

Page facebook ; Domaine SNV : Biologie,Agronomie,Science Alimentaire,Ecologie

TECHNIQUE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

www.facebook.com/DomaineSNV/

REALISE PAR M:HAMDOUCHE

II- LES OUTILS ENZYMATIQUES DU GÉNIE GÉNÉTIQUE

1- LES ENZYMES DE RESTRICTION

Généralités

- Découvertes à partir de 1973. Les enzymes de restriction sont capables de reconnaître spécifiquement une courte séquence, de 4 à 10pb, et de cliver l'ADN au site reconnu.

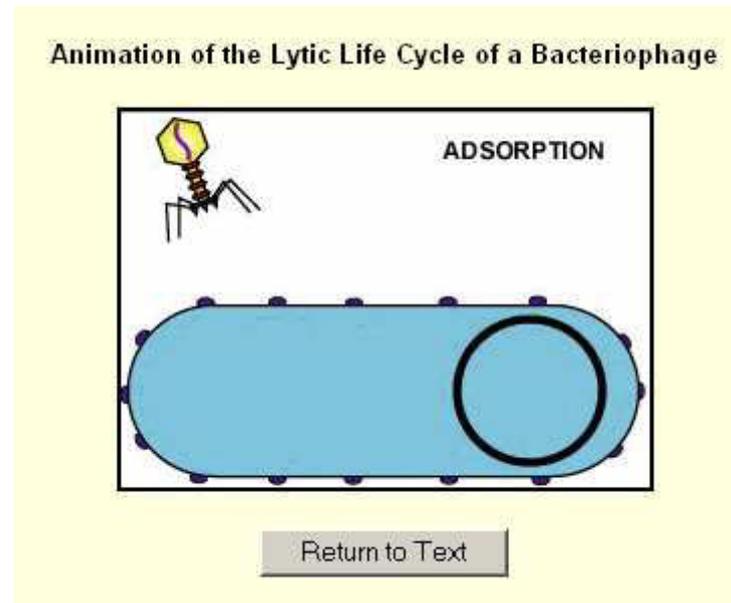


Les enzymes de restriction appartiennent à la classe des endonucléases, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique. Les endonucléases se différencient des exonucléases qui dégradent la molécule d'ADN à partir de l'une de ses extrémités (3' ou 5').



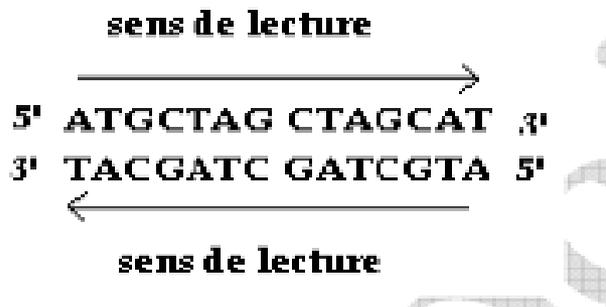
Origine des enzymes de restriction.

Les enzymes de restriction sont extraites de micro-organismes, le plus souvent des bactéries. Les bactéries peuvent être parasitées par des virus à ADN. Les bactéries fabriquent des enzymes de restriction qui sont capables de cliver les ADN étrangers.



Séquences d'adn reconnues par les enzymes de restriction.

- Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des séquences dites palindromiques. Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4, 5 ou 6 paires de bases.



NOMENCLATURE DES ENZYMES DE RESTRICTION.

