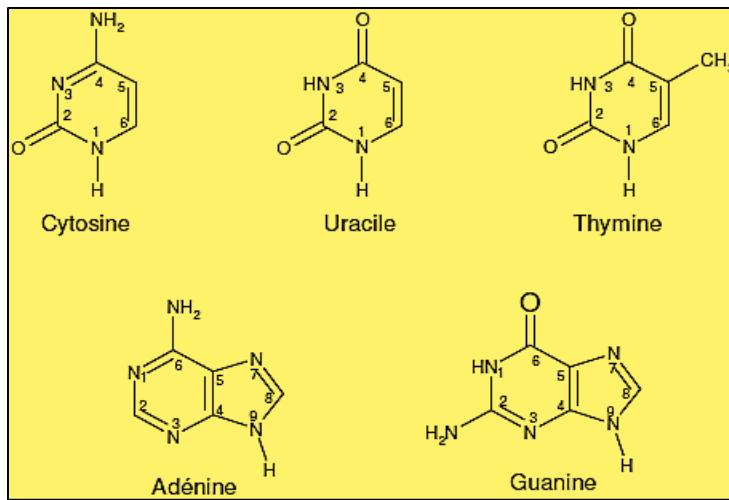


I- Généralités sur les acides nucléiques

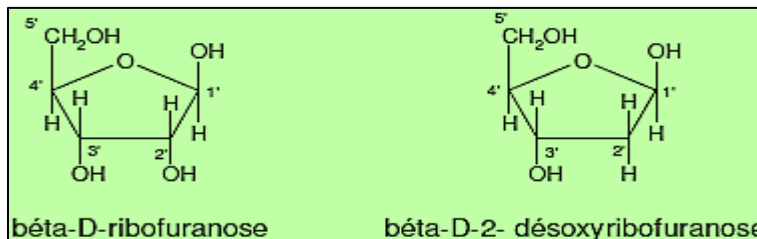
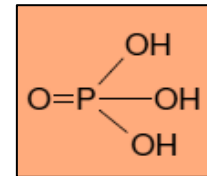
1- Définition

Les acides nucléiques sont des polymères formés par l'association de plusieurs nucléotides. Chaque nucléotide est constitué lui-même d'une base hétérocyclique purique (A et G) ou pyrimidique (C, U, T), 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).



