cobaye (*souche virulente*).
- la souche *R* incapable de provoquer une pneumonie chez la souris (*souche avirulente*).

Dans ses expériences, il a vérifié et a démontré que:

- L'injection à des souris de la souche *S* Il est à l'origine la maladie et la mort; il est alors possible d'isoler les bactéries *S* de textiles l'animal.
- L'injection à des souris de la souche *R* Il n'a pas causé la maladie et il n'a pas été possible d'isoler les bactéries *R* à partir de tissus de l'animal.
- L'injection à des souris de la souche *S*, tué à la suite d'un traitement thermique, il n'a pas causé la maladie et ne pas être isolé des tissus animaux.
- Injection chez la souris d'un mélange de bactéries *S* tué à la suite d'un traitement thermique et de bactéries *R* vivant était capable de causer la maladie et la mort de l'animal. Ensuite, les tissus de la souris peuvent isoler des bactéries vivantes de la souche *S*.

Pour expliquer ces résultats Griffith a proposé que, dans le mélange contenant des bactéries mortes *S* et des bactéries vivantes *R*, Il aurait dû se produire l'échange **d'une substance** (*matériel génétique*) Qui conférerait la virulence aux bactéries *R* (Qu'ils ont ensuite été transformés en *S*). L'expérience Avery visait à déterminer quelle était cette **substance**.

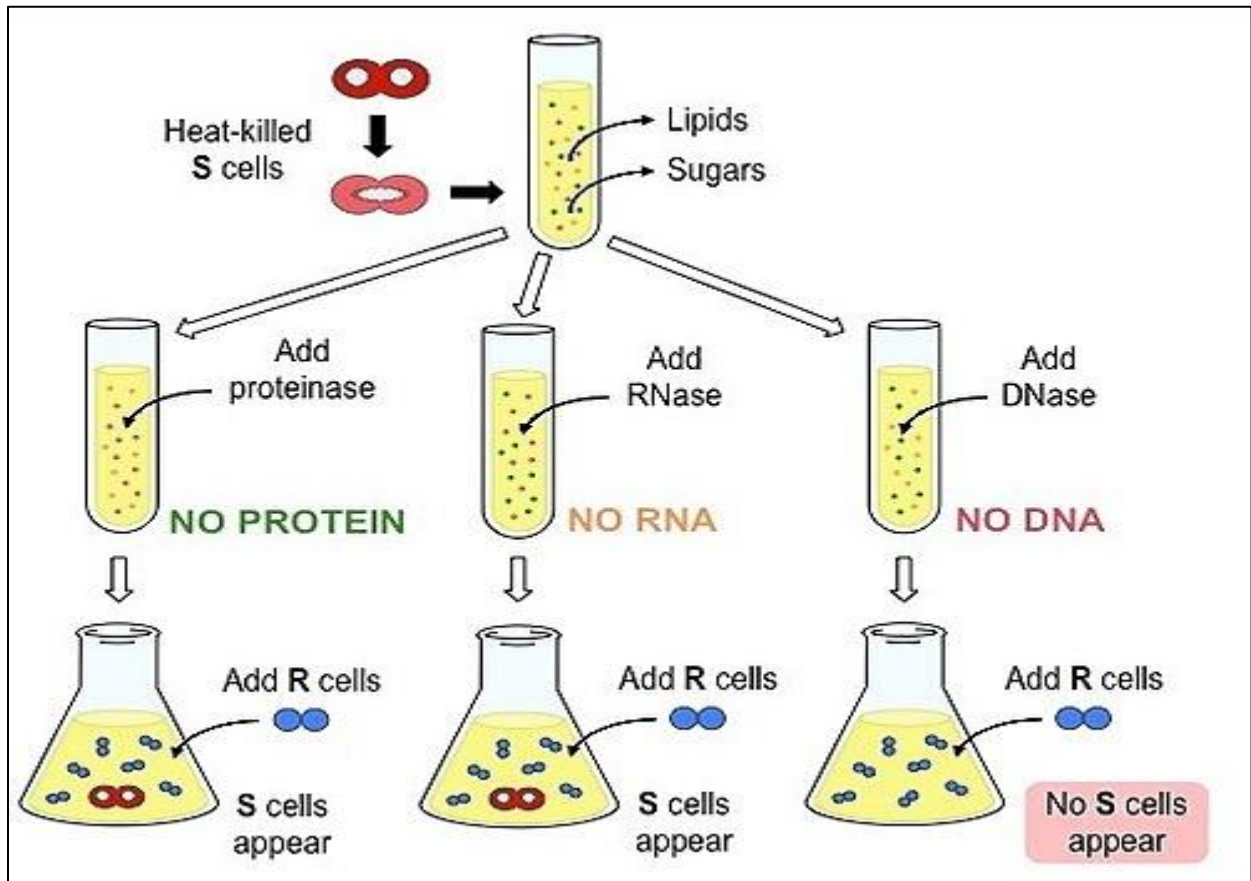
❖ Schéma d'expérience d'Avery

Avery procura une culture de type pneumocoque *S*. A ce stade, le Liso cellule (Il a brisé le mur et la membrane cellulaire) Ainsi, pour obtenir une solution dans laquelle on a dissous la matière contenue dans les bactéries, les soi-disant *extraits cellulaires* ou *lysats cellulaires*.



Le matériel génétique serait probablement l'un de plusieurs types de macromolécules biologique présent dans les bactéries: (protéine, polysaccharides, des acides nucléiques - que ADN et ARN - et lipides). Avery et ses collègues ont pu séparer l'extrait cellulaire dans les différents composants macromoléculaires mentionnés. Ensuite, ils ont essayé de comprendre qui de ces substances étaient effectivement capables de transformer les bactéries *R* bactéries non virulentes en *S* virulent. Les cobayes ont survécu lorsqu'ils sont traités avec l'ensemble des biomolécules à l'exception des acides nucléiques: le matériel génétique doit donc être de l'ADN et / ou ARN.

Pour déterminer laquelle des deux substances ont été, divisé l'extrait contenant l'acide nucléique dans deux taux: une a été traitée avec l'enzyme ribonucléase (RNase), qui dégrade sélectivement l'ARN et non l'ADN, l'autre a lieu traité avec la désoxyribonucléase (DNase) Qui dégrade sélectivement l'ADN et l'ARN non (**figure 02**).



**Figure 02:** Expérience d'Avery en 1944.

Ce qui a été observé a été la transformation des bactéries *R* dans des bactéries *S* seulement après avoir ajouté le taux traitée avec de la RNase (qui avait alors l'ARN dégradé). **Le matériel génétique serait alors nécessairement être l'ADN.**

## 1.2. Les molécules informationnelles dans l'hérédité :

### 1.2. 1. Le génome

Au sens strict, le génome est l'ensemble des gènes d'un organisme. Par extension, on utilise ce terme pour désigner l'ensemble des molécules portant les gènes, c'est-à-dire l'ADN. On utilise souvent, comme unité de mesure des acides nucléiques, la **kilobase** (ou **kilopaires de bases** pour l'ADN double brin). On dira donc que le génome « haploïde » (= par jeu de chromosomes) qui compte chez l'homme 3 milliards de paires de nucléotides représente 3 millions de kilopaires de bases (**kpb**).

Les gènes sont constitués de brins d'acides nucléiques : acide désoxyribonucléique presque toujours, acide ribonucléique dans certains virus des animaux (rétrovirus, virus de la rougeole, par exemple) et des plantes. Les acides nucléiques sont des macromolécules présentes dans toutes les cellules vivantes, soit à l'état libre soit combinées à des protéines pour former **les nucléoprotéines**. Ce sont des polymères linéaires de nucléotides, c'est-à-dire formés par l'association de plusieurs nucléotides. Chaque nucléotide est constitué lui-même d'une base hétérocyclique, d'un pentose et d'un acide phosphorique. Selon la nature du pentose, on distingue deux types d'acide nucléiques : les acides ribonucléiques ou ARN (contenant du ribose) et les acides désoxyribonucléiques ou ADN (contenant du désoxyribose).

Toutes les cellules eucaryotes et procaryotes renferment à la fois de l'ADN et de l'ARN. Alors que les virus ne contiennent qu'un seul type d'acide nucléique soit de l'ADN soit de l'ARN. L'ADN est essentiellement retrouvé au niveau du noyau des cellules végétales et animales où il est localisé dans des chromosomes. Cependant l'ADN n'est pas exclusivement nucléaire, les mitochondries des cellules animales et végétales ainsi que les chloroplastes en renferment également mais à des petites quantités.

L'ARN existe essentiellement au niveau du cytoplasme cellulaire et est particulièrement abondant dans les cellules réalisant une importante synthèse protéique.

### **1.2.2. les acides nucléiques :**

#### **.1.2.2. 1. Constituants des acides nucléiques :**

L'hydrolyse totale des acides nucléiques montre que chaque nucléotide est constitué de l'enchaînement de trois éléments : une base, un pentose et un acide phosphorique.

##### **1.2. 2.1.1. Les bases hétérocycliques azotées :**

Les bases nucléotidiques sont des composés cycliques azotés dérivent soit de la pyrimidine soit de la purine. Les pyrimidines sont des hétérocycles aromatiques à six atomes numérotés dans le sens des aiguilles d'une montre à partir d'un hétéroatome (dans ce cas c'est l'atome d'azote). Le cycle de la purine résulte de la fusion de deux cycles, celui de la pyrimidine avec le cycle de l'imidazole (voir figure 03).

