**Université Mohamed Khider -Biskra-**

**Faculté des Sciences Exactes et des SNV**

**Département des SNV**

**TD n° 3 : Les enzymes utilisées en BMGG**

#### Les enzymes de restriction :

Les endonucléases de restriction sont des enzymes bactériennes (le plus souvent) qui fractionnent (hydrolysent) l’ADN en fragments reproductibles et définis. Ils ont la capacité de couper l’ADN bi-caténaire à des sites spécifiques de 4 à 6 paires de bases (parfois plus) appelés sites de restriction, et sont le plus souvent palindromiques, c’est-à-dire que le site de restriction présente un centre de symétrie, ce qui fait que la succession des nucléotides est identique pour le brin sens (lecture 5’→3’) et pour le brin anti-sens (toujours dans le sens de lecture 5’→3’).

 Chez les bactéries, elles participent en partie au mécanisme de défense contre une invasion d’ADN étranger, particulièrement d’origine virale. Le mécanisme de défense des bactéries vis-à-vis des virus est appelé système de restriction-méthylation. Pour détruire l'ADN du parasite, la bactérie exprime des gènes de restriction et de méthylation. Les gènes de restriction permettent la synthèse d'endonucléases coupant l'ADN en des sites très spécifiques. Afin de protéger l'ADN bactérien de l'hydrolyse par l'enzyme, une méthylase, codée par le gène de méthylation, va modifier les nucléotides de l'ADN bactérien en les méthylant pour qu'ils ne soient plus reconnus par l'enzyme de restriction.

**1.1. Types de coupures réalisées par les enzymes de restriction :**

Les enzymes de restriction peuvent donner deux types de coupures :

- la coupure à extrémités franches dites aussi bouts francs, la coupure a lieu au milieu du palindrome

- la coupure à extrémités sortantes dites aussi cohésives, on parle aussi de coupures décalées, la coupure a lieu de part et d’autre du centre de symétrie.

**1.2. Nomenclature des enzymes de restriction :**

Les enzymes de restriction présentent une nomenclature bien précise. Leur nom comporte trois à quatre lettres :

* La première lettre de dénomination de l’enzyme est écrite en majuscule, elle correspond au genre de la bactérie d’où a été extraite l’enzyme.
* La seconde lettre et la troisième lettre (en minuscules) correspondent à l’espèce de la bactérie d’où l’enzyme est extraite.
* On peut avoir une quatrième lettre écrite en majuscule correspondant à la souche bactérienne.
* Enfin pour terminer, un chiffre romain indique l’ordre de caractérisation de ces enzymes.

**Exemples : Eco RI** Extraite de *Escherichia coli* RYB site reconnu : G / AATTC

 **Sma I** Extraite de *Serratia marcescens* site reconnu : CCC / GGG

##### **1.3. Notion d’enzymes compatibles :**

Deux enzymes sont compatibles lorsqu’elles ont des sites de restriction différents mais donnent naissance aux mêmes extrémités cohésives. Ces fragments peuvent être facilement ligaturés.

**Exemple :** Les enzymes Bam HI et Mbo I.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Action de Bam HI | 5’ GGATCC 3’3’ CCTAGG 5’ | 5’ G 3’3’ CCTAG 5’ | (1) | 5’ GATCC 3’3’ G 5’ | (2) |
| Action de Mbo I | 5’ AGATCAGC 3’3’ TCTAGTCG 5’ | 5’ A 3’3’ TCTAG 5’ | (3) | 5’ GATCAGC 3’3’ TCG 5’ | (4) |

Ligatures possibles : (1) + (4) et (2) + (3).

##### **1.4. Notion d’isoschizomères :**

Des enzymes de restriction différentes peuvent reconnaître des mêmes sites spécifiques, on les appelle isoschizomères. Les isoschizomères fournissent souvent après clivage enzymatique des fragments dont les extrémités sont différentes.

