

Les propriétés spectrales des acides nucléiques sont utilisées, entre autres, par le biotechnologiste pour estimer la concentration en masse d'une solution d'acide nucléique.

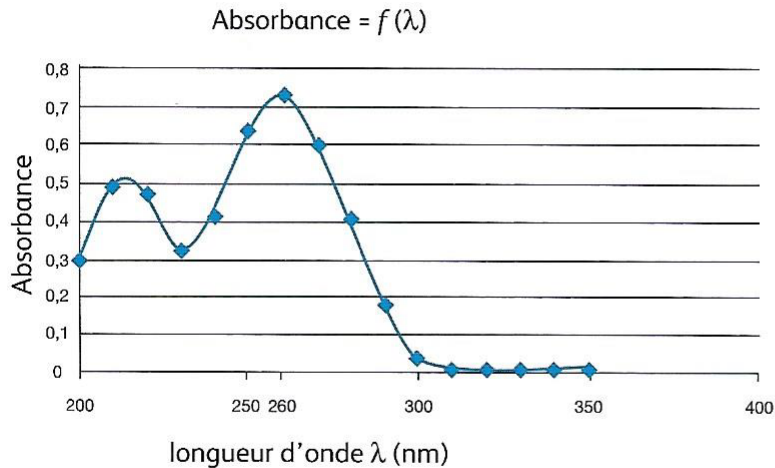
Problème : Comment les acides nucléiques absorbent-ils à la lumière ?

III. Les propriétés spectrales et chimiques des acides nucléiques :

A. Les propriétés spectrales :

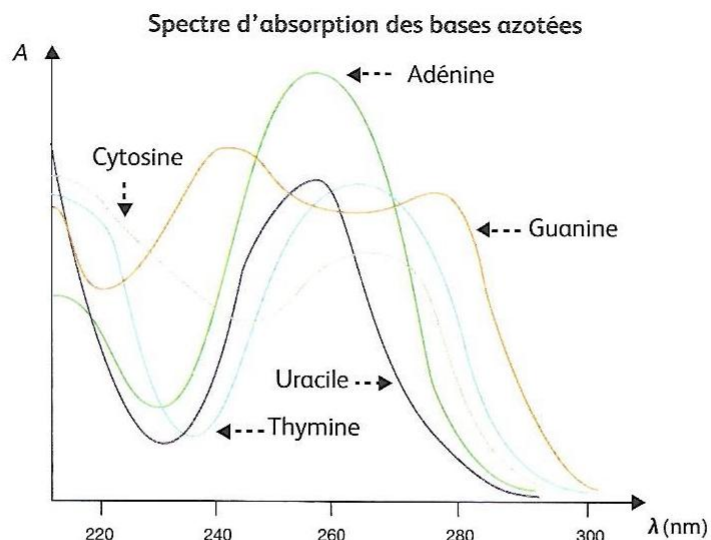
Une solution d'acide nucléique est incolore : elle n'absorbe donc pas aux longueurs d'onde de la lumière visible (400 à 800 nm). En revanche, elle absorbe aux longueurs d'onde des rayons ultraviolets (UV).

Spectre d'absorption d'une solution d'ADN entre 200 et 350 nm



Le spectre d'une solution d'ADN montre un pic à 210 nm qui n'est pas caractéristique des acides nucléiques, car il est mis en évidence pour toutes les molécules possédant des liaisons C-C et C-N.

Le spectre d'absorption d'une solution d'ARN présente la même allure. Une relation, basée sur la loi de Beer-Lambert, permet d'estimer la concentration en masse d'une solution d'ADN : une solution d'ADN à $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ admet une absorbance de 1 à 260 nm.