##### **a. Les bases pyrimidiques :**

Elles sont formées d'un cycle hexagonal à 4 carbones et 2 azotes (figure.03) (tableau 01). Les pyrimidines les plus communes sont :

- **La cytosine** :(2-oxy, 4-amino pyrimidine, voir figure 03), elle est présente dans les deux types d'acide nucléique (ADN et ARN).
- **L'uracile** : (2, 4-dioxy pyrimidine, voir figure 03), présente dans tous les ARN mais n'existe pas dans les ADN.
- **La thymine** :(2, 4-dioxy, 5-méthyl pyrimidine ou 5-méthyl uracile, voir figure 03), elle est présente dans tous les ADN où elle remplace l'uracile.Elles diffèrent entre elles par les groupements R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> et le nombre de doubles liaisons sur le cycle.

**Tableau 01** :Groupements substituant le cycle pyrimidique des bases nucléotidiques

	Groupements R <sub>1</sub>	Groupements R <sub>2</sub>
Uracile	NH <sub>2</sub>	H
Cytosine	NH <sub>2</sub>	H
Thymine	O	CH <sub>3</sub>

**b .Les bases puriques :**

Elles sont formées de l'accolement d'un cycle hexagonal à 4 carbones et 2 azotes et d'un cycle pentagonal à 3 carbones et- 2 azotes. Deux bases puriques majeures dérivent du noyau purine :

- **L'adénine** :(6- amino purine, voir figure 03), présente dans les ADN et les ARN. A l'état libre elle est présente dans les urines, le lait de vache et certains végétaux comme le thé, le café et le tabac. L'adénine a un groupement H sur le carbone 2 et NH<sub>2</sub> sur le carbone 6.
- La guanine** :(2- amino, 6- oxy purine, voir figure 03), elle est également présente dans les deux types d'acides nucléiques. Elle doit son nom au fait qu'elle ait été isolée à partir du **guano**, une engrée azotée et phosphorée provenant des excréments d'oiseaux du Mexique.La guanine a un groupement NH<sub>2</sub> sur le carbone 2 et O sur le carbone 6.



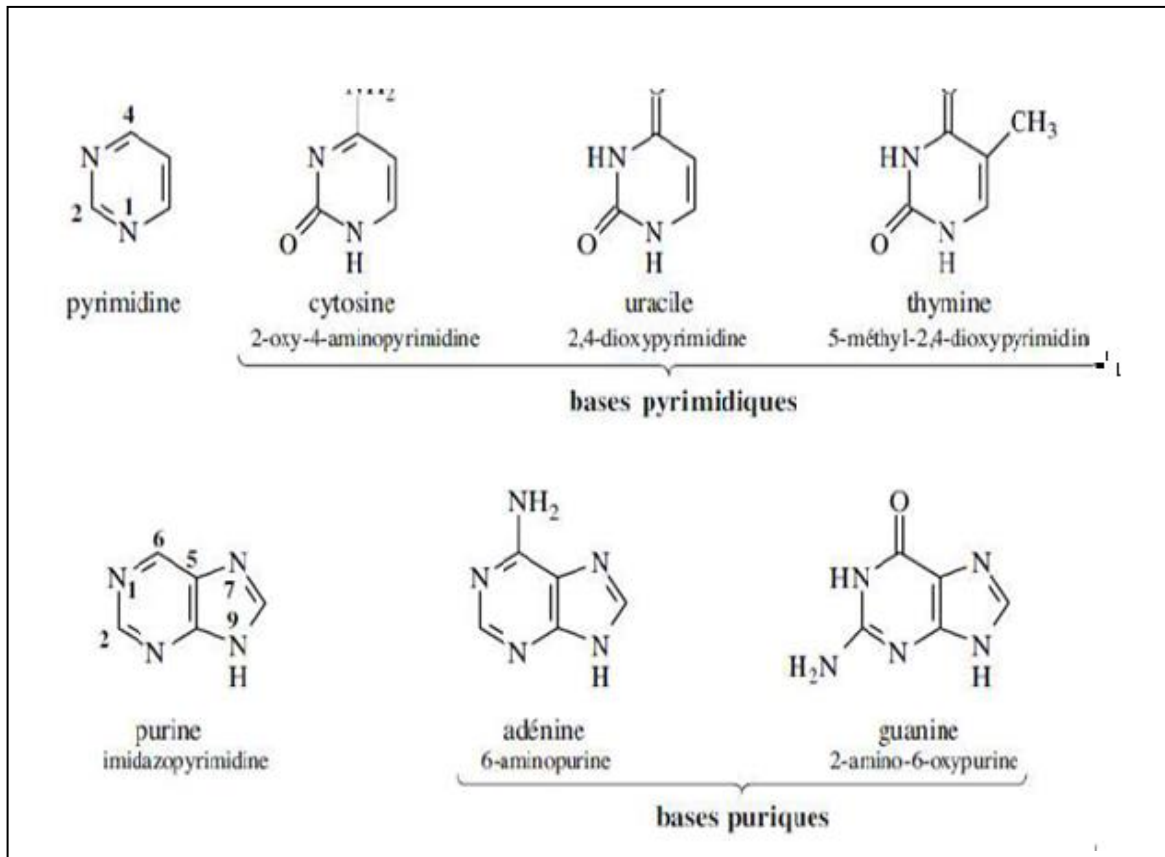


Figure 03: Les principales bases azotées cycliques

1.2. 2.1.2. Les oses (glucides) :

Les oses impliqués dans la structure des acides nucléiques sont des aldopentoses ; le  $\beta$ -D-Ribose pour l'ARN et le  $\beta$ -D 2-Désoxyribose dans l'ADN (figure 04).

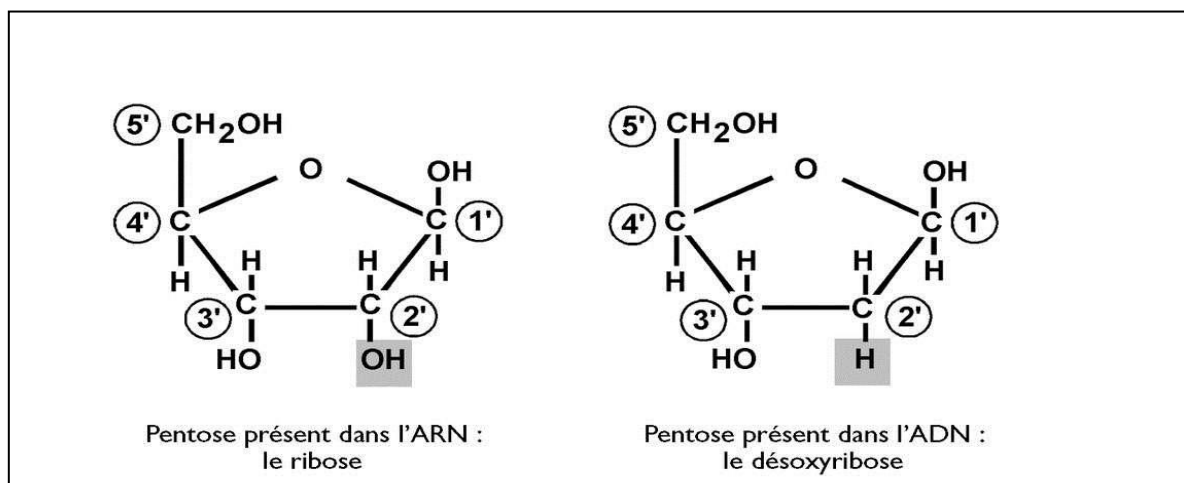
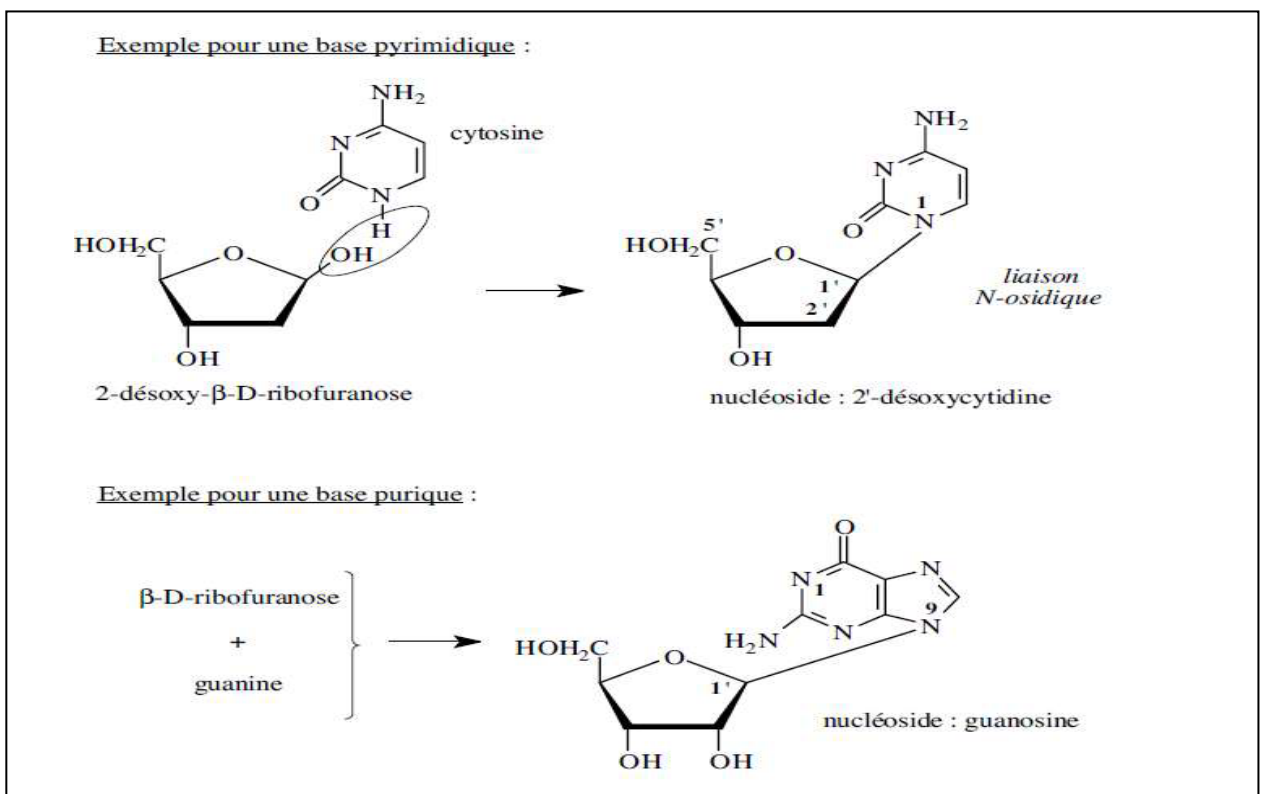