LES ENZYMES DE RESTRICTION PRÉSENTENT UNE NOMENCLATURE BIEN PRÉCISE

Exemple: **E**co**R**1

genre: **E**scherichia

espèce: **c**oli

la souche: **R**

Order discovered: **1**



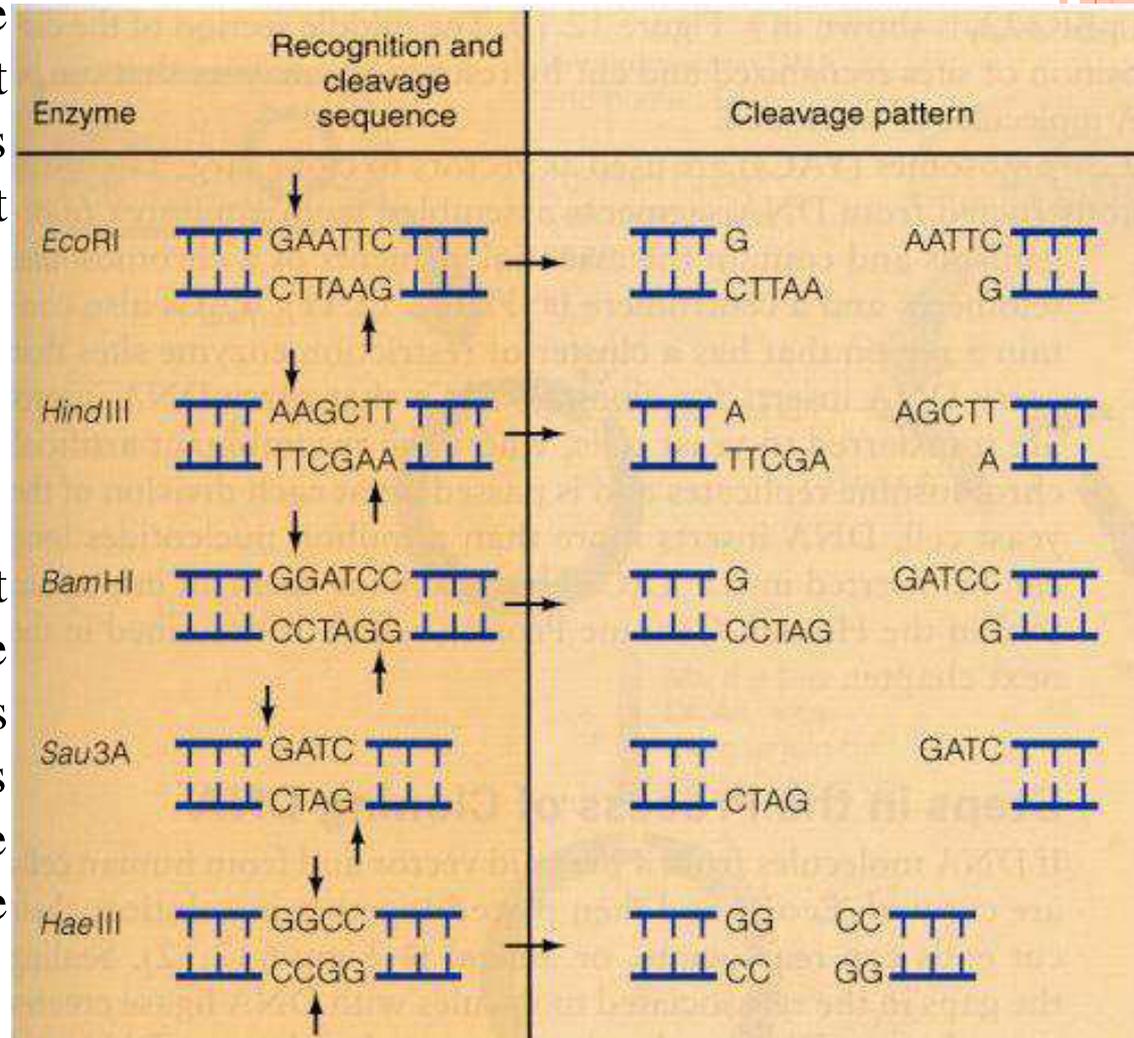
DIFFÉRENTS TYPES DE COUPURE

Coupure franche

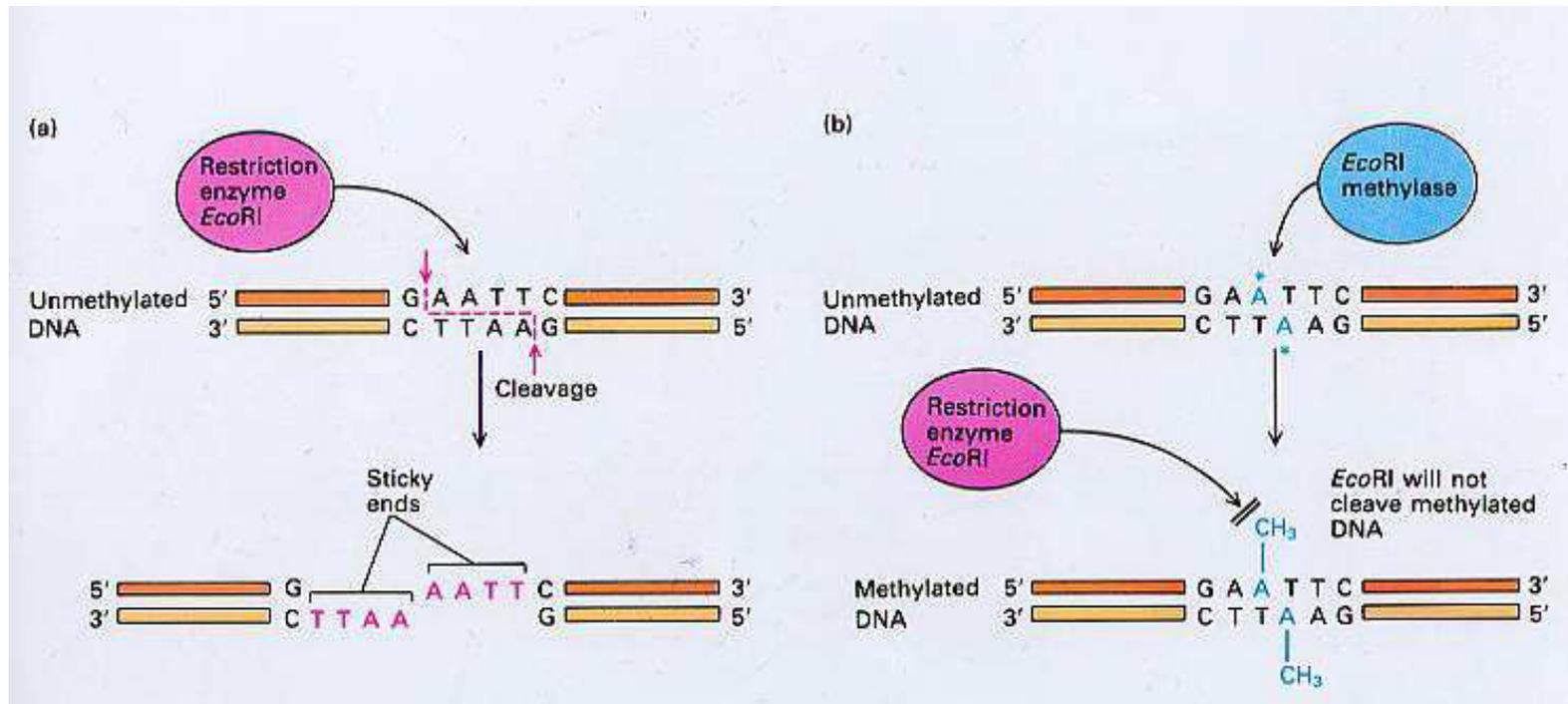
- Certains enzymes coupent le site en son milieu et produisent deux fragments dont les extrémités sont franches.

Coupure décalée

- Cependant, la plupart réalisent une coupure dissymétrique : on parle dans ce cas d'extrémités cohésives (chaque fragment possède une chaîne qui dépasse l'autre de quelques bases)



MÉTHYLATION DES SITES DE RESTRICTION ET INACTIVATION DES ENZYMES DE RESTRICTION.



LES TYPES DES ENZYMES DE RESTRICTION

- 1- enzymes de type I
- 2- enzymes de type II : plus utilisées aux laboratoires