Structure chimique des principales bases nucléiques

L'acide phosphorique

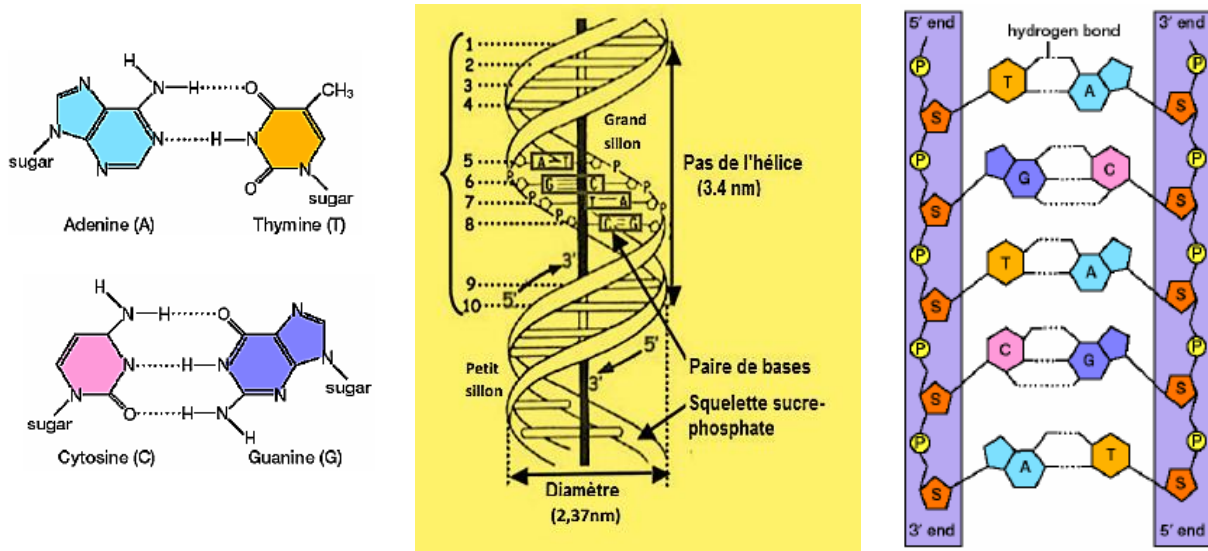


Structure chimique du ribose et du désoxyribose

4-Structure de l'ADN

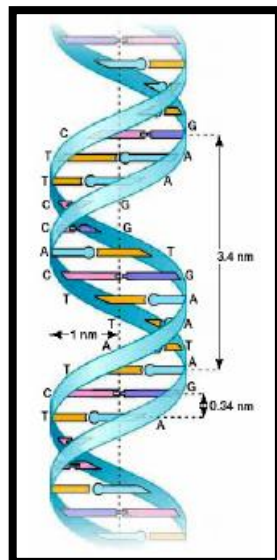
- Les acides désoxyribonucléiques sont de très grandes molécules composées de deux chaînes polynucléotidiques enroulées l'une autour de l'autre pour former une double hélice régulière. Dans l'ADN normal, un tour complet d'hélice contient environ 10 paires de bases. (**Hélicoïdales**)

- Les deux chaînes d'ADN sont maintenues l'une attachée à l'autre grâce à la complémentarité de leurs bases. (A) s'apparie à (T) par deux liaisons hydrogène, et (G) s'apparie à (C) par trois liaisons hydrogène (**Complémentaires**).
- Les deux brins nucléotidiques sont parallèles mais dans des directions opposées (**Antiparallèles**).



La stabilisation de la double hélice s'effectue par des liaisons chimiques faible 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).



2- Propriétés physico-chimiques de l'ADN

2-1- Propriétés chimiques

2-1-1-Solubilité

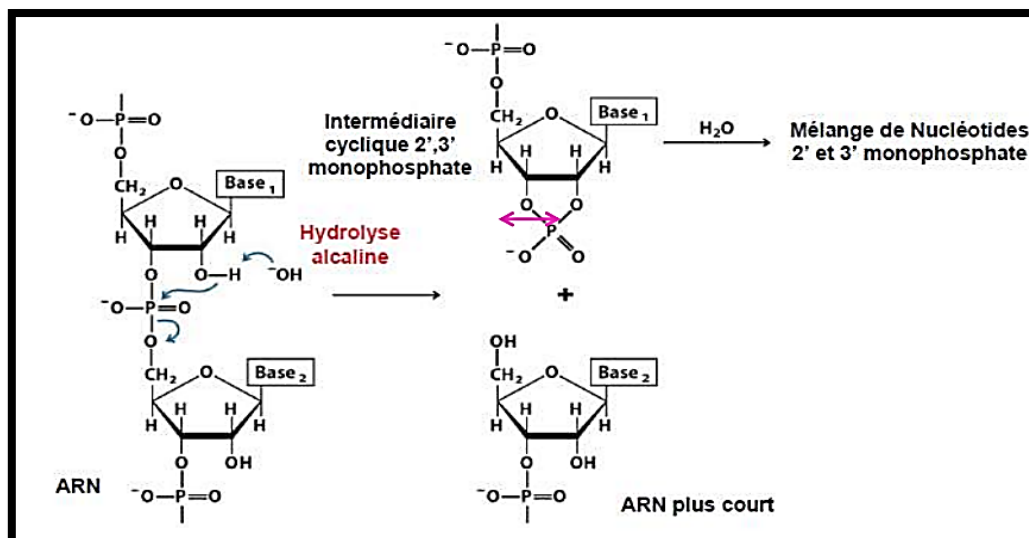
Les acides nucléiques sont considérés comme des macromolécules chargés négativement en raison des groupements phosphate ionisés, ce qui les rend solubles dans l'eau sous forme de sels de sodium constituant ainsi des solutions aqueuses avec une viscosité élevée.