Figure 04 : Les oses impliqués dans la structure des acides nucléiques

**1.2. 2.1.3. Les nucléosides :**

Ils résultent de l'association d'un sucre et d'une base purique ou pyrimidique par une liaison *N-Osidique* (voir figure 05), ce sont alors des N-hétérosides. Cette liaison unit le carbone 1' du ribose et l'azote 1 de la base pyrimidique ou l'azote 9 de la base purique (voir figure 05). Selon la structure du pentose on distingue les ribonucléosides et les désoxyribonucléosides.



**Figure 0 5 : Exemple de nucléosides, liaison base -pentose**

**1.2. 2.1.4. Les nucléotides :**

Les nucléotides sont des nucléosides phosphorylés. En effet, ils résultent de la phosphorylation d'un groupement OH de l'ose du nucléoside. Le cycle du D- ribose a 3 groupes OH phosphorylables : C2', C3', C5', alors que le D- désoxyribose n'en a que deux : C3' et C5'. L'immense majorité de nucléotides cellulaires sont de nucléosides phosphorylés en C5' (voir figure 04). Tous les nucléotides courants existent également dans la cellule sous forme de nucléoside biphosphate et de nucléosides triphosphate (voir figure 05).

L'acide phosphorique est un tri acide ce groupement phosphate rend donc le nucléotide chargé négativement. Dans un nucléotide libre, l'acide phosphorique est lié au sucre par une de ses fonctions acides (figure .05).

C'est le groupement hydroxyle (OH) du carbone 5 du pentose qui forme la liaison covalente.

Le nucléotide libre peut contenir un, deux ou trois groupements phosphates. On parle alors de nucléotide mono-, di- ou triphosphates. Les phosphates sont alors liés entre eux par des liaisons « phosphoanhydride », riches en énergie chimique.

Dans les ADN et ARN, le seul groupement phosphate du nucléotide verra deux de ses trois fonctions acides estérifiées. La première fonction estérifiée permet la liaison au sucre du nucléotide précédent.

#### A. Nomenclature des différents nucléotides

Par convention, l'association d'une base à un sucre de type pentose est appelée nucléoside, alors que l'association d'une base, d'un sucre et d'un phosphate est appelée nucléotide. Le nom du nucléoside ou du nucléotide dérive de celui de sa base (radical) suivi d'un suffixe « osine » (base purique) ou « idine » (base pyrimidique) pour les nucléosides et « ylique » (Base purique) ou « idylique » (Base pyrimidique) pour les nucléotides. Ces règles et les abréviations des nucléotides sont schématisées dans les tableaux 1 et 2 et dans la figure 05 .

**Tableau 02 :** Bases, nucléosides et nucléotides constituant l'ARN

Base	Abréviation	Nucléoside	Nucléotide	Abréviation
Adénine	A	Adénosine	Acide adénylique	AMP
Guanine	G	Guanosine	Acide guanylique	GMP
Cytosine	C	Cytidine	Acide cytidilique	CMP
Uracile	U	Uridine	Acide uridylique	UMP

**Tableau 03** : Bases, nucléosides et nucléotides constituant l'ADN

<b>Base</b>	<b>Abréviation</b>	<b>Nucléoside</b>	<b>Nucléotide</b>	<b>Abréviation</b>
Adénine	A	Désoxyadénosine	Acide Désoxyadénylique	dAMP
Guanine	G	Désoxyguanosine	Acide Désoxyguanylique	dGMP
Cytosine	C	Désoxycytidine	Acide Désoxycytidilique	dCMP
Thymine	T	Désoxythymidine	Acide Désoxythymidilique	dTMP

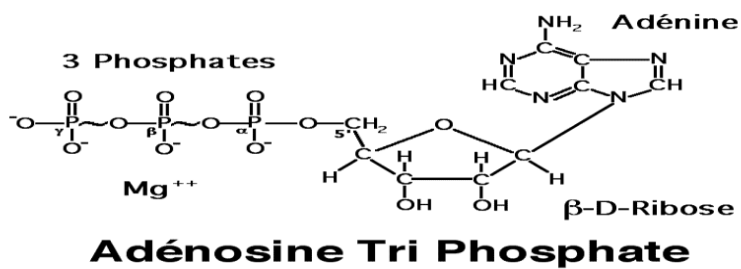
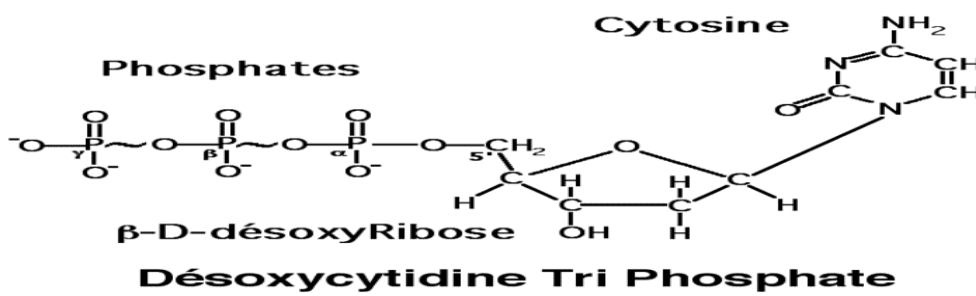
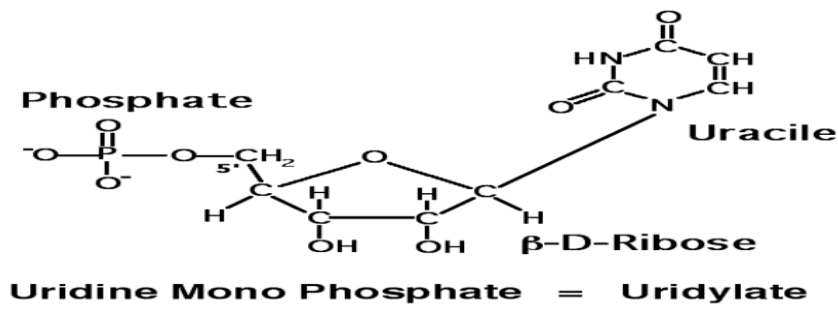
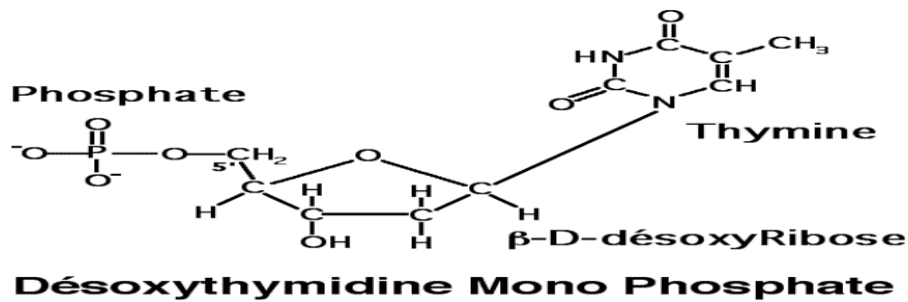
### **B. Fonctions des nucléotides**

Les nucléotides triphosphates et tout particulièrement L'ATP sont essentiels dans le transport de l'énergie cellulaire. L'hydrolyse des phosphates de ces nucléotide libère de grandes quantités d'énergie chimique utilisée dans de nombreuses réactions cellulaires ;

. Ils s'associent à d'autres molécules pour former des coenzymes ou favoriser les réactions enzymatiques ;

. Ils jouent le rôle de petits messagers solubles, transmettant le signal des hormones et neuromédiateurs à l'intérieur de la cellule (AMP cyclique) ;

. Mais surtout ils se polymérisent en une longue chaîne non ramifiée appelée acide nucléique, qui contient l'information génétique de la cellule vivante.