- 3- enzymes de type III



Utilisations des enzymes de restriction.

- Les utilisations des enzymes de restriction sont très nombreuses en biologie moléculaire.
- elles permettent de fractionner l'ADN en multiples fragments susceptibles d'être séparés par les techniques d'électrophorèse.
- Les enzymes de restriction peuvent être utilisées pour préparer un fragment d'ADN d'un gène donné (insert) à être inséré dans un vecteur comme un plasmide **ADN recombinant**.
- Les enzymes de restriction sont utilisées couramment pour rechercher des mutations dans le génome.



2- LES OUTILS ENZYMATIQUES AUTRES QUE LES ENZYMES DE RESTRICTION

○ Les enzymes coupant l'adn:les nucléases

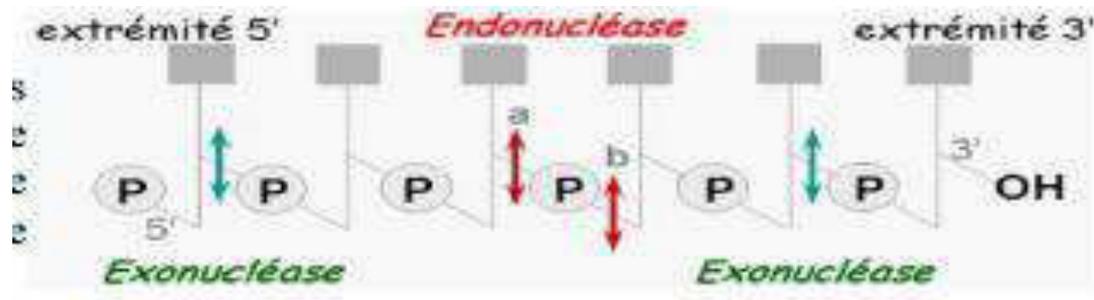
Les DNAses : Leur fonction consiste à couper l'ADN au niveau d'un phosphate.