Cependant les acides nucléiques se précipitent dans l'éthanol en présence de sel de sodium (neutralise charges -).

2-1-2- Hydrolyse

2-1-2-2- Hydrolyse Alcaline

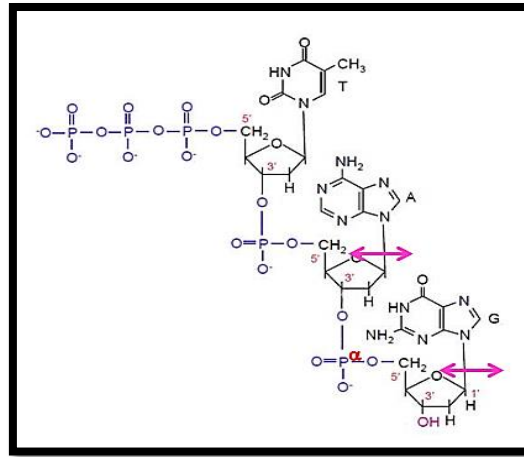
Le traitement acide de l'ARN (pH=11 ; 37°C) provoque une hydrolyse rapide et totale cela est due à la présence du 2'OH libre sur le ribose. Cependant l'ADN est résistant à ce traitement (absence du 2'OH désoxyribose).



Hydrolyse Acide de l'ADN

2-1-2-1- Hydrolyse Acide

Le traitement acide de l'ADN (HCl à faible concentration) provoque le clivage de la liaison N-osidique Entre les purines (N₉) et le 2'désoxyribose (C_{1'}) ce qui induit la formation d'une molécule ADN dépourvu de purines (ADN apurique). Mais l'ARN est résistant au traitement acide.

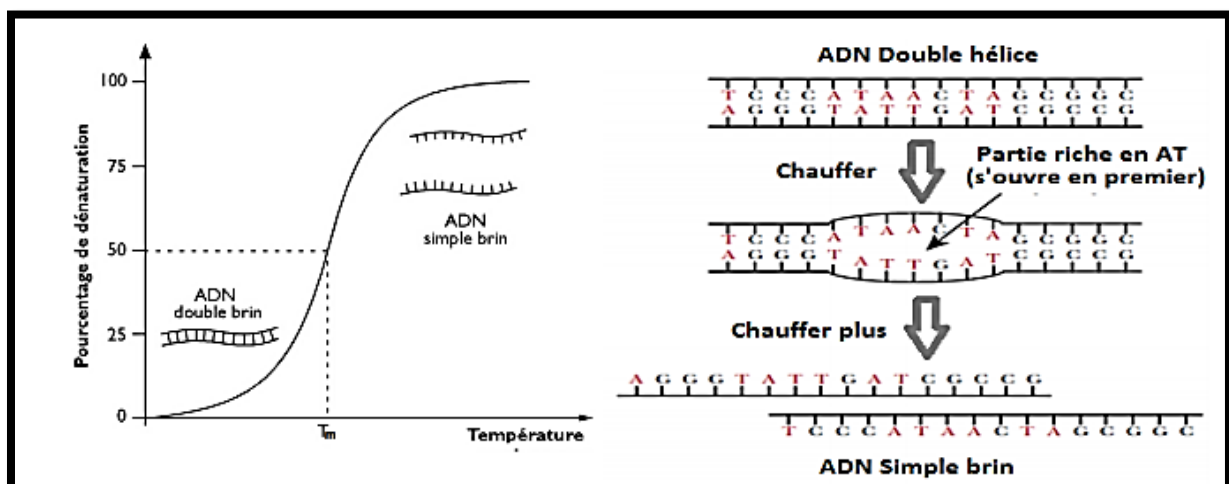


Hydrolyse Acide de l'ADN

2-2- Propriétés physiques

2-2-1- Température de fusion

Les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes qui maintiennent la structure en double hélice sont des forces faibles. Des quantités relativement petites d'énergie peuvent séparer les deux brins induisant un processus de dénaturation. La dénaturation et la renaturation des brins d'ADN en solution sont des reconstitutions critiques pour diverses fonctions biologiques normales (réplication ; transcription ...etc.). 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) qui désigne la température de parvenir la séparation de 50% des deux brins d'ADN (Fig. 1).