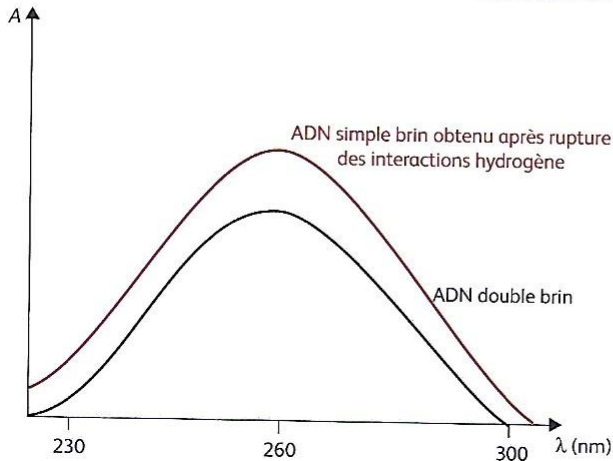


L'absorption des acides nucléiques dans les UV est due à la présence de cycles dans les bases azotées porteurs de doubles liaisons dites « conjuguées » (alternance de simples et doubles liaisons).

L'absorbance de la solution d'ADN à 260 nm à température du laboratoire est de 0,730. L'ADN de la solution est une molécule bicaténaire. Les deux brins sont stabilisés entre eux grâce à des interactions faibles.

Le chauffage à 95 °C rompt ces interactions et permet de séparer les deux brins d'ADN, donnant ainsi une solution contenant les molécules d'ADN sous forme monocaténaire. L'absorbance de la solution d'ADN dénaturée à 95 °C est de 0,890.

Spectres d'absorption d'une molécule d'ADN bicaténaire et de la même molécule sous forme monocaténaire, à la même concentration



Le spectre d'absorption de l'ADN monocaténaire montre des absorbances supérieures aux absorbances du spectre d'absorption de l'ADN bicaténaire, à concentration identique. C'est l'« effet hyperchrome » (ou « hyperchromicité »).

Bilan : Les molécules d'ADN et d'ARN, grâce à leurs bases azotées, absorbent dans l'ultraviolet avec une longueur d'onde optimale de 260 nm.

La mesure de l'absorbance permet d'estimer la concentration en masse d'ADN d'une solution, en utilisant un coefficient de correspondance de 50 ng d'ADN. μL^{-1} pour une mesure d'absorbance à 260 nm égale à 1.

Un ADN bicaténaire dénaturé, par rupture des interactions hydrogène entre les deux brins d'ADN, admet une absorbance à 260 nm supérieure à celle de l'ADN natif bicaténaire. C'est l'effet hyperchrome.

Effet hyperchrome : L'hyperchromicité ou **effet hyperchrome** est la propriété des polymères biologiques, et en particulier l'ADN et l'ARN, de voir leur absorption dans l'UV augmenter lorsqu'ils subissent une dénaturation, c'est-à-dire une perte de leur structure secondaire.

AD n°4 : Courbe de fusion d'un ADN bicaténaire.

Bilan : La courbe de fusion d'une molécule d'ADN bicaténaire (absorbance à 260 nm = f(température)) permet la détermination de la température de fusion (T_f), encore appelée température de melting (T_m), température pour laquelle 50 % de l'ADN bicaténaire est dénaturé en ADN monocaténaire.

AT n°23 : Extraction d'ADN.

Les propriétés chimiques des acides nucléiques (charge, solubilité) sont importantes à connaître pour mettre au point des méthodes de purification et de séparation. Par exemple, une méthode de séparation par électrophorèse est utilisable si les molécules d'acides nucléiques sont chargées.

Problème : Les acides nucléiques sont-ils chargés et sont-ils solubles dans l'eau ?

B. Les propriétés chimiques :

AD n°5 : Les propriétés chimiques des acides nucléiques.

Bilan : A pH 7-8, les acides nucléiques sont chargés négativement, grâce à leurs nombreux groupements phosphates.

Les molécules d'ADN chargées négativement peuvent être séparées par électrophorèse en gel d'agarose : les échantillons sont déposés du côté négatif de l'électrophorèse et les molécules d'ADN migrent vers le pôle positif. Les molécules d'ADN de l'échantillon sont séparées en fonction de leur taille (les molécules d'ADN les plus petites migrent le plus loin).

Les molécules d'ADN et d'ARN chargées négativement au pH 7 de l'eau sont hydrophiles et donc solubles dans l'eau. Cependant, leur solubilité dépend de la force ionique du solvant : les acides nucléiques précipitent à force ionique élevée.