

## LES ENZYMES UTILISEES EN GENIE GENETIQUE : LES ENDONUCLEASES DE RESTRICTION

**1-1/ Définition :** Ce sont des enzymes, principalement d'origine bactérienne, capables de couper l'ADN double brin (et ce quelque soit son origine) à des endroits spécifiques (séquences nucléotidiques) appelés sites de restriction généralement de 4 à 6 paires de bases.

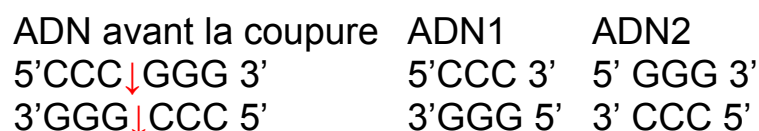
**1-2/ La coupure ou phénomène de restriction:** Le phénomène de restriction a été observé bien avant que les enzymes de restriction ne fussent mises en évidence. En effet, lorsqu'un bactériophage colonise une bactérie, le phénomène de lyse bactérienne, après multiplication du phage par le biais de la machinerie enzymatique de la bactérie hôte peut ne pas avoir lieu.

Ceci est expliqué par le fait que :

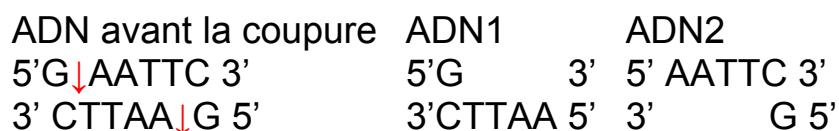
1. l'ADN phagique est intégré, sous forme silencieuse, dans celui de la bactérie : cycle lysogénique
2. l'ADN phagique est complètement détruit (hydrolysé) par les enzymes de la bactérie hôte : les enzymes de restriction (Werner Arber).

Lorsqu'une endonucléase de restriction coupe un ADN, le résultat peut être :

1. soit une coupure franche c'est-à-dire au même niveau sur les deux brins ; ce sont les bords ou les **bouts francs** : la coupure a lieu au milieu du site de restriction. Il ne peut pas y avoir de liaison spontanée entre les fragments qui ont résulté de cette coupure. Seule une **T4 ligase** peut rétablir la ligation des deux brins d'ADN résultant de la coupure.



2. soit une coupure décalée sur les deux brins. On parlera alors d'extrémités cohésives. Les bouts des deux ADN obtenus ne sont plus francs ; ce sont des **bouts collants** ou bouts cohésifs. Les coupures sont décalées l'une par rapport à l'autre sur les deux brins. Les parties simples brins peuvent s'apparier, d'où la possibilité de lier des fragments d'ADN d'origine différentes : c'est le phénomène de la **recombinaison génétique**.



