

Différentes manipulations des acides nucléiques sont effectuées avec des enzymes, qui sont considérées comme des outils indispensables du génie génétique. Elles permettent de travailler sur les acides nucléiques, en réalisant : des raccourcissements, des allongements, des copies en de nouvelles molécules ADN ou ARN et la méthylation...

I.1. Polymérases

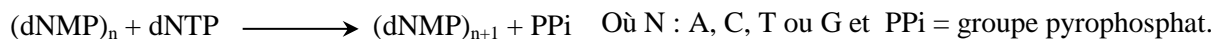
Ce sont des enzymes qui synthétisent des acides nucléiques de 5'→3' en utilisant des nucléotides triphosphates, fournissant de l'énergie nécessaires à cette synthèse.

I.1.1. ADN polymérases

Les DNA polymérases sont des enzymes qui synthétisent un nouveau brin d'ADN complémentaire à une matrice d'ADN ou ARN. La plupart des polymérases ne peuvent fonctionner que si la matrice d'ADN ou d'ARN possède une région double brin qui agit comme amorce pour l'initiation de la polymérisation. On distingue trois types de polymérase ;

I.1.1.1. ADN polymérases ADN dépendante

Ces enzymes fabriquent de l'ADN de 5'→3' à partir d'une matrice d'ADN en présence d'une amorce. Elles catalysent la réaction de polymérisation suivante:



- ✓ **Polymérase I d'*E. coli*** : Plus de son activité polymérasique, elle possède les deux activités exonucléasiques (3'→5' : appelée souvent activité de correction, et 5'→3').
- ✓ **Fragment de *Klenow*** : Résultant de la digestion de la DNA polymérase I (Fig. 01) par la protéase « subtilisine ». L'enzyme de *Klenow* qui a une taille de 76 kD possède encore deux des activités catalytiques de l'enzyme entière: l'activité polymérasique et l'activité exonucléasique 3'→5'. Ce fragment peut être utilisé pour synthétiser le deuxième brin à partir d'un ADN simple brin et d'une amorce dans les mêmes conditions et avec la même réaction que celle de l'ADN polymérase I. Le fragment de *Klenow* est utilisé pour :
 - la synthèse du deuxième brin, complémentaire d'un ADNc.
 - le marquage des extrémités 5' sortantes du DNA double brin.
 - le marquage du DNA par la technique des amorces aléatoires.
 - le séquençage du DNA par la technique des didésoxynucléotides.
 - la mutagenèse dirigée à partir d'oligonucléotides synthétiques.

- ✓ **Taq polymérase** : C'est une ADN polymérase thermostable, elle est extraite d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus* qui vit dans les sources chaudes. La Taq polymérase est dépourvue des deux activités exonucléasiques et elle est inhibée par les ions phosphates. La Taq polymérase est utilisée en particulier pour la réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* = PCR). C'est la thermostabilité de la Taq polymérase qui la rend appropriée pour la PCR, car s'elle n'était pas thermostable elle serait inactivée lorsque la température de la réaction est élevée à 94 °C (phase de dénaturation d'ADN). Cependant, parce qu'elle est dépourvue d'activités d'édition, la Taq polymérase est responsable de nombreux mis appariements : de l'ordre de 1 pour 100 pb.
- ✓ **DNA polymérase T4 et T7** : Ces polymérases sont produites par les phages T4 et T7, qui infectent la bactérie *E. coli*. La ADN polymérase de ces phages a les mêmes activités que le fragment de *Klenow* (polymérase 5'→3' et exonucléase 3'→5', dépourvue d'une exonucléase 5'→3'). Bien que, son activité exonucléasique (3'→5') est 200 fois plus grande. Selon les besoins de la manipulation, et on jouant sur les conditions de la réaction, on peut retirer l'une de ces activités. En l'absence de désoxynucléotides triphosphates (dNTP), seule l'activité 3'→5' exonucléase se manifeste, aboutissant à un DNA avec de longues extrémités 5' sortantes. Lorsque les dNTP sont ajoutés au milieu, la resynthèse se fait rapidement, permettant l'incorporation de nucléotides et la synthèse d'ADN. L'activité de la T4 polymérase est aussi rapide que celle de la DNA polymérase I. Lorsque la correction n'a pas beaucoup d'importance (Exp: lorsqu'on ne clone pas ensuite l'ADN), on peut retirer l'activité exonucléase (3'→5'). La DNA polymérase du phage T4 et T7 est utilisée pour le marquage du DNA.

