

TD 1: Biologie moléculaire

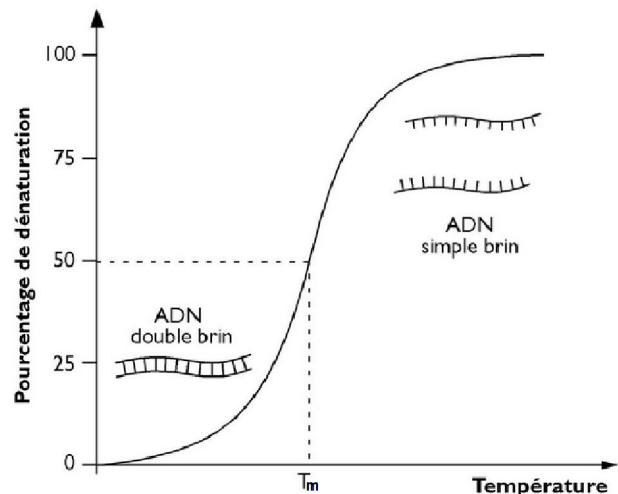
La dénaturation de l'ADN

- Les deux brins de l'hélice d'ADN sont reliés par des liaisons hydrogènes. Ces dernières, faibles, sont susceptibles d'être rompues par une simple élévation de la température du milieu extérieur.
 - lorsque les deux brins se séparent : on parle de **la 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 à 260nm (la longueur d'onde d'absorption maximale des bases puriques et pyrimidiques).
 - L'ADN sous forme bicaténaire absorbe modérément la lumière ultraviolette alors que la forme monocaténaire l'absorbe plus fortement en raison du démasquage des bases, conséquence de la dénaturation.
 - La température qui provoque la dénaturation de la moitié des molécules d'ADN est appelée température de fusion **Tm (melting temperature)**.

La T_m d'un ADN double brin dépend de :

- de sa taille
 - de sa composition en bases. Plus il est riche en bases GC, plus la Tm est élevée (les bases G et C sont appariées par 3 liaisons hydrogènes)

Pour les petites séquences comme les amorces (17 à 31) : $T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$



La concentration de l'ADN

On peut doser des solutions d'acides nucléiques purs en mesurant leur absorbance en UV à 260nm. Une DO de 1 correspond approximativement à 50 μ g/ml d'ADN double brin.

La pureté

On peut également avoir une information quant à la pureté de l'échantillon testé. En effet, l'ADN absorbe environ 2 fois moins à 280nm qu'à 260nm ($A_{260}/A_{280}=2$). La présence de protéines (les acides aminés aromatiques absorbent à 280nm) dans l'échantillon entraîne une diminution de ce rapport.

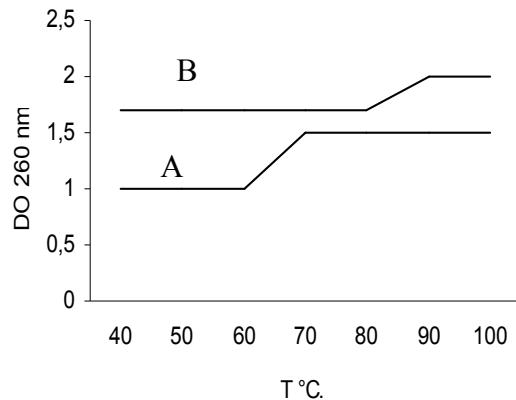
La solubilité

L'ADN est un polyanions soluble dans l'eau (solution visqueuse), il se précipite en présence d'éthanol (fibres longues).

Exercice 1

Deux molécules d'ADN double brins A et B d'origines différentes sont constituées de 647 pb. L'ADN A est résistant à l'action des exonucléases tandis que l'ADN B est hydrolysé par ces enzymes.

- 1) Quel est le poids moléculaire en dalton de ces deux molécules d'ADN ?
- 2) Donner leur longueur en μm
- 3) Que pouvez-vous déduire quant à leur structure ?
- 4) L'ADN C linéaire mesure $0.33 \mu\text{m}$ et a un $\text{PM}=291 \text{ Kd}$, quelle est la structure de cet ADN ?
- 5) On chauffe des solutions ADN A et B et on mesure leur absorbance en 260nm en fonction de l'augmentation de la température (voir fig.). Que signifient les différences enregistrées pour les ADN A et B à 40°C ?
- 6) En quoi les 2 ADN A et B diffèrent-ils ?
- 7) Une solution c_1 de l'ADN C a une absorbance de 2.8 à 25°C . en mélangeant 2.5 ml de cette solution à 7.5 ml d'eau on obtient la solution c_2 . Compléter la figure en portant la DO de la solution c_2 en fonction de l'augmentation de la température.
- 8) On soumet ensuite les solutions A et C à un refroidissement progressif ; schématiser la courbe de renaturation. Expliquer les résultats.
- 9) La DO d'une solution de l'ADN A est mesurée à 260nm ($\text{DO}= 1.34$) et à 280nm ($\text{DO} = 0.89$). Que pouvez-vous dire quant à la pureté de cette solution ? calculez la concentration de cette préparation.