**Figure 05 :** Exemple de nucléotides mono-,bi- ou triphosphates existents à l'état libre dans la cellule.

### C. Liaisons entre les nucléotides dans un acide nucléique

Dans un acide nucléique, les nucléotides sont assemblés entre eux par des liaisons ester (figure 06) Une molécule d'eau est éliminée entre :

L'hydroxyle (OH) d'une fonction acide d'un groupement phosphate ( $H_3 PO_4$ ) porté par un nucléotide ; et l'hydrogène (H) d'une fonction alcool portée par le carbone 3 du pentose du nucléotide suivant. Cette liaison entre deux nucléotides est donc appelée « **phosphodiester** ».

Il se forme ainsi un squelette alternant les résidus pentose et les résidus phosphatés, les bases étant des groupements latéraux, unis au squelette à intervalles réguliers.

Ainsi, l'acide phosphorique engage deux fonctions acides dans des liaisons dites « **phosphodiester** » (une fonction ester servant à former le nucléotide, la deuxième à relier deux nucléotides entre eux).

La troisième fonction acide du phosphate reste libre et confère donc des propriétés acides aux « acides » nucléiques ADN et ARN.

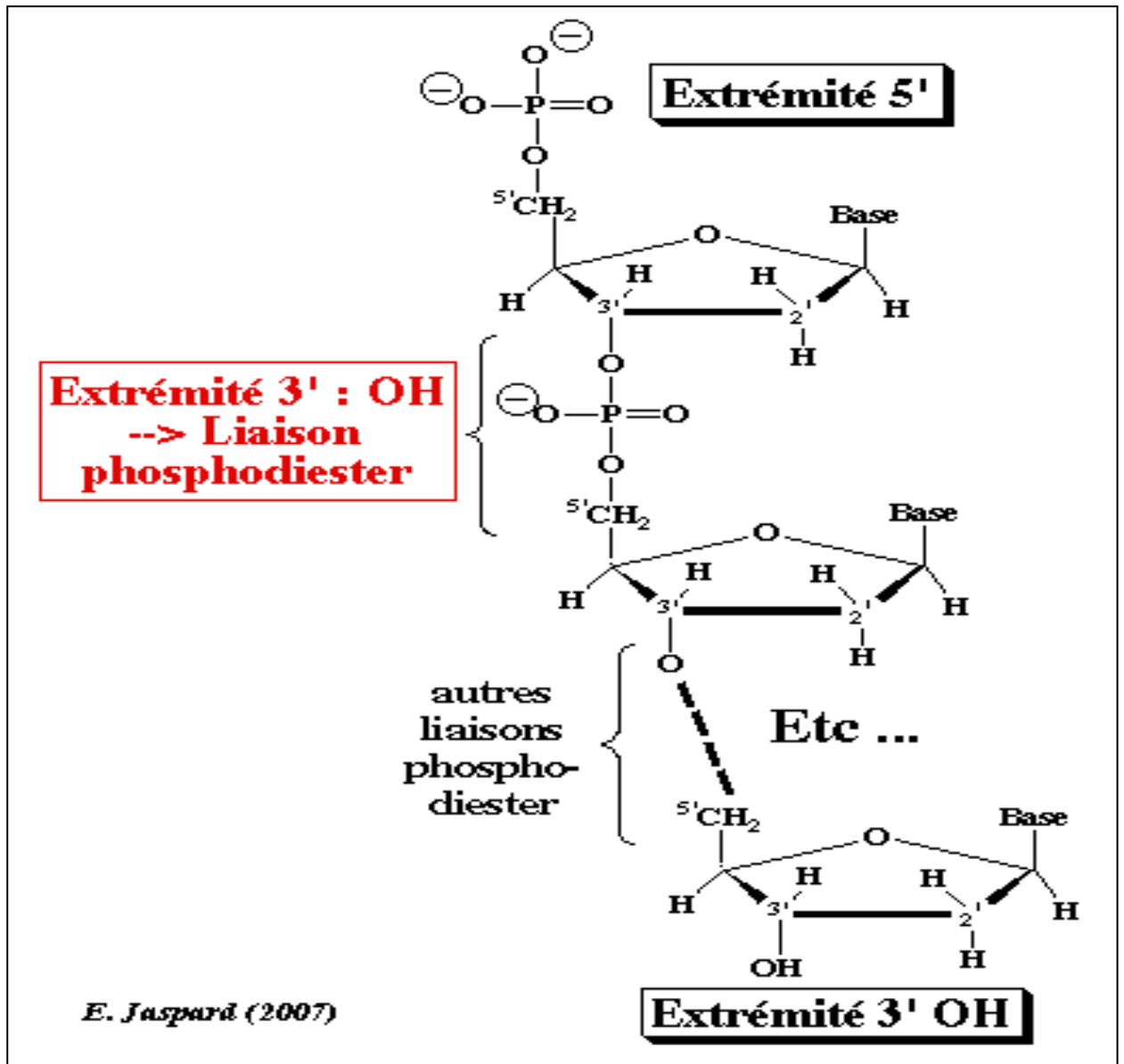


Figure 06 : Liaisons entre nucléotides

### 1.2.2. 2. L'acide désoxyribonucléique (ADN) :

L'ADN est toujours constitué de deux brins de polynucléotides enroulés l'un sur l'autre pour former une longue et fine molécule **hélicoïdale** qui s'enroulent autour d'un axe central imaginaire en formant une **double hélice**.

Les deux brins sont orientés dans des directions opposées, ils sont donc **anti-parallèles** et des liaisons hydrogènes maintiennent la structure de la double hélice . Ces liaisons hydrogènes relient les bases des nucléotides d'une chaîne aux bases **complémentaires** de l'autre chaîne pour former des couples de bases. Ces paires sont toujours constituées d'une base pyrimidique sur un brin liée à une base purique sur l'autre brin. L'appariement se fait toujours de la manière suivante : A-T et G-C, par conséquent, la séquence des bases d'un brin est **complémentaire** de la séquence des bases de l'autre brin. En effet, la composition en bases des deux brins n'est pas identique. La stabilité de la double hélice est due aux liaisons hydrogènes entre les bases G≡C et A=T, donc les zones riches en paires A=T sont dites des zones à appariement faible. Cette complémentarité entre les deux chaînes n'est pas le fruit du hasard, mais répond à des contraintes moléculaires de deux ordres.

- **Des contraintes stériques** : (c'est -à- dire pour des raisons de place, d'encombrement).

En face d'une purine, qui est constituée de deux cycles, on a obligatoirement une pyrimidine, qui ne possède qu'un cycle, et inversement.

Deux purines (= quatre cycles au total) prendraient trop de place.

Deux pyrimidines (= deux cycles en tout) seraient trop éloignée pour former des liaisons stables.

Chaque paire de bases a donc la même dimension et cela rend possible la structure régulière de la double hélice .

- **Des contraintes chimiques** :

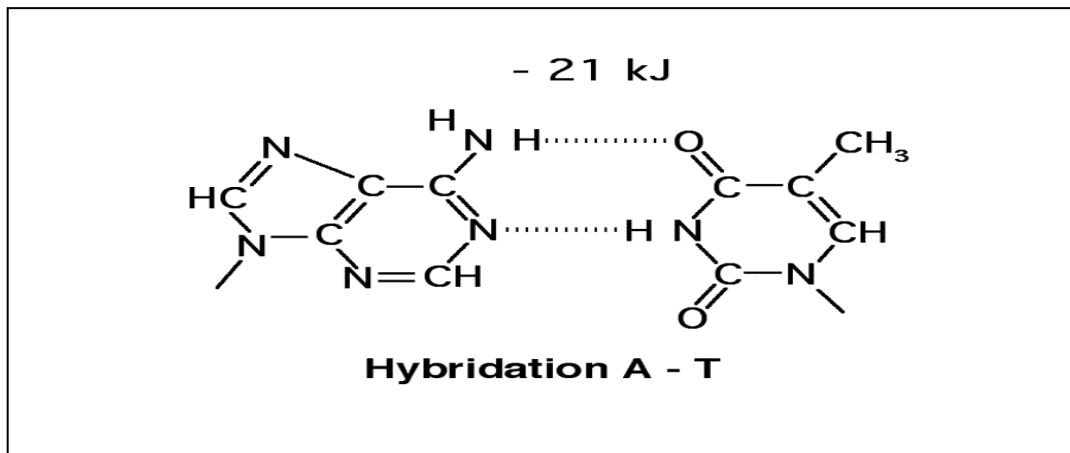
Les bases complémentaires situées face à face sont liées entre elles par des liaisons hydrogènes.

En face d'un groupement **NH<sub>2</sub>** d'une base purique se trouve un groupement **C=O** d'une base pyrimidique, et inversement en face d'un groupement **NH<sub>2</sub> d'une base pyrimidique** se trouve un groupement **C=O** d'une base purique.