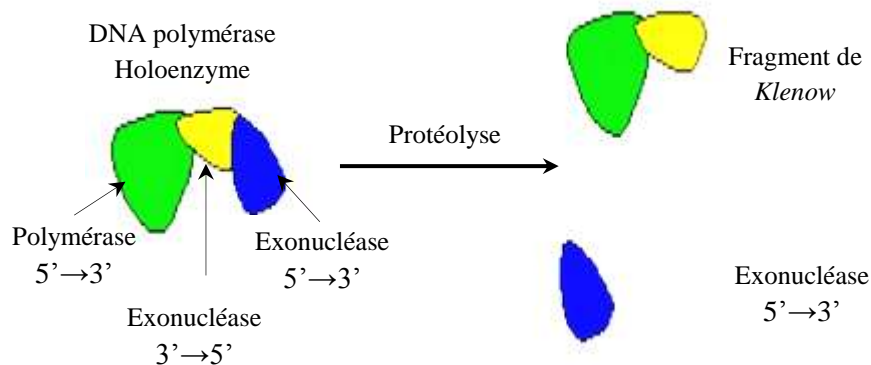


Fig.01: Obtention du fragment de *Klenow* à partir de l'ADN polymérase I

I.1.1.2. ADN polymérases ARN dépendante (reverse transcriptase)

Les transcriptases réverses sont des DNA polymérases qui peuvent synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc) en prenant un ARN comme matrice, formant un hybride ADN-ARN. Elles

catalysent donc la réaction inverse de la transcription, d'où le nom de transcriptases réverses. Les transcriptases réverses sont produites par des cellules infectées par des rétrovirus, qui sont des virus à ARN qui font synthétiser un ADNc par la cellule-hôte afin de permettre leur réplique. La transcriptase reverse est utilisée pour l'étude des ARN. Après la synthèse de l'ADN complémentaire, on détruit l'ARN matrice, puis on soumet l'ADNc à l'amplification par la PCR, qui fournit une grande quantité d'ADNc hybridé avec une copie ADN de la séquence de l'ARN de départ.

I.1.1.3. Terminal transférase

Elle catalyse l'addition du dNTP à l'extrémité 3'OH de l'ADN, et permet donc de rajouter sur une molécule d'ADN double brin une queue simple brin (*tailing*) sans matrice. Cette enzyme est surtout utilisée pour créer des extrémités collantes.

I.1.2. RNA polymérase DNA dépendante

Les RNA polymérases reconnaissent un promoteur spécifique de chacune d'elle et synthétise un ARN complémentaire au brin d'ADN (transcription) en aval (après) de ce promoteur. La synthèse s'effectue dans le sens 5'→3' en présence de ribonucléotides et des ions Mg^{+2} , mais en absence d'une amorce. Les ARN polymérases sont d'une grande utilité pour la synthèse de l'ARN en grande quantité, utilisé comme sonde (ribosondes) et pour l'étude de la structure de l'ARN et son interaction avec l'ADN et les protéines. Les trois ARN pol les plus utilisées en génie génétique et en biologie moléculaire sont:

- **Sp6 ARN pol** : produite par la bactérie *Salmonella Thyphimurium*,
- **T7 ARN pol** : extraite des bactéries *E. coli* infectées par le phage T7
- **T3 ARN pol** : extraite des bactéries *E. coli* infectées par le phage T3

I.2. Nucléases

Les nucléases dégradent les molécules d'ADN en rompant les liaisons phosphodiester liant un nucléotide au suivant. Il existe deux types de nucléases ; les RNases et DNases