Exercice 2 :

Soient les trois désoxypolynucléotides à double chaîne suivants :

5' ATGCGTC GTACCGTAGTACT 3'
3' TACGCAGCATGGCATCATGA.5'

5' GATCAATATAATCTATT CGA 3'
3' CTAGTT ATATTAGATAAGCT 5'

5' GACCGGACGCCACCGAGCGCT 3'
3' CT GGCCTGCG TGGCT CGCGA 5'

1. Quel est le polynucléotide qui a la température de fusion la plus élevée ?
2. Quel est celui qui a la Tm la plus basse ?
3. Si celles-ci sont respectivement 85°C et 45°C , quelle sera la Tm du troisième polynucléotide ?
4. Même questions pour la densité, sachant que la densité la plus élevée est de $1,730\text{g/cm}^3$, la plus basse est de $1,690\text{g/cm}^3$.

TD 2: Biologie moléculaire

Les lois de Chargaff

Les règles de Chargaff indiquent que l'ADN de n'importe quelle cellule ou de tout organisme doit avoir un rapport de 1 pour 1 entre les bases puriques et les bases pyrimidiques et, plus précisément, que la quantité de guanine est égale à la quantité de cytosine, et que la quantité d'adénine est égale à la quantité de thymine. Cette tendance se retrouve dans les deux brins de l'ADN. Elles ont été découvertes par le chimiste autrichien Erwin Chargaff.

Exercice 1

Répondre aux questions ci-dessous

- Quelles sont les principales molécules qui composent l'ADN ?
- Le rapport A+T/G+C dans un simple brin d'une molécule d'ADN est de 0.2. Quel est le rapport A+T/G+C du brin complémentaire ?
- Quel est le rapport A+G/T+C dans la double chaîne de l'ADN ?
- La composition en bases de deux ADN A et B est:

	A	G	C	T
ADN A	20	29	28	20
ADN B	25	24	19	34

Que vous suggère la composition en bases de l'ADN A et l'ADN B ? Pourquoi ?

Exercice 2 :

Un ADN monocaténaire (brin +) présente la composition molaire en bases suivante :

G : 24% ; C : 18% ; A : 25% et T : 33%. En présence d'ADN polymérase, le brin complémentaire est formé.

Quelle est la composition en bases du (brin -) néoformé et celle du brin bicaténaire ?

L'ARN polymérase ne transcrit que le brin -. Quelle sera la composition en base de l'ARN formé ?

Exercice 3 :

Le DNA du bactériophage M 13 possède la composition en bases suivantes: A 23 %; G 21 %; C 20 %. Que nous apprend cette composition sur le DNA de ce phage ?

Exercice 4 :

Ecrire la séquence en bases du brin complémentaire de la double hélice de DNA dans laquelle un brin possède la séquence.

(5') ATGCCGTATGCATTC (3').

Exercice 5:

On hydrolyse complètement un polynucléotide et on fait l'analyse. Les résultats de cette analyse sont les suivants :

- On ne met en évidence qu'un seul type d'ose.
 - Les bases pyrimidiques identifiées sont la cytosine et l'uracile en proportions importantes et la thymine en faible proportion.
- 1- A quelle catégorie appartient ce polynucléotide ?
 - 2- Enumérer les autres éléments constitutifs de ce polynucléotide.
 - 3- Ecrire la formule de l'ose identifié.
 - 4- Ce polynucléotide possède t-il une structure caractéristique ? Si oui, laquelle ?

Exercice 6

Soit la composition suivante d'un brin composant une double hélice d'ADN (donnée en fraction molaire) : $[A] = 0.3$, $[G] = 0.24$.

Que pouvez-vous dire des concentrations $[T]$ et $[C]$ sur ce même brin ?

Que pouvez-vous dire des concentrations $[A]$, $[G]$, $[T]$ et $[C]$ sur le brin complémentaire ?

Quelle sera la composition en pyrimidine de ce simple brin d'ADN ? de son brin complémentaire ? du double brin d'ADN ?