Pour le couple Adénine Thymine, il ya deux liaisons hydrogène (figure 07) :

- 1 H entre 1 N (liaison covalente) et 1 O (liaison hydrogène) ;
- 1 H entre 1 N (liaison hydrogène) et 1 N (liaison covalente).

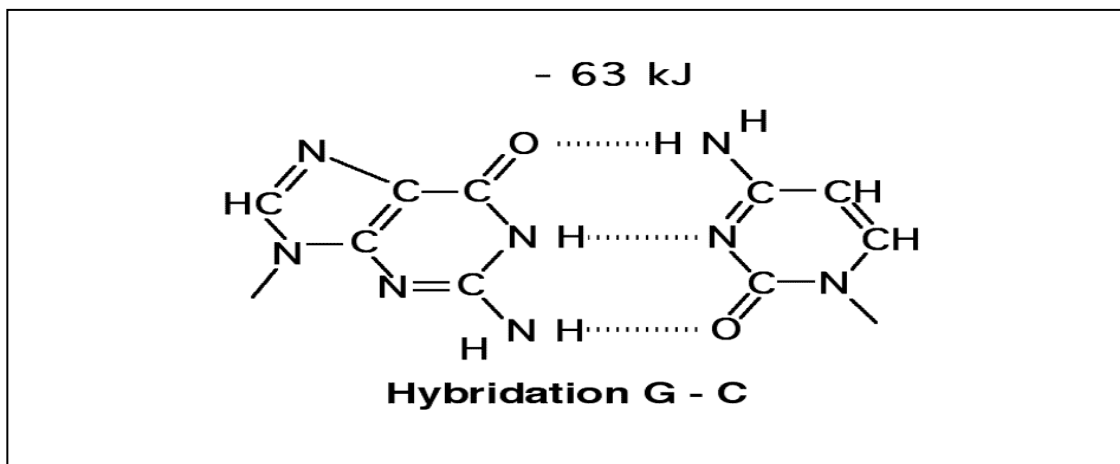




**Figure 07 :** Les deux liaisons hydrogènes du couple Adénine-Thymine

Pour le couple Cytosine- Guanine, il y a trois liaisons hydrogène (figure 08) :

- 1 H entre 1 O (liaison hydrogène) et 1 N (liaison covalente) ;
- 1 H entre 1 N (liaison covalente) et 1 N (liaison hydrogène) ;
- 1 H entre 1 N (liaison covalente) et 1 O (liaison hydrogène).



**Figure 08 :** Les deux liaisons hydrogènes du couple Cytosine-Guanine

### 1.2.2. 2. 1. 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) .La dénaturation et la renaturation des brins d'ADN en solution sont des reconstitutions critiques pour diverses fonctions biologiques normales (réplication; transcription ...etc.).

#### ➤ **La Solubilité**

L'ADN est un polyanion dont les sels de sodium sont solubles dans l'eau en formant solutions à viscosité élevée. Les alcools et en particulier l'éthanol, précipitent les molécules d'ADN sous forme agglomérats en longues fibres.

#### ➤ **La densité**

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**

La charge de ces molécules à pH physiologique est négative et directement proportionnelle à leur longueur (nb de nucléotides). Charge dont la contribution est uniquement due au groupement phosphates (à ce pH les bases ne portent aucune charge). Cette propriété est utilisée pour les séparer par électrophorèse.

#### ➤ **Propriétés spectrales**

- 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**.

### 1.2.2. 2. 2. Topoisomères de l'ADN :

Deux molécules d'ADN, ayant exactement la même séquence de bases, peuvent cependant différer entre elles par ce que l'on appelle le nombre d'enlacements, c'est-à-dire le nombre de tours que fait l'un des brins autour de l'autre.

On appelle alors « topoisomères » ces deux ADN différant uniquement par le nombre d'enlacements. Cependant, si les deux brins d'ADN sont circulaires ou linéaires avec leurs deux extrémités fixées, le nombre d'enlacements devient une constante qui ne peut plus varier.

Le changement du nombre de bp par tour, en un endroit d'une boucle de l'ADN, sera donc nécessairement compensé par un surenroulement opposé (c'est-à-dire positif ou négatif) en amont ou en aval de cet endroit.

#### **B. Différents états de topoisomères :**

##### **a. Etat relâché**

Dans l'état dit « relâché » la contrainte, ou la tension, sur la double hélice est minimale. C'est la configuration la plus stable de la molécule.

Les analyses physicochimiques effectuées sur des fibres cristallines d'ADN – B ont indiqué que cet état s'observait pour 10 bp par tour.

Dans les cellules, l'ADN a une conformation proche, mais l'état sans contrainte correspond en moyenne à 10,5 bp par tour de spire (Klug, prix Nobel de chimie 1982), au lieu de 10. Cette valeur peut varier sur de courtes distances en fonction de l'association de l'ADN à des protéines.

##### **b. Etat surenroulé**

L'axe de la double hélice peut s'enrouler sur lui-même en formant un nombre d'enlacement supérieur ou inférieur à la valeur de l'état relâché, (figure 9).

Deux formes de surenroulement (*supercoiling*) sont théoriquement possibles :

- Si le nombre de tours d'hélice est plus grand que la valeur standard correspondant à l'état relâché, l'ADN est dit **surenroulé positivement**.
- À l'inverse, il peut aussi avoir un nombre de tour d'hélices plus faible, il est alors désenroulé ou **surenroulé négativement**.

Pour relâcher la contrainte liée au surenroulement et ramener localement le nombre de paires de bases par tour aux alentours de la valeur standard  $\sim 10,5$ , l'ADN adopte alors une forme vrillée, en formant une superhélice (hélice formée par le double-brin sur lui-même, en plus de l'hélice formée par un brin autour de l'autre). Lorsque le surenroulement est positif, il forme une superhélice gauche et lorsque le surenroulement est négatif, il forme une superhélice droite. **Surenroulement négative = désenroulèrent.**

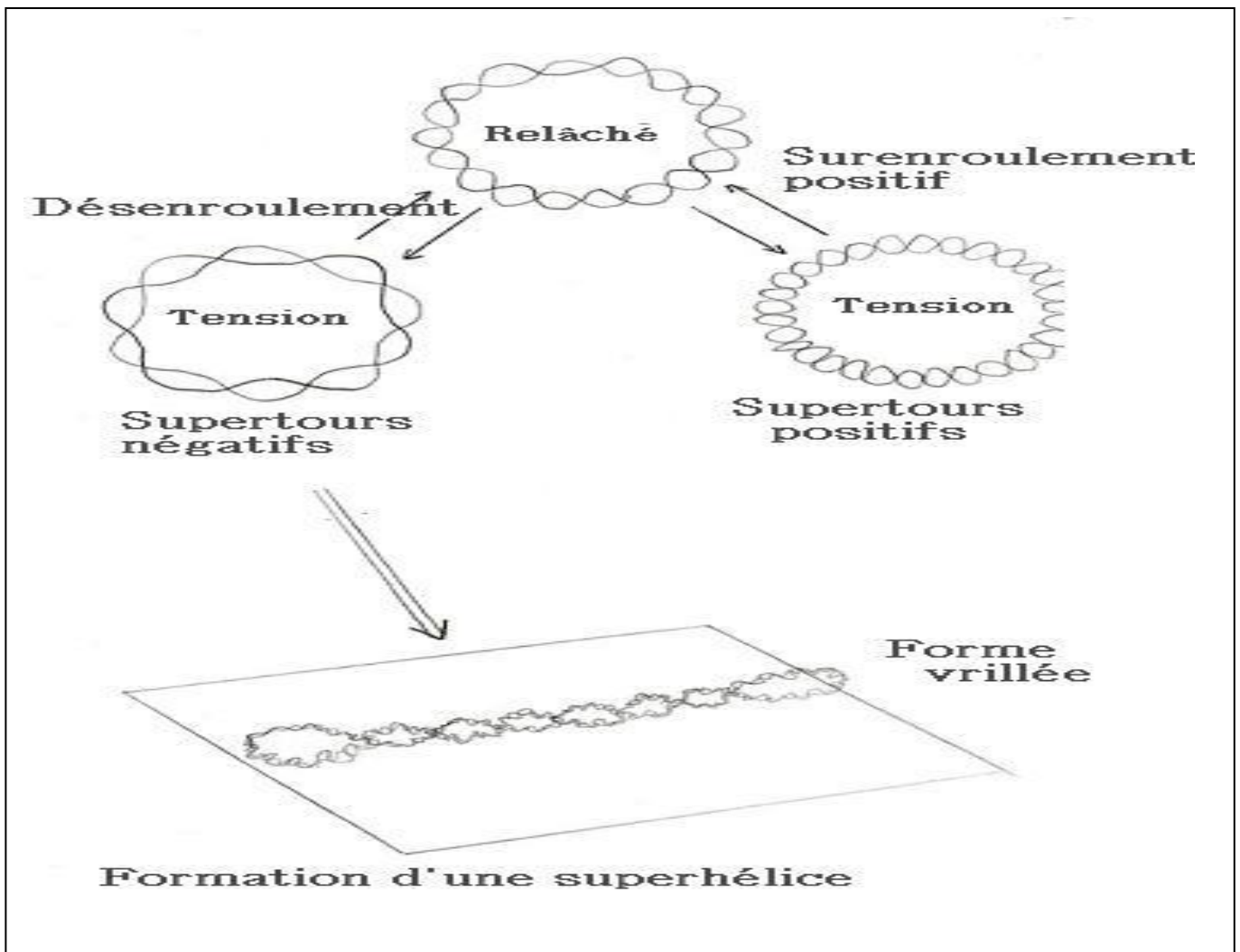


Figure 9 : surenroulement de l'ADN et différents états de topoisomères

La plupart des molécules d'ADN rencontrées dans la nature forment des Surenroulement négatifs (superhélices droites), par désenroulèrentd'environ un tour pour 200bp.Le Surenroulement exerce une contrainte sur la molécule. Cette contrainte provoque un vrillage et cela. Aussi bien avec un ADN surenroulé positivement que surenroulé négativement.