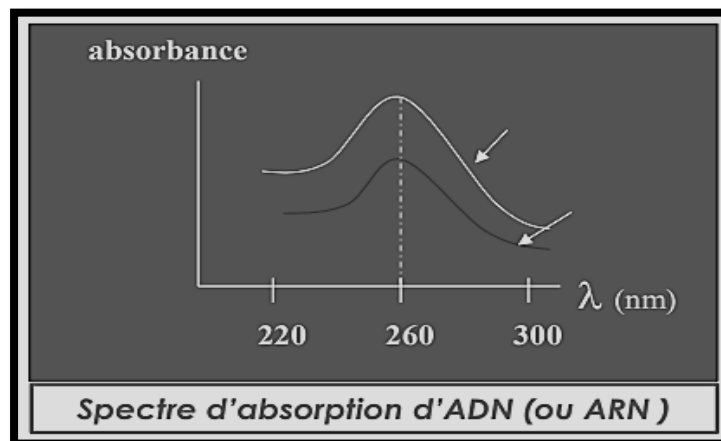
Séparation des brins d'ADN en fonction de la température.

NB :

- Les régions riches en A et T s'ouvrent plus rapidement à celles riches en C et G.
- La T_m augmente avec l'augmentation du pourcentage des C et G

2-3- Absorption de la lumière ultraviolette

Les purines et pyrimidines qui entre dans la composition des acides nucléiques (ADN et l'ARN) Absorbent dans les UV avec un maximum à 260 nm. (Fig. 2).



Cette propriété d'absorption permet de doser la concentration des acides nucléiques.

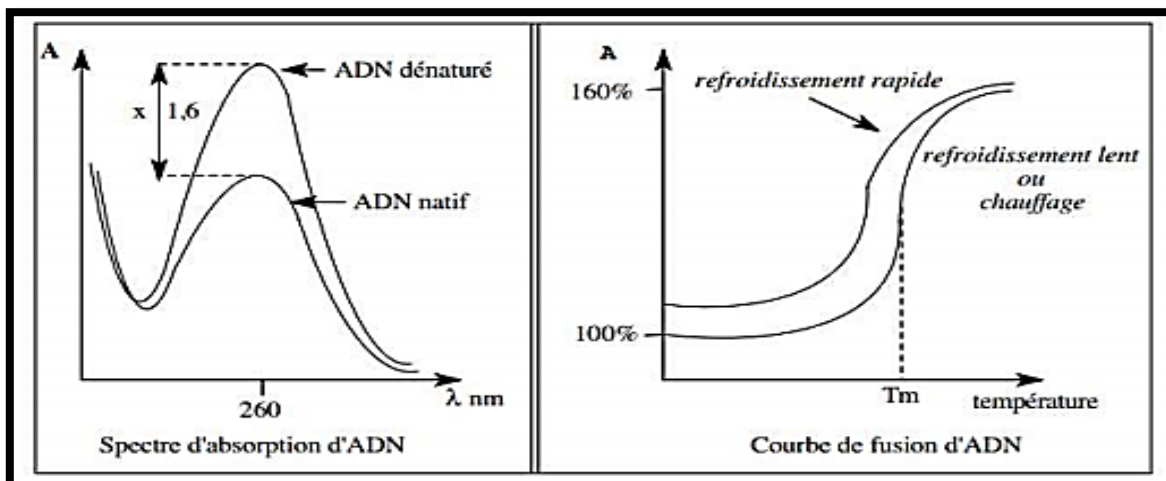
$$C = A_{260} \times DF \times 100 \text{ (unité : } \mu\text{g}/\mu\text{l ou A : Absorbance a 260 nm, DF : facteur de dilution)}$$

Cependant, la capacité des protéines à absorber la lumière ultraviolette à 280 nm permet d'estimer la contamination par les protéines lors de la purification des acides nucléiques.