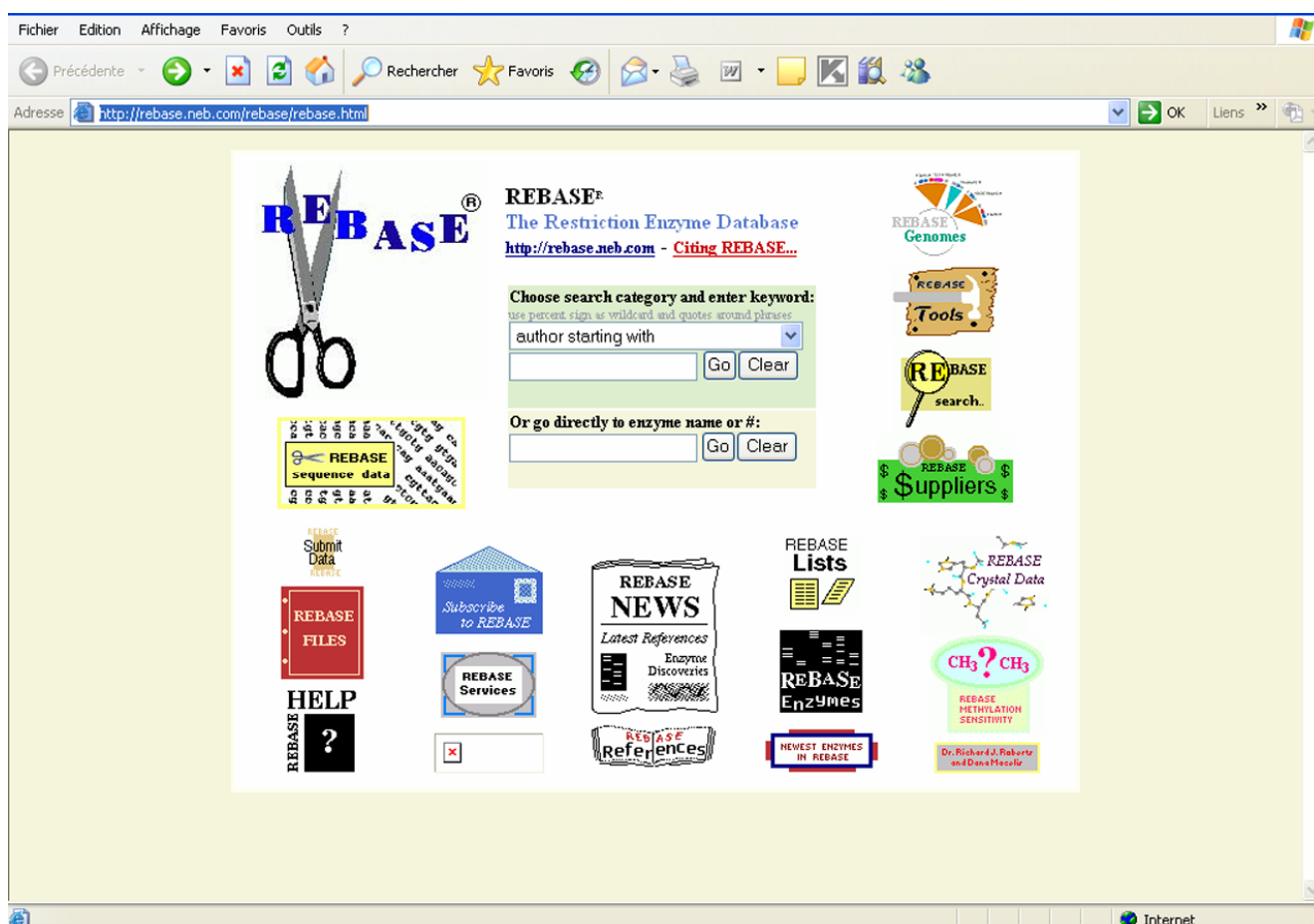
Voici un exemple (<http://ead.univ-angers.fr/~jalouzot/genetique/courshtm/chap4/chap4-1.htm>) qui regroupe les deux types de coupure : En **bleu** (à gauche) coupure cohésive, en **rouge** (à droite) coupure franche :

**REMARQUE 2:** Les ADN bactériens, pour échapper à l'action de leurs propres endonucléases de restriction, sont méthylés sur le C5 de certaines Cytosines et sur le N7 de quelques Adénines. Les enzymes sont des méthylases qui reconnaissent les mêmes sites que les endonucléases de restriction et leur nomenclature ne diffère de celle des endonucléases de restriction que par l'ajout d'une lettre M au début du nom : M. EcoR I.

**Tableau N°1:** Liste non exhaustive des enzymes de restriction

Enzyme	Origine bactérienne	Site de restriction
Alu I	<i>Athrobacter luteus</i>	AG/CT
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G/GATCC
Bgl II	<i>Bacillus blobiggi</i>	A/GATCT
Eco RI	<i>Escherichia coli</i>	G/AATTC
Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i>	A/AGCTT
Hea III	<i>Haemophilus aegyptus</i>	GG/CC
Hpa II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C/CGG
Mbo I	<i>Moraxella bovis</i>	GA/TC
Pst I	<i>Providentia stuartii</i>	CTGCA/G
Taq I	<i>Thermophilus aquaticus</i>	T/CGA
Wba I	<i>Xanthomonas badrii</i>	T/CTAGA

On peut consulter des moteurs de recherches pour plus d'informations concernant les enzymes de restriction et leurs sites de clivage, ainsi que leurs caractéristiques. Par exemple, on peut consulter la base de données REBASE (Restriction Enzyme data BASE) sur le site : <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

**Figure N°1:** Interface principale de la base de données REBASE

The screenshot shows the REBASE website interface for the Eco147I restriction enzyme. The browser address bar displays "http://rebase.neb.com/enz/Eco147I.html". The page features the REBASE logo and a search bar. The enzyme name "Eco147I" is prominently displayed in red. Below it, the recognition sequence "AGG^CCT" is shown with a diagram of the DNA sequence: 5' .. A G G C C T 3' and 3' .. T C C G G A 5'. The recognition sequence is highlighted with a purple box. The page also includes a "Different enzyme" search bar, a "Status of methylation sensitivity testing" link, and a "Site frequency in sequenced genomes" link. The enzyme details section lists the acronym "Eco147", prototype "StuI", organism "Escherichia coli RFL147", and growth temperature "37 °". The page footer includes the REBASE logo, a "REBASE Lists" link, and a "HELP" button.