Les formes d'ADN surenroulées négativement présentent le double avantage d'être à la fois plus compactes, mais aussi plus accessibles aux enzymes de la transcription et de la réplication.

### ❖ **Tropoisomérasés**

Les topoisomérasés sont des enzymes qui modifient le nombre d'enlacements.Elles sont donc capables d'introduire ou d'éliminer des supertours dans une double hélice d'ADN.Pour modifier la topologie de l'ADN et permettre l'interconversion des différents topoisomères, il est nécessaire de couper puis de suturer au moins un des deux brins. Les enzymes qui permettent de réaliser ces conversions sont des topoisomérasés.

On distingue :

- Les **topoisomérasés I** qui coupent un seul brin de la molécule d'ADN et ont pour fonction de « relâcher » l'ADN en supprimant les surenroulements ;
- Et les **topoisomérasés II**, qui coupent les deux brins d'ADN pourdésenrouler l'ADN.
- Ainsi, chez la bactérie, **la gyrase** désenroule l'ADN, permettant une meilleure accessibilité des protéines à l'ADN au cours de la transcription ou de la réplication. Les inhibiteurs de cette gyrase sont donc logiquement des antibiotiques. Chez les eucaryotes, ces topoisomérasés II semblent surtout « démêler » les nœuds d'ADN.

### . **Les différentes variantes structurales de la molécule d'ADN :**

Il existe plusieurs formes d'ADN à double hélice droite, ADN –A, ADN B, etc

- Cette classification est fondée sur des critères physicochimiques.Ainsi ces types d'ADN différent légèrement par le diamètre de leur hélice il existe aussi des molécules d'ADN à hélice gauche (figure 10).

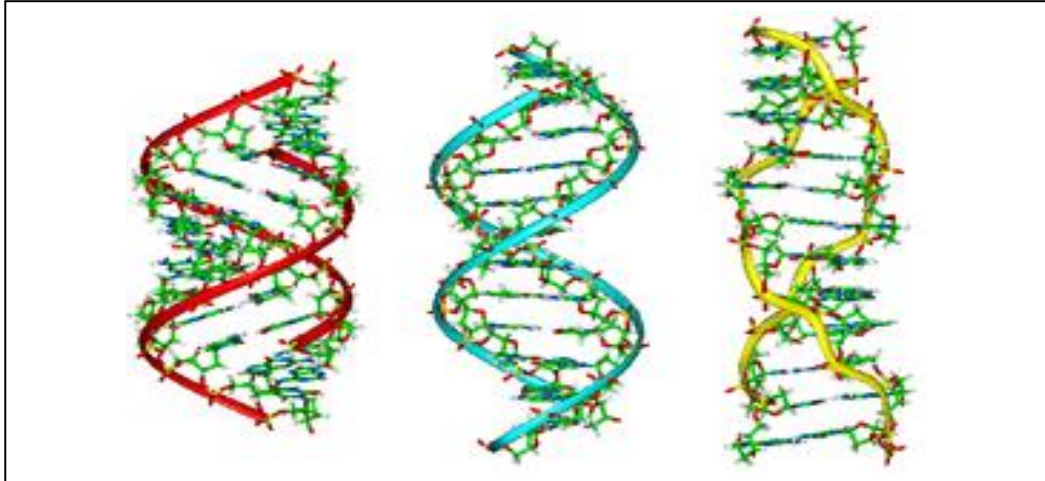


Figure 10 : Les ADN-A, B (hélices droites) et Z (hélices droites).

### 1. Les hélices droites

La forme structurale de la molécule de l'ADN **-B**, correspondant à la classique double hélice droite dont chacun des tours correspond à **10/10,5 bp**, a un pas de **3,4 nm** et un diamètre de **2,4 nm**. Il s'agit de la forme de double hélice la plus stable. En solution dépourvue d'eau, il a été obtenu une autre double hélice droite d'ADN appelée **ADN -A**, qui présente une forme plus condensée : Chacun des tours comprend **11 bp**, elle a un pas de **2,3 nm** et un diamètre **plus grand** que l'ADN-B.

### 2. Les hélices gauches

Découvert à la fin des années soixante-dix, l'ADN « **gauche** » ou **ADN-Z** a d'abord été une curiosité de laboratoire obtenue par synthèse. Rapidement, il est apparu que ces séquences pouvaient exister in vivo, jusque dans les chromosomes humains !

Cet ADN gauche n'est pas l'image en miroir de l'ADN droit. Il a une conformation différente :

- Le squelette sucre- phosphate est en **zigzag**, au lieu de former une spirale régulière comme l'ADN- B, d'où le nom d' **ADN-Z** qui lui a été donné ;

- L'ADN-Z forme une hélice plus **svelte** et moins **torsadée** que l'ADN-B. Il comporte **12 bp** par tour de spire, le pas de l'hélice est de **4,6 nm** et le diamètre de **1,8 nm** ;
- Les bases sont, comme pour l'ADN-B, situées à l'intérieur de la double hélice. Mais alors qu'elles sont parfaitement inaccessibles dans l'ADN-B, elles sont davantage exposées dans l'ADN-Z ;
- Une alternance de pyrimidines et de purines favorise la conformation ADN-Z , ainsi que la méthylation des cytosines.

## **1.2.2. Acide ribonucléique (ARN) :**

Les ARN sont des polymères de nucléotides, leur structure générale est très proche de celle des ADN, mais il faut noter 3 différences essentielles : L'ARN est monocaténaire, l'ose est le ribose et il n'y a pas de thymine dans la structure de l'ARN, elle est remplacée par l'uracile. Des molécules d'ARN sont constituées d'une seule chaîne polynucléotidique. Sauf chez certains virus, où des appariements par des doubles hélices peuvent s'établir entre A et U d'une part et entre G et C d'autre part, mais ces appariements se forment entre 2 bases de la même chaîne et n'ont aucun caractère de régularité contrairement à l'ADN.

### **1.2.2.1. Les différents ARN :**

La cellule comporte essentiellement 04 types d'ARN :

ARNr (ribosomique), ARNt (de transfert), ARNm (messenger) et ARNsn (smallnuclear).

Ce sont les ARNr qui sont les plus abondants (82%), suivis par le ARNt (16%) et les ARNm (~2%).

#### **A. ARN ribosomiques (ARNr) :**

Les ribosomes sont les particules nécessaires à la synthèse des protéines. Situés au niveau du cytosol, les ribosomes sont de véritables usines à protéines dans la cellule. Les ribosomes sont également trouvés au niveau des mitochondries. La cellule dont on le plus étudiés les ribosomes est E.coli.

- **Le ribosome des procaryotes :** A un coefficient de sédimentation de 70s (S pour Svedberg – l'unité Svedberg étant l'unité de mesure de la vitesse de sédimentation). Constitué de 2 sous unités, une sous unité à 50s et une sous unité de 30s (figure 11). Le coefficient de sédimentation de la particule dépend non seulement de sa masse mais aussi de sa forme.

La sous unité 30s contient un ARNr ayant un coefficient de 16s comportant 1542 nucléotides, et 21 r-protéines différentes. La sous unité 50s contient un ARNr de 5s ayant 120 nucléotides et un ARNr de 23s ayant 2904 nucléotides et 34 r-protéines.

- **Le ribosome des procaryotes :** Un peu plus gros et les 2 sous unités étant de 60s et 40s (figure 11), leur composition est légèrement différente, on trouve d'avantage de protéines et les ARNr sont un peu plus longs (on en trouve d'ailleurs quatre au lieu de trois : 18S dans la petite sous-unité ; 5S, 5,8S et 28S dans la grande) (figure 11).



Cette différence de constitution des ribosomes présente un intérêt considérable. Certains antibiotiques, qui agissent au niveau des ribosomes, auront ainsi une action spécifique sur les ribosomes bactériens sans léser nos propres ribosomes.