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

2-3-1- Effet hyperchrome

Les bases sont plus accessibles à la lumière UV après dénaturation



Extraction et purification des acides nucléiques

3- Extraction des acides nucléiques

L'extraction et la purification des acides nucléiques contenus dans des cellules eucaryotes ou procaryotes sont essentielles pour un grand nombre d'études en biologie moléculaire.

Il existe quatre étapes principales pour extraire les acides nucléiques et les purifier :

1. La lyse cellulaire
2. La dénaturation des protéines et des complexes nucléoprotéiques
3. L'inactivation des nucléases et La purification des acides nucléiques (ADN ou ARN) (séparation de l'acide nucléique souhaité des débris cellulaires)

1- Lyse cellulaire

La procédure de lyse idéale doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ, mais également suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible. Il existe différentes procédures de lyse cellulaire :

1-1- Lyse mécanique (Broyage ou lyse hypotonique)

Cette méthode est particulièrement préconisée lors des extractions à partir des cellules sans paroi. Il est également possible d'utiliser cette méthode sur des cellules procaryotes ou des levures en ajoutant des microbilles ou du sable (de fontainebleau, qui contient 95% de silice) pour faciliter la destruction des parois. Néanmoins, ce procédé est de plus en plus délaissé.

1-2- Traitement chimique et enzymatique

Le traitement chimique et enzymatique implique l'utilisation de détergents, d'agents chaotropiques, la protéinase K..., il se fait en plusieurs étapes :

1-3- Lyse des parois et membranes cellulaires

Pour les cellules à paroi, on peut utiliser des hydrolases spécifiques comme le lysozyme pour fragiliser la paroi. En effet les lysozymes coupent les liaisons glycosidiques $\beta(1-4)$ de l'acide N-acetylmuramique (NAM) et la N-actylglycosamine (NAG) du polysaccharide où alterne NAM et NAG constituant les peptidoglycanes de la paroi bactérienne.

Afin de désorganiser les membranes, on utilise le plus souvent des détergents comme le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), le triton X100 et le sarcosyl qui solubilisent les lipides membranaires sous forme de micelles. Cela permet de créer des pores membranaires suffisamment larges pour libérer le contenu du cytoplasme hors des cellules. Suivant leur force, les détergents vont aussi plus ou moins dénaturer les protéines membranaires.

2- Dénaturation des protéines

La déprotéinisation des extraits cellulaires peut se faire par plusieurs procédés :

2-1- Dénaturation par hydrolyse enzymatique

On utilise le plus souvent une endoprotéase non spécifique comme la protéinase K, active jusqu'à 65°C. Cette digestion est souvent conduite en présence d'un détergent dénaturant comme le SDS, qui facilite l'action de la protéinase K car il déploie les chaînes protéiques.

2-2- Précipitation des protéines en utilisant un agent chaotrope

Un agent chaotrope est un ion qui modifie la solubilité des molécules (protéines ou acides nucléiques) et qui peut provoquer leur précipitation en neutralisant certaines charges ioniques requises en surface. Il peut également agir en interférant dans les interactions que les protéines établissent avec l'eau ce qui modifie la solubilité des protéines. Ou en dénaturant les protéines par exemple, par rupture des liaisons hydrogènes qui maintiennent leur structure tertiaire entraînant ainsi le démasquage des régions hydrophobes. Les régions hydrophobes ont tendance à s'agréger et les protéines précipitent (défécation). Exemples des agents chaotropes : L'anion chlorate (ClO_3^-), le Thiocyanate (SCN^-), I^- , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , et Ba^{2+} , le perchlorate de sodium (NaClO_4), le thiocyanate de guanidine (TCG), l'iodure de sodium (NaI) et le chlorure de lithium).

3- Autres composants des solutions d'extraction

En fonction des protocoles d'extraction d'autres composés peuvent être rencontrés dans les solutions d'extraction :

3-1- Les thiols

Les thiols sont des composés soufrés pouvant être considérés en tant qu'analogues des alcools, car ils sont obtenus par remplacement de l'atome d'oxygène du groupe hydroxyle, $-\text{OH}$, d'un alcool par un atome de soufre. Le groupe fonctionnel ainsi obtenu est nommé mercapto, $-\text{SH}$. Lorsqu'on utilise les agents chaotropes pour éliminer les protéines par précipitation, on ajoute quelque fois dans le tampon d'extraction des thiols pour empêcher la reformation de ponts disulfures des protéines qui restent ainsi à l'état dénaturé.