Figure N°2: Interface de la base de données REBASE Lists pour l'enzyme Eco 147 I

The screenshot shows the REBASE website interface for the XbaI restriction enzyme. The browser address bar displays "http://rebase.neb.com/cgi-bin/reb\_get.pl". The page features the REBASE logo and a search bar. The enzyme name "XbaI" is prominently displayed in red. Below it, the recognition sequence "T^CTAGA" is shown with a diagram of the DNA sequence: 5' .. T C T A G A 3' and 3' .. A G A T C T 5'. The recognition sequence is highlighted with a purple box. The page also includes a "Different enzyme" search bar, a "Status of methylation sensitivity testing" link, and a "Site frequency in sequenced genomes" link. The enzyme details section lists the acronym "Xba", prototype "XbaI", organism "Xanthomonas badrii", and growth temperature "26 °". The page footer includes the REBASE logo, a "REBASE Lists" link, and a "HELP" button.

Figure N°3: Interface de la base de données REBASE Lists pour l'enzyme Xba I

## 1-4/ Exemple de protocole expérimental de restriction enzymatique

([http://pedagogie.ac-limoges.fr/svt/accueil/html/tp-spe-limosin/TP\\_manip\\_elem\\_bio\\_mol\\_tech.doc](http://pedagogie.ac-limoges.fr/svt/accueil/html/tp-spe-limosin/TP_manip_elem_bio_mol_tech.doc))

### FICHE TECHNIQUE : ACTION DES ENZYMES DE RESTRICTION

#### Protocole :

Dans un microtube mettre :

1. X  $\mu$ l de la solution d'ADN plasmidique, X dépendant de la concentration en ADN de l'extrait qui peut être évaluée par spectrophotométrie à 260 nm grâce à la relation :  $1 \text{ DO} = 50 \mu\text{g d'ADN}$  (diluer l'ADN au  $1/200^{\text{ème}}$  dans l'ED avant de lire la DO)
2. 1,5  $\mu$ l du tampon de restriction
3. 1  $\mu$ l de chaque enzyme de restriction à 10 U/ $\mu$ l
4. QSP 15  $\mu$ l : ED stérile
5. Mélanger brièvement
6. Centrifuger à 4000 g quelques secondes
7. Placer à l'incubation 2 H à 37°C

**1-5/ Autres outils enzymatiques utilisés en génie-génétique :** Il n'y a pas que les endonucléases de restriction qui soient utilisées. Il existe une panoplie d'enzymes pour les techniques de clonage, pour la détermination des séquences d'ADN, etc.

1. **Les méthylases :** Ces enzymes reconnaissent les mêmes sites que les endonucléases de restriction. Elles catalysent la méthylation du carbone N°5 de certaines cytosines et de l'azote N°6 des adénines pour empêcher la coupure par l'endonucléase de restriction.
2. **Les polymérases :** Plusieurs enzymes possèdent une activité polymérisante des acides nucléiques. **La transcriptase reverse** transcrit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) en activant dans le sens 5'→3'. **La DNA polymérase I**, quant à elle, possède trois activités : (i)- activité ADN polymérasique 5'→3' à partir d'une amorce 3'OH. (ii)- une activité exonucléasique dans le sens 3'→5'. (iii)- une activité exonucléasique dans le sens 5'→3'. **Le fragment de Klenow**, obtenu à partir de la DNA polymérase I et possède une activité exonucléasique dans les sens 5'→3' et 3'→5'. **La Taq polymérase** est une enzyme qui amplifie l'ADN in vitro. **Les ARN polymérases** transcrivent l'un des deux brins de l'ADN en ARN. **La T4 DNA polymérase** produite au sein des bactéries infectées par le phage T4. Ses activités sont semblables à celles du fragment de Klenow.
3. **Les ligases :** On distingue **la DNA ligase d'Ecoli** qui catalyse la réaction de formation des liaisons phosphodiesters entre deux nucléotides, l'un à extrémité 3'OH, l'autre 5' phosphate. **La T4 DNA ligase** a la même activité que la DNA ligase d'Ecoli. **La RNA ligase** produite au sein des bactéries infectées par le phage T4 catalyse la réaction de liaison (ligation) de deux ARN.