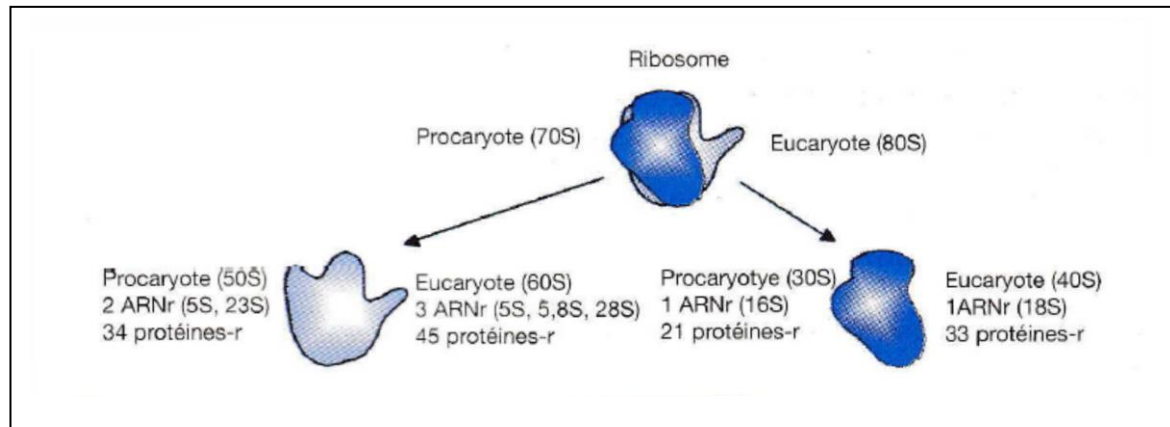


Figure 11 : Les ARNr et les r- protéines (J.Etienne et al., 1999)

#### ❖ Rôle des ARNr

Ils ont cependant des rôles :

- Structural, comme nous venons de le voir, puisqu'ils constituent en partie la matière d'un ribosome ;
- De facilitation de la fixation sur le ribosome des autres ARN(ARNt, ARNm)
- Dans la reconnaissance du site d'initiation de la traduction (AUG) sur le ARNm des bactéries : hybridation d'une séquence située à l'extrémité 3 de l'ARNr 16S avec une courte séquence (dite de shine- Dalgarno) située quelques nucléotides en amont d'AUG. Chez les eucaryotes, on ne sait pas encore si un ARNr reconnaît une séquence proche d'AUG ; nous verrons d'ailleurs que l'extrémité 5' cap de l'ARNm eucaryote doit tout d'abord être reconnue.

#### B. Les ARN de transfert (ARNt) :

Les ARNt sont ainsi appelés car ils vont transporter les acides aminés qui se trouvent dans le cytoplasme jusqu'au ribosome. Les ARNt possèdent la structure générale des ARN, ils sont formés par une seule chaîne d'environ de 73 à 93 nucléotides. Cependant, il existe certaines des caractéristiques propres aux ARNt :

\* Les nucléotides atypiques (inhabituels), un ARNt en contient. C'est ainsi que l'on trouvera l'hypoxanthine ou encore la thymine.

\* La forme spatiale des ARNt : La chaîne des ARNt se replie pour donner un aspect générale en forme d'un trèfle (figure 12), car les branches du trèfle se forment par des liaisons hydrogènes entre bases complémentaires, ce sont des courtes doubles hélices. Les boucles sont formées de nucléotides non appariés, on y trouve entre autres des nucléotides atypiques.

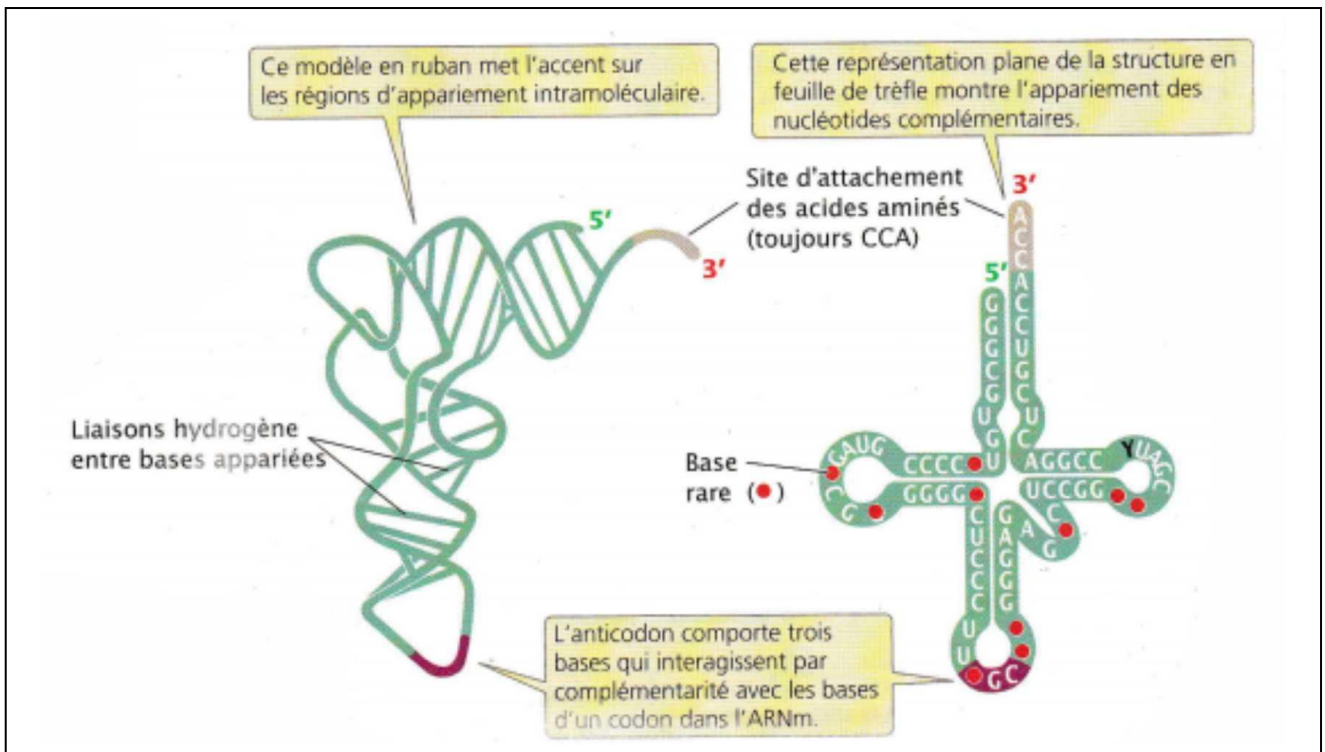


Figure12:Forme bidimensionnelle en trèfle et forme tridimensionnelle d'un ARNt(Raymond Cunin, 2012)

### ❖ Représentation schématique des ARNts :

Pour simplifier, nous allons utiliser une représentation encore plus schématique des ARNt. Etant donné que les ARNt et l'ARNm vont s'associer de façon anti-parallèle, nous prendrons la convention de toujours écrire l'ARNm dans le sens 5'→ 3' et l'ARNt dans le sens 3' →5' (de droite à gauche, figure 13).

\* Deux sites sont importants dans l'ARNt :

**L'extrémité 3'-OH :** L'extrémité3'-OH de tous les ARNts se terminent par les 3 nucléotides CCA ou CMP, CMP, AMP. C'est cette extrémité qui fixera l'acide aminé à transporter (figure 13).

**b. L'anticodon :** On appelle anticodon un groupe de trois nucléotides (on dit un triple de nucléotides) situé sur une boucle de l'ARNt.

Cet anticodon joue un rôle très important car il reconnaîtra le codon, groupe de trois nucléotides situé sur l'ARNm. Cet appariement codon-anticodon se fait avec des liaisons faibles (liaisons hydrogènes) de manière antiparallèle et complémentaire entre les bases du codon et de l'anticodon.

Puisqu'il existe quatre bases différentes et qu'un codon ou un anticodon est formé de trois nucléotides, il existe  $4^3$  soit 64 possibilités différentes de codons ou d'anticodons. Les protéines sont composées de vingt acides aminés différents. On peut donc en déduire que le nombre d'ARNt différent est compris entre ces deux chiffres. Ce nombre est supérieur à vingt et donc plusieurs ARNt ayant des anticodons différents peuvent transporter qu'un seul acide aminé.

Ce nombre est cependant inférieur à soixante-quatre car certains codons ne sont pas reconnus par des ARNt (codons stop) et certains ARNt ou plutôt leur anticodon est capable de reconnaître plusieurs codons.