Les exonucléases



Les endonucléases



1. Les nucléases

Définition : les nucléases dégradent les molécules d'ADN en rompant les liaisons phosphodiester liant un nucléotide au suivant.

Il existe 2 types de nucléases :

1.1. Exonucléases

Ces enzymes éliminent des nucléotides un a un a partir d'une extrémité de l'ADN.

exemple :

- ✓ la Bal31 (obtenue de cultures d'*Aliceromonas espejana*) éliminant des nucléotides a partir des 2 extrémités des 2 brins,
- ✓ l'exonuclease 3 (obtenue a partir de cultures d'*E. coli*) catalysant l'hydrolyse séquentielle des nucléotides d'un ADN a partir d'une extrémité 3' libre.

LES EXONUCLÉASES

- ❖ exonucléase III : 3'-5' exonu
- ❖ Exonucléase I : 3'- 5' exonu (ADN simple brin)
- ❖ Bal 31: 5' – 3' exonu + activité endonu



1.2. Endonucléases

a) a) clivages non spécifiques

Ces enzymes sont capables de rompre des liaisons phosphodiester internes.

• Exemple:

- La **DNase 1** extraite du pancréas, coupe préférentiellement après une base pyrimidique.
- La **nucléase S1**, extraite de culture d'*Aspergillus oryzae* dégrade seulement les acides nucléiques monocaténaire.

2. Les polymérases et enzymes apparentées

Les polymérases d'acides nucléiques sont des enzymes qui synthétisent un nouveau brin d'ADN complémentaire à une matrice d'ADN ou ARN. 2 types de polymérases sont couramment utilisées en génie génétique :

2.1. ADN polymérase I

Extraite d'*Escherichia coli*, elle joue un rôle majeur dans la réparation de l'ADN. L'enzyme se fixe à une région monobrin et synthétise totalement le brin complémentaire. L'activité polymérasique s'effectue dans le sens 5' vers 3' à partir d'une amorce 3'OH.

2.2. Transcriptase réverse

Codée par les gènes Pol des rétrovirus, cette enzyme transcrit ARN en ADN complémentaire (cADN). Comme toutes les polymérases, elle travaille dans le sens 5' vers 3'.

LES POLYMÉRASES:

- ❑ activité polymérisante des AN
- ❑ L'ADN polymérase I
- ❑ Le fragment de Klenow
- ❑ La Taq polymérase
- ❑ La transcriptase inverse
- ❑ L'ARN polymérase



3. Enzymes modifiant l'ADN

De nombreuses enzymes modifient l'ADN par addition ou suppression de groupes chimiques spécifiques.

- **la phosphatase alcaline** : elle retire le phosphate en 5' sur l'ADN, l'ARN et les nucléotides libres. L'élimination des phosphates en 5' empêche toute action des ligases.
- **la T4 polynucleotide kinase** : elle transfère le phosphate d'un ATP sur le phosphate en 5' d'un polynucleotide.
- **les topoisomérases** : Les topo isomérases sont capables de changer la conformation de l'ADN.
- **Les méthylases** :

Enzymes modifiant l'ADN

- De nombreuses enzymes modifient l'ADN par addition ou suppression de groupes chimiques spécifiques.

1- les enzymes enlevant les groupes phosphates

- – la **phosphatase alcaline** : elle retire le phosphate en 5' sur l'ADN, l'ARN et les nucléotides libres. L'élimination des phosphates en 5' empêche toute action des ligases.

2- les enzymes ajoutant les groupes phosphates

- – la **T4 polynucleotide kinase** : elle transfère le phosphate d'un ATP sur le phosphate en 5' d'un polynucleotide.
- – les **topoisomérases** : Les topo isomérases sont capables de changer la conformation de l'ADN.

- Les **méthylases** :



4. Ligases

Ce type d'enzyme permet de relier les 2 fragments d'ADN double brins

C'est une enzyme capitale puisqu'elle permet la construction de molécules d'ADN recombinées.

4.1. ADN ligase

L'enzyme n'agit que si les 2 ADN sont associés par des extrémités cohésives.