I.2.1. DNases

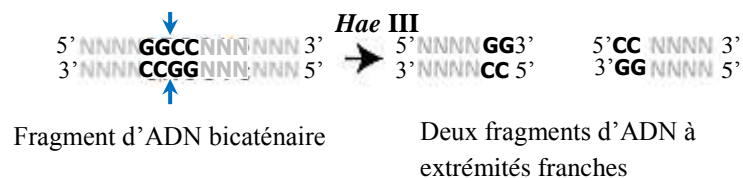
I.2.1.1 Endonucléases

✓ Endonucléases à clivages spécifiques: ENZYMES DE RESTRICTION

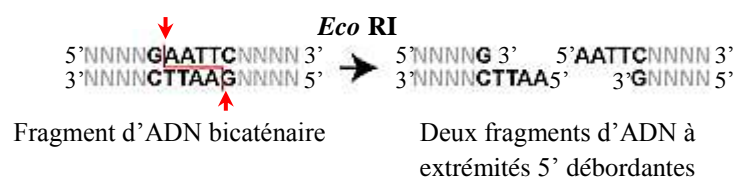
Les enzymes de restriction sont produites par les bactéries pour se protéger des phages. Ces endonucléases ont la particularité de couper les molécules d'ADN bicaténaire à des sites spécifiques de la séquence. Chaque enzyme de restriction **reconnait** et **coupe** une séquence nucléotidique donnée. Le nom des enzymes de restriction provient du nom de genre et d'espèce de la bactérie dont elles ont

été isolées (**Exp.** *EcoRI* vient d'*Escherichia coli* souche **R**, 1ère enzyme isolée dans cette souche). Il existe trois types d'enzymes de restriction. Les types I et III sont des protéines complexes coupant l'ADN bicaténaire en dehors de leur site de reconnaissance. Les enzymes de restriction de type II sont les outils indispensables au génie génétique. Elles reconnaissent une séquence spécifique de 4, 6 ou 8 pb et coupent à l'intérieur de cette séquence, appelée site de restriction. La fréquence de reconnaissance sera d'autant plus faible que le nombre de bases reconnues est élevé. Une particularité de ces sites est qu'ils sont généralement palindromiques, c'est-à-dire que la même séquence est lue sur les deux brins, mais en sens inverses l'un de l'autre. De très nombreuses enzymes de restriction sont disponibles dans le commerce. Elles sont généralement fournies avec leur tampon de réaction et la température optimale d'activités est indiquée. Il est possible de digérer un même fragment d'ADN par deux enzymes de restriction différentes. Si elles fonctionnent dans des conditions analogues (concentration en sels, pH, température...), les deux digestions se déroulent simultanément. Sinon, le fragment d'ADN doit être digéré par les deux enzymes successivement, en changeant entre les réactions enzymatiques les conditions de l'expérience. Les enzymes de restriction utilisées coupent dans la séquence selon deux modes :

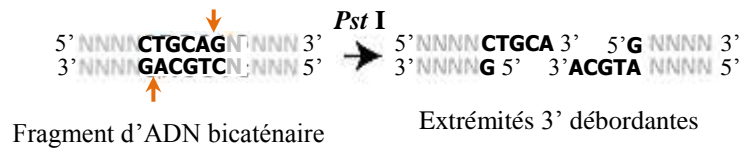
- **Coupure franche :** les extrémités franches sont obtenues par coupure au même endroit sur les deux brins.
 - **Exemple :** l'enzyme *Hae III* isolée de *Haemophilus aegyptius* coupe l'ADN double brin au niveau de la séquence **GG/CC**



- **Coupure décalée sur les deux brins :** Ce type de coupure génère des extrémités monocaténaires (simple brin) ayant des séquences complémentaires appelées extrémités cohésives ou bouts collants.
 - **Exemple 1 :** L'enzyme de restriction *Eco RI* isolée de la bactérie *Escherichia coli* coupe l'ADN bicaténaire dans la séquence palindromique **G/AATTC**