❖ **La liaison ARNt- acide aminé (aa-ARNt) :**

**a. Nature et synthèse de la liaison aa- ARNt**

L'ARNt apporte son acide aminé au ribosome après l'avoir accroché par une liaison covalente. Il s'agit d'une liaison ester. Cette liaison s'effectue par élimination d'une molécule d'eau entre une fonction acide apportée ici par l'acide aminé et une fonction alcool apportée ici par l'ARNt et correspondant à l'OH fixé au carbone C2 ou C3 du ribose du dernier nucléotide de l'ARNt, qui est un nucléotide AMP. La réaction d'estérification se fait en 2 étapes :

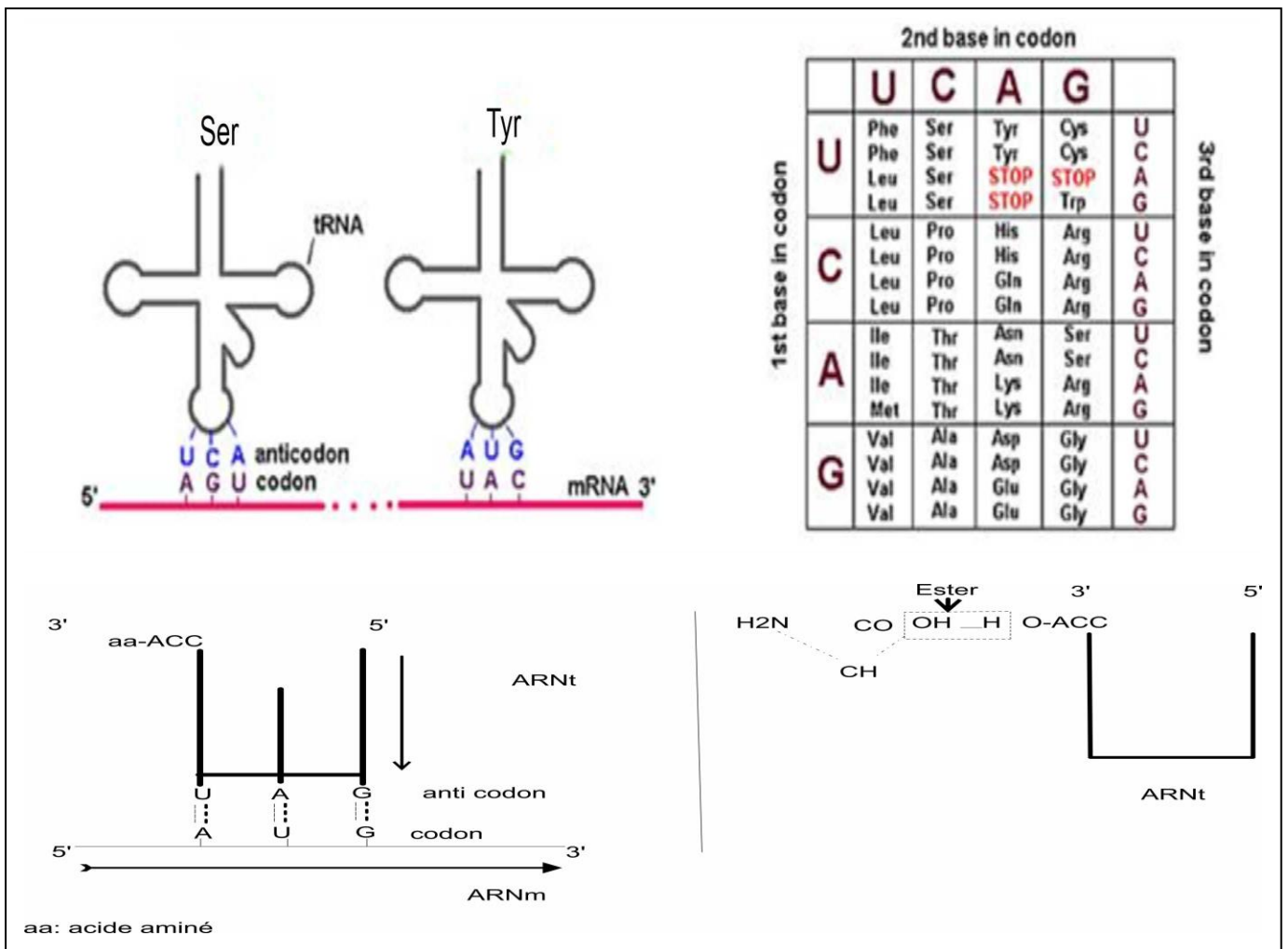
**1<sup>er</sup> étape :** accrochage de l'acide aminé sur l'AMP. Cette étape est appelée activation de l'acide aminé. Elle aboutit à la formation d'un aminoacyl- AMP (aa- AMP). La liaison entre l'acide aminé et l'AMP est une liaison anhydride d'acide, riche en énergie ;

**2<sup>e</sup> étape :** transfert de l'acide aminé sur l'ARNt. Ceci aboutit à la formation de l' aminoacyl-ARNt : (aa- ARNt) (figure 13).

Il s'agit maintenant d'une liaison ester entre l'aa et la fonction alcool du ribose porté par le dernier nucléotide de l'ARNt, c'est-à-dire par l'AMP.

L'OH du ribose participant à cette liaison ester peut être soit l'OH en 2 ; soit l'OH en 3 ; Une fois la liaison constituée, le groupement aminoacyl peut « sauter » entre position 2 et 3.

La liaison ester aa- ARNt est riche en énergie. Ainsi, les différents ARNt apporteront non seulement les acides aminés mais également l'énergie nécessaire à l'accrochage des aa les uns aux autres au moment de la synthèse protéique.



**Figure 13 :** l'anticodon est complémentaire et antiparallèle au codon, l'acide aminé est porté à l'extrémité 3 d'un ARNt et la liaison ester ARNt- acide aminé (aa-ARNt)(Site internet,modifiée)

**b. L' aminoacyl- ARNt synthétase**

La liaison entre un ARNt et son acide aminé n'est pas le fruit du hasard.

L'appariement entre ces ARNt et leurs acides aminés correspondants est réalisé par enzyme appelée aminoacyl- ARNt synthétase.

Cette enzyme reconnaît à la fois :

- Le « bon acide aminé » et d'autre part ;
- Le « bon ARNt » correspondant.

C'est sur cette enzyme que se produisent successivement :

- L'activation de l'acide aminé en aa- AMP ;
- La liaison de l'acide aminé activé à l'ARN pour donner finalement l' aminoacyl- ARNt.
- L' aminoacyl- ARNt synthétases accueille donc acide aminé, ATP, ARNt et toutes les réactions précédemment citées pourront s'effectuer au niveau de l'enzyme.

➤ **L'aa- ARNt synthétase reconnaît l'acide aminé.**

Les aminoacyl – ARNt synthétases sont des enzymes très spécifiques. Il existe en effet vingt enzymes différentes qui reconnaissent chacune un acide aminé et un seul.

Si par hasard le mauvais acide aminé se fixe sur l'aa- ARNt synthétase, l'aa –AMP est formé mais sera détruit par l'enzyme avant sa fixation sur l'ARNt.

➤ **L'aa –ARNt synthétase reconnaît l'ARNt**

Comme tous les ARNt ont une structure voisine donc chaque ARNt contient des éléments structuraux qui lui sont propres et permettent sa reconnaissance par l'une des vingt aa– ARNt synthétases différentes. On distingue essentiellement deux cas :

- L'élément de reconnaissance est l'anticodon. Ainsi pour ARNt - Met, l'anticodon **3' UAC 5'** est un élément majeur (si ce n'est le seul) de reconnaissance pour la méthionyl-ARNt synthétase ;
- L'élément de reconnaissance est une paire de bases. Pour d'autre ARNt, l'anticodon ne paraît pas jouer un rôle important dans la reconnaissance par l'aa –ARNt synthétase. C'est alors une paire de bases spécifique située aux extrémités de l'ARNt, qui assure la reconnaissance.

❖ **Les ARNt supprimeurs :**

Sont des ARNt capables de supprimer l'effet de certaines mutations (Une mutation ayant engendré un codon stop ou touchant l'anticodon du gène d'un ARNt). Ils ont été particulièrement étudiés chez E. coli, et la levure (mais ont été également identifiés chez les mammifères).

**C. ARN messenger (ARNm) :**

On appelle messagers ce type d'ARN car il porte une partie de l'information génétiques contenue au niveau de l'ADN jusqu'au ribosome où s'effectuera la synthèse des protéines. La durée de vie des ARNm est très courte, elle s'oppose à celle des ARNt qui est plus longue. Chez les bactéries, la durée de vie d'un ARNm est de quelques minutes, chez les eucaryotes les ARNm sont plus stables (quelques minutes à quelques jours).

Comme les autres ARNs, l'ARNm est formé d'une seule chaîne de nucléotides comprenant le même type de bases (ACGU). Mais où sont-ils donc les messages que les ARNm sont sensés contenir ?

Ce sont de nucléotides, et plus précisément la séquence des bases qui constituent en fait un message sous la forme d'un code. Chaque groupe de 3 nucléotides sur l'ARNm forme un codon, chaque codon codera pour un acide aminé bien particulier. Le décodage du message porté par l'ARNm se fera au niveau du ribosome, c'est ainsi que le codon AUG codera pour l'accrochage d'une méthionine la chaîne protéique en voie de synthèse, et que le codon UUU signifiera accrochage du phénylalanine.

**D. Autre petits ARN**

A côté des ARN codants (ARNm) et des ARN non codants impliqués dans la machinerie de synthèse des protéines (ARNr et ARNt), il existe plusieurs petits ARN non codants.

➤ **ARNsn**

Les plus connus sont les ARNsn, qui, associés à des protéines, assurent l'épissage des introns, qui suit la transcription d'un gène. Ainsi l'information génétique discontinue dans le gène deviendra continue dans l'ARNm. Ces ARNsn sont situés dans le noyau des cellules.

➤ **ARNsno**

Ces petits ARN localisés dans le nucléole, une région particulière du noyau ou sont synthétisés les ARNr, mais aussi les ARNsn. Ces petits ARNsno participent à leur synthèse.

➤ **ARNmi**

Enfin, il a été découvert des ARN non codants, appelés microARN. Ces ARNmi s'hybrident de façon complémentaire avec les ARNm et favorisent leur dégradation ou du moins leur inactivité. Ces ARN pourraient mettre en jeu la machinerie de l'ARN interférence.