3-2- Les sels

L'ajout d'une forte concentration de sels (NaCl 0,15 mol/L ; citrate de sodium ; acétate de sodium) dans le milieu d'extraction ne contenant pas d'agents chaotropes empêche la séparation des deux brins de l'ADN en formant un écran protecteur pour la double hélice.

3-3- EDTA

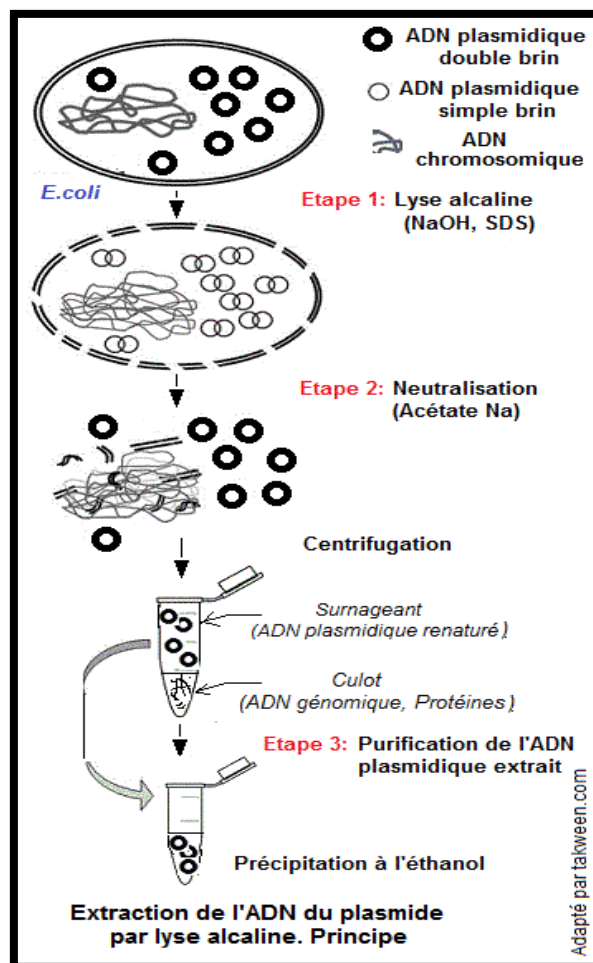
L'Éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) est un chélateur d'ions divalents comme le magnésium qui est un cofacteur des DNases et RNases. il permet la préservation des acides nucléiques par inhibition des nucléases .

3-4- RNase

Les extraits acellulaires bruts contiennent les deux types d'acides nucléiques : ADN et ARN. Pour diminuer la concentration en ARN, on utilise une RNase « DNase free », c'est-à-dire dépourvue d'activité DNase ; pour cela les DNases contaminant éventuellement les préparations de RNase du commerce sont dénaturées par chauffage (par exemple 5 min à 100°C). La RNase est une enzyme particulièrement thermostable qui résiste à ce traitement. La RNase peut être ajoutée dès le début de l'extraction-purification car c'est une enzyme très stable.

4- Élimination des débris cellulaires

Après la lyse cellulaire et l'inactivation des nucléases, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtration ou centrifugation.



4- Purification des acides nucléiques

La purification des acides nucléiques à partir d'extraits cellulaires est généralement réalisée par la combinaison entre deux ou plusieurs techniques des techniques suivantes :

- Extraction et précipitation
- Chromatographie et séparation par affinité.
- Centrifugation

4-1- Extraction / Précipitation

L'extraction par solvants est souvent utilisée pour éliminer les contaminants de la préparation d'acides nucléiques. Ainsi plusieurs méthodes de précipitation des acides nucléiques peuvent être utilisés pour les purifier

4-1-1- Purification au phénol-chloroforme

Une combinaison de *phénol et de chloroforme* sert fréquemment à purifier les acides nucléiques et d'éliminer les protéines. On mélange vigoureusement l'extrait d'acides nucléiques avec une phase hydrophobe. Après centrifugation, on récupère la phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques.