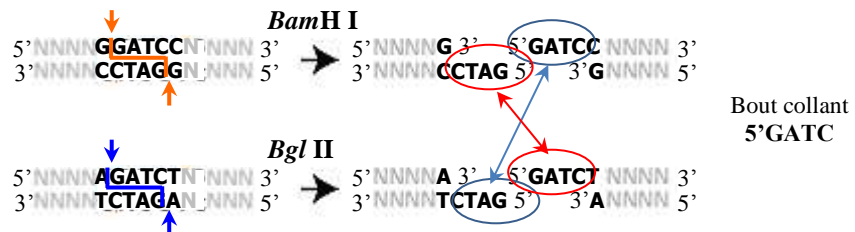


- **Exemple 2 :** L'enzyme de restriction *Pst* I isolée de la bactérie *Providencia stuarti* coupe l'ADN bicaténaire dans la séquence palindromique **CTGCA/G**



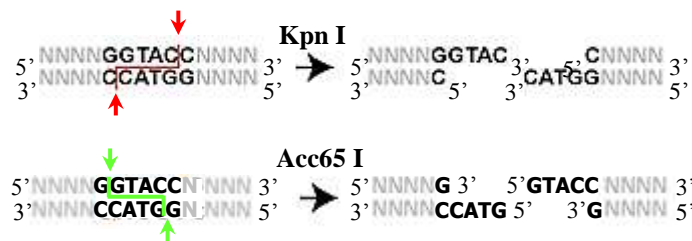
Il y a deux grandes utilisations des enzymes de restriction :

- La cartographie d'un fragment d'ADN : On peut identifier un fragment d'ADN grâce à sa carte de restriction, c'est-à-dire grâce à la position des sites de restriction.
- La construction : Un fragment de restriction peut être recollé (ligué) à un autre fragment d'ADN si les deux extrémités sont **compatibles**. Les extrémités à liguer seront générées par la même enzyme mais ce n'est pas obligatoire, où deux enzymes différentes peuvent donner également des extrémités compatibles.



Les **isoschizomères** sont des enzymes de restriction **différentes**, mais peuvent reconnaître les mêmes sites de restriction. Les isoschizomères fournissent souvent après clivage enzymatique des fragments dont les extrémités sont **différentes** (coupures distinctes).

- **Exemple :** Kpn I et Acc65 I sont des isoschizomères, elles reconnaissent en effet la même séquence nucléotidique **GGTACC**, mais libèrent des fragments avec des extrémités différentes.



✓ **Endonucléases à clivages non spécifiques**

Ces enzymes sont capables de rompre des liaisons phosphodiester internes.

- **La DNase I :** extraite du pancréas, coupe préférentiellement après une base pyrimidique en en coupant aussi bien les ADN simple brin que double brins.

- **La nucléase S1** : produite par *Aspergillus oryzae*, cette enzyme dégrade seulement les acides nucléiques monocaténaire (ADN ou même ARN), bien qu'à des concentrations élevées elle agisse aussi sur les hybrides. Elle agit en milieu acide, en présence d'ions Zinc. La nucléase S1 est utilisée :
 - Faire des bouts francs aux extrémités des fragments d'ADN double brin ;
 - Hydrolyser les fragments d'ADN simple brin au niveau des brèches (même s'il ne manque qu'une seule liaison) ;
 - Isoler les hybrides ADN:ARN lors de l'hybridation entre un gène et l'ADNc correspondant ;
 - Ouvrir les épingles à cheveux formées lors de la synthèse des ADNc.

I.2.1.2. Exonucléases

Ces enzymes éliminent des nucléotides un à un à partir d'une extrémité de l'ADN, ou des deux extrémités. Il en existe différents types.

- **Exemple 1** : la Bal31 obtenue de cultures d'*Alcaligenes faecalis*, éliminant des nucléotides à partir des deux extrémités des deux brins.
- **Exemple 2** : l'exonucléase III obtenue à partir de cultures d'*E. coli*, qu'on rencontre aussi chez *Haemophilus influenzae* catalysant l'hydrolyse séquentielle des nucléotides d'un ADN double brin à partir d'une extrémité 3' libre (3' → 5' exonucléase).