Cette ligase assure la formation des liaisons phosphodiester entre une extrémité 3'OH et une extrémité 5' phosphate.

4.2. T4 ADN ligase

Elle est capable d'effectuer des ligations entre 2 ADN a bouts francs.

LES LIGASES

Ce type d'enzyme permet de relier les 2 fragments d'ADN double brins

C'est une enzyme capitale puisqu'elle permet la construction de molécules d'ADN recombinaées.

ADN ligase

L'enzyme n'agit que si les 2 ADN sont associés par des extrémités cohésives.

Cette ligase assure la formation des liaisons phosphodiester entre une extrémité 3'OH et une extrémité 5' phosphate.

4.2. T4 ADN ligase

Elle est capable d'effectuer des ligations entre 2 ADN a bouts francs.



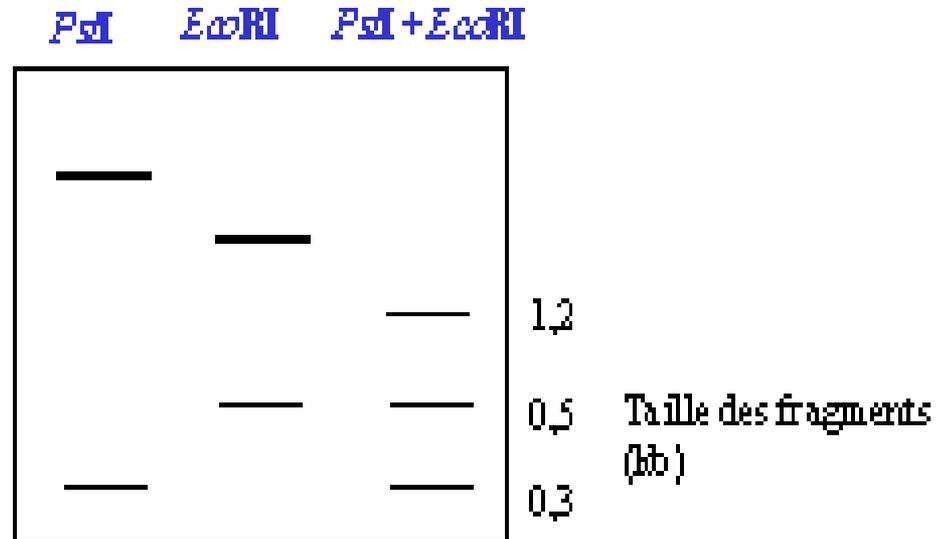
○ Carte de restriction de l'ADN.

Les enzymes de restriction coupent l'ADN au niveau de séquences parfaitement définies. Il est donc possible d'établir une véritable carte d'un gène donné par la technique de Southern. Cette carte porte le nom de carte de restriction.

En pratique, l'ADN à étudier est réparti en différentes fractions. Chaque fraction est traitée par une enzyme de restriction ou un couple d'enzymes de restriction. Ainsi dans l'illustration ci-dessous. Dans le puits 1, on dépose l'ADN digéré par PstI seule; dans le puits 2, on dépose l'ADN digéré par EcoRI seule et dans le puits 3, l'ADN digéré par Eco RI et PstI. La détection des différents fragments est réalisée à l'aide d'une sonde marquée du gène étudié.



ILLUSTRATION DES FRAGMENTS APRÈS MIGRATION



<i>Pst</i> I	<hr style="display: inline-block; width: 100px; vertical-align: middle; margin-right: 10px;"/>	<hr style="display: inline-block; width: 100px; vertical-align: middle; margin-right: 10px;"/>	<i>2 fragments</i>
	0,3	1,7	
<i>Eco</i> RI	<hr style="display: inline-block; width: 100px; vertical-align: middle; margin-right: 10px;"/>	<hr style="display: inline-block; width: 100px; vertical-align: middle; margin-right: 10px;"/>	<i>2 fragments</i>
	1,5	0,5	
<i>Pst</i> I + <i>Eco</i> RI	<hr style="display: inline-block; width: 100px; vertical-align: middle; margin-right: 10px;"/>	<hr style="display: inline-block; width: 100px; vertical-align: middle; margin-right: 10px;"/>	<i>3 fragments</i>
	0,3	1,2	0,5



Exercice01:

Un des plasmides recombinants contenant le gène M (appelé pBM1) est digéré par les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI. Après migration et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium, on obtient les profils de restriction suivants:

Donnez la carte de restriction du plasmide recombinant pBM1.