4-1-2- La précipitation par l'isopropanol ou l'éthanol

Ces techniques sont utilisées pour concentrer les acides nucléiques.

4-1-2-1- La précipitation par l'éthanol :

Est réalisée par addition de l'éthanol (un solvant moins polaire que l'eau) à l'extrait d'acides nucléiques (**v:v / 2:1**). Après refroidissement de l'échantillon, le culot d'ADN est obtenu suite à une centrifugation à une très grande vitesse. Le précipité est lavé avec de l'éthanol à 70 % pour se débarrasser des sels qui puis sécher. Le séchage est obligatoire pour éliminer l'éthanol qui pourrait empêcher la dissolution ultérieure du précipité.

NB :

- ✓ Avant l'ajout de l'éthanol, il faut ajouter à l'extrait d'acides nucléiques, une quantité importante de cations.
- ✓ Si la quantité d'acides nucléiques cibles est faible, un véhicule inerte (*le glycogène*) peut être ajouté au mélange afin d'accroître l'efficacité de la précipitation.

4-1-2-2- La précipitation par l'*isopropanol*

Le principe est le même que précédemment sauf que le sel n'est pas nécessaire et que les petits fragments d'ADN sont éliminés (non précipités). Dans ce cas, on procède à mélanges volume de l'*isopropanol* à volume identique de l'extrait nucléiques (**v:v / 1:1**) . Après refroidissement et centrifugation le précipité est lavé pour éliminer les traces d'*isopropanol* puis séché. On obtient alors les acides nucléiques sous la forme de fibres solides que l'on récupère par centrifugation

4-2- Chromatographie

Plusieurs méthodes chromatographiques peuvent être utiliser telles que la filtration sur gel, chromatographie échangeuse d'ions, l'adsorption sélective ou la liaison par affinité. Mais les deux techniques les plus employées pour purifier les acides nucléiques sont la chromatographie sur colonne de silice et la chromatographie sur colonne d'échange d'anions.

4-3- Centrifugation

La centrifugation sélective est une méthode de purification puissante. À titre d'exemple, l'ultracentrifugation isopycnique en gradients de chlorure de césium (CsCl) à des forces gravitationnelles élevées, a été longtemps utilisée pour la purification de plasmides.

5- Contrôle de la pureté de l'ADN extrait

Le maximum d'absorption des acides nucléiques se situe à 260 nm. Les protéines, principaux contaminant des préparations absorbent aussi à 260 nm, mais avec maximum d'absorption qui se situe vers 280 nm à cause des acides aminés aromatiques.

Le rapport $R = A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ constitue alors un bon moyen pour apprécier une éventuelle contamination de la préparation d'ADN par les protéines ou par les ARN. Une contamination par les ARN se traduit par une augmentation du rapport R.

$$R = A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$$

$$\text{ADN pur : } 1,8 < R < 2$$

$$\text{ADN contaminé par les protéines : } R < 1,7$$

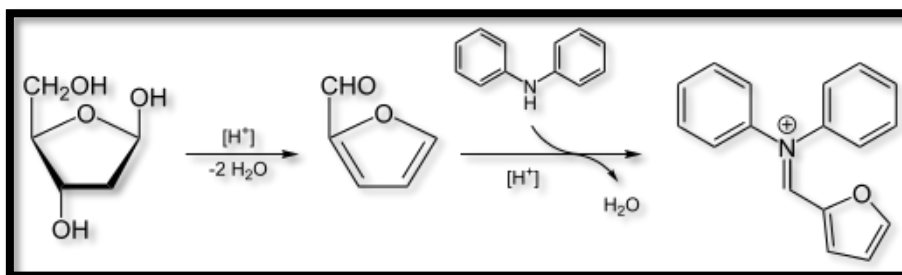
$$\text{ADN contaminé par les ARN : } R > 2$$

En absence d'impuretés l'absorbance de la solution d'ADN à 320 nm doit être autour de zéro.