I.2.2. RNases

Ce sont des nucléases qui catalysent la dégradation de l'ARN en éléments plus petits. Elles sont divisées en endoribonucléases et exoribonucléases qui sont généralement extrêmement stables. Les organismes vivants et même les virus contiennent de nombreuses ribonucléases de différentes classes, ce qui reflète l'importance de la dégradation de l'ARN ;

- Nettoyeuses des ARN qui ne sont plus nécessaires,
- Les ribonucléases jouent un rôle clé dans la maturation de l'ensemble des molécules d'ARN, aussi bien les ARN messagers, que les ARN non codants retrouvés dans divers processus cellulaires.
- Leur capacité de dégradation d'ARN actifs, la rendent un premier moyen de défense contre les virus à ARN.

Les RNases à utilisation fréquente en biologie moléculaire sont les suivantes :

I.2.2.1. RNase T1 : Cette nucléase coupe en 3' de la guanosine donnant un guanosine 3' phosphate.

I.2.2.2. RNase A : C'est une ribonucléase couramment utilisée en recherche. Elle agit spécifiquement sur l'ARN simple brin. Elle coupe après (coté 3') les résidus pyrimidines (cytosine et uracile).

I.2.2.3. RNase H : Ce sont des endonucléases non spécifiques, assurant la dégradation des liaisons phosphodiester d'ARN hybride, dans un complexe ADN-ARN. La RNase H se trouve chez tous les organismes (archaea, bactéries et les eucaryotes). L'activité de cette enzyme a servi dans les manipulations de génie génétique pour retirer l'ARN après avoir fabriqué un brin d'ADNc par la reverse transcriptase.

I.3. Enzymes modifiant l'ADN

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

I.3.1. Méthylases : Il s'agit des enzymes qui catalysent l'ajout d'un groupement méthyle (CH_3) sur des résidus cytosine ou adénine. Les cytosines méthylées les plus connues précèdent un résidu guanine dans ce que l'on appelle les îlots CpG.. Pour que le DNA bactérien ne soit pas lui-même digéré, la bactérie produit aussi des méthylases spécifiques qui inhibent la digestion, donc les méthylases sont utilisées pour inhiber la digestion d'un fragment d'ADN par les nucléases. Les enzymes de restriction reconnaissant la même séquence, ne sont pas sensibles aux mêmes méthylation.

I.3.2. 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. Un vecteur ouvert ainsi traité ne pourra pas se refermer sur lui-même et cette fermeture redeviendra possible par intégration d'un ADN étranger.

I.3.3. Polynucléotide kinase: elle transfère le phosphate d'un ATP sur le phosphate en 5' d'un polynucléotide. Ce marquage en 5' s'effectue en vue de déterminer la séquence d'un ADN.

I.3.4. Topoisomérases: l'état physiologique de l'ADN est la forme superenroulée. Les topoisomérases sont capables de changer cette conformation. Ces enzymes sont surtout importantes pour l'étude de la réplication de l'ADN.

I.4. Ligases

L'ADN ligase dans la cellule, répare les discontinuités qui peuvent apparaître dans un ADN double brins, notamment lors de la réplication 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.

I.4.1. ADN ligase d'*E.coli* : La DNA ligase de *E. coli* ne lie les bouts francs de l'ADN qu'en présence de polyéthylène glycol ou Ficoll, mais elle est toujours active pour souder les fragments d'ADN double brin à extrémités collantes (cohésives), ou pour fermer une brèche dans un brin d'ADN dont la resynthèse est achevée. La DNA ligase d'*E. coli* utilise le NAD^+ comme coenzyme. Les DNA ligases sont utilisées dans le clonage des fragments d'ADN et dans la construction des vecteurs.

I.4.2. T4 ADN ligase : La DNA ligase du bactériophage T4 est moins spécifique que celle d'*E. coli*. Elle lie bien les fragments d'ADN à bouts francs et fonctionne dans la plupart des tampons utilisés par les enzymes de restriction. La T4 DNA ligase agit aussi mais moins rapidement sur les ARN. Cette enzyme utilise l'ATP comme donneur d'énergie.

I.4.3. Taq ADN ligase : Cette enzyme a la même activité que la T4 ADN ligase, mais elle nécessite du NAD à la place de l'ATP. Elle est plus stable et fonctionne à 45°C. Elle s'utilise dans des méthodes de détection de mutation, lorsqu'on veut faire plusieurs ligations successives entrecoupées d'une étape de dénaturation