Méthodes de quantification de l'ADN

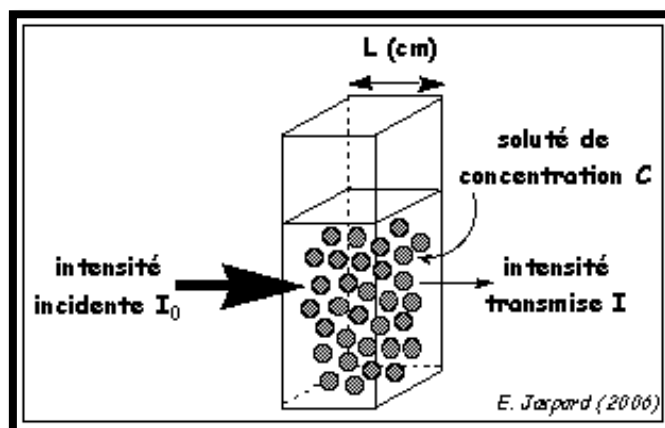
1- Dosage colorimétrique de l'ADN

Il est basé sur la réaction spécifique des 2-désoxypentoses avec la diphénylamine. En milieu acide à chaud, le 2-désoxyribose des nucléotides puriques peut être libérés et former un composé bleu dont le maximum d'absorption se situe à 595 nm. C'est la méthode classique pour mesurer des quantités importantes d'ADN (de l'ordre de quelques milligrammes).



2- Dosage par absorption U.V. de la concentration en ADN

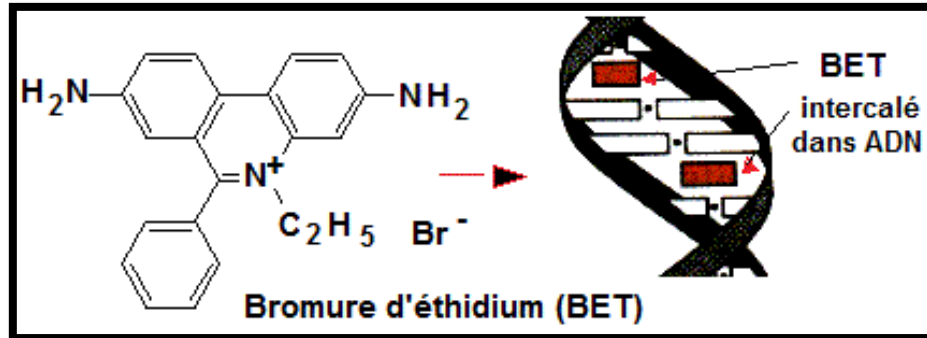
A 260 nm avec un trajet optique de 1 cm, une unité d'absorbance correspond à une concentration d'ADN double brin de 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Une unité d'absorbance correspond à 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de l'ARN ou d'ADN simple brin. Malheureusement, cette méthode est peu sensible pour manipuler des concentrations d'ADN inférieures à 250 ng/ml



3- Dosage de l'ADN par fluorescence en présence de BET

Le Bromure d'Ethidium (BET) interagit avec l'ADN en s'y intercalant et une fois intercalé, le rendement de fluorescence du colorant devient cent fois plus important. Le principe de la quantification consiste à comparer à l'oeil nu (estimation), ou mieux après photographie, l'intensité de la fluorescence émise par l'ADN sur un gel d'électrophorèse. La quantification

exacte consiste alors à établir une courbe d'étalonnage donnant l'intensité de fluorescence d'une solution de BET à laquelle on ajoute des quantités croissantes de DNA de concentration connue. (Gamme d'étalonnage). Par cette méthode on peut déceler des quantités de DNA de l'ordre de 50 ng/ml.



4- Dosage fluorimétrique classique de l'ADN

On utilise un spectrofluorimètre pour mesurer l'intensité de la fluorescence d'une solution d'ADN en présence d'un excès de BET. On compare ensuite les valeurs de ces intensités avec celle d'une solution d'ADN standard (courbe standard). Le BET peut être remplacé par un autre colorant pour augmenter la sensibilité de la mesure. Cette méthode permet de mesurer des quantités d'ADN de l'ordre de quelques picogrammes.