**Exemple :**

Soit la séquence suivante: GGTACC, cette séquence est coupée par les deux enzymes :

Kpn I:

5’-G-G-T-A-C/C-3’
3’-C/ C-A-T-G-G-5’

Acc65 I:

5’-G/G-T-A-C-C-3’
3’-C-C-A-T-G/G-

**1.5. 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.
* Elles peuvent être utilisées pour préparer un fragment d’ADN d’un gène donné (insert) à être inséré dans un vecteur génétique comme un plasmide (ADN recombinés).
* Elles sont utilisées couramment pour rechercher des mutations dans le génome.
* Utilisation des sites de restriction comme marqueur sur l’ADN :
* Réalisation de **cartographies de restriction** de toute molécule d'ADN que l'on souhaite caractériser. Cela consiste à déterminer l'ordre des sites de restriction le long de cette molécule, qui vont produire, après "digestion enzymatique" de cette molécule, des fragments de tailles différentes dont la taille pourra être définie par électrophorèse.
* Analyse de l’ADN pour la détection de mutations qui se traduisent par la disparition ou l’apparition d’un site de restriction conduisant à une variation de la longueur des fragments de restriction (polymorphisme de longueur des fragments de restriction = RFLP = restriction fragments lenght polymorphisme), ….

**2. Les enzymes coupant l’ADN :**

**2.1. L’ADNase :**

L’ADNase utilisée au laboratoire est extraite du pancréas de bovin. Il s’agit d’une endonucléase qui coupe l’ADN double brin (mais aussi l’ADN simple brin). Elle conduit à des coupures au hasard, sans reconnaissance d’un site spécifique. On obtient des fragments de tailles variées (ou oligonucléotides). Cette enzyme est sensible à des ions bivalents (Mg2+ et Mn2+).

###### 2.2. La nucléase S1 :

Cette enzyme extraite d’un champignon, n’attaque que l’ADN simple brin. Elle n’attaque pas en principe les ADN doubles brins et les hybrides ADN-ARN.

**3. Les enzymes assurant la ligature : Les ligases**

Les ligases sont capables de lier par une liaison ester un fragment avec un groupement phosphate en 5’ et un groupement OH en 3’ et ceci en présence d’ATP. Elles peuvent effectuer des ligatures sur des fragments d’ADN avec bouts francs ou des bouts collants. Elles sont extraites de bactéries. Il existe ADN et ARN ligases.

**4. Les enzymes enlevant ou ajoutant des groupes phosphates :**

4.1. Enzymes enlevant des groupes phosphates :

Ces enzymes sont appelées **phosphatases**. Les phosphatases alcalines sont actives à pH alcalin. Elles permettent d’enlever le groupement phosphate situé en 5’ d’une chaîne d’ADN. Elles sont extraites de bactéries ou d’origine animale (intestins). Elles sont utilisées pour préparer de l’ADN recombinant.

4.2. Enzymes ajoutant des groupements phosphates :

Les **kinases** permettent de fixer un groupement phosphate en présence d’ATP. Ces kinases sont extraites de bactéries.

**5. Les enzymes recopiant les acides nucléiques :**

5.1. Propriétés générales :

Les enzymes recopiant une chaîne d’acide nucléique ont les propriétés générales suivantes :

- Elles synthétisent le nouveau brin dans le sens 5’→ 3’.

- Cette synthèse s’effectue de manière complémentaire et antiparallèle.

- Elles nécessitent la présence de nucléosides triphosphates (NTPs) ou de désoxynucléosides triphosphates (dNTPs).

###### 5.2. Les enzymes recopiant un ADNen ADN :

Ces enzymes sont des **ADN polymérases ADN dépendantes**. Elles ne sont pas capables de synthétiser le brin nouveau d’ADN sans la présence d’une amorce d’acide nucléique. Les ADN polymérases catalysent la réaction générale suivante :

**(dNMP)n + dNTP → (dNMP)n+1 + PPi**

Avec N = A, C, T ou G. (PPi = groupe pyrophosphate).

**Exemple1 : L’adn polymérase I (**extraite de E. Coli**) et le fragment de klenow**

Cette enzyme possède des propriétés polymérasiques, mais aussi des propriétés exonucléasiques. Il est important de préciser que les exonucléases peuvent couper les nucléotides un par un à partir d’une chaîne polynucléotidique avec une spécificité soit de l’extrémité 5’ (coupure 5’→ 3’), soit de l’extrémité 3’ (coupure 3’→ 5’). L’ADN polymérase I possède les deux activités exonucléasiques. Cette enzyme est constituée par une seule chaîne polypeptidique.

Au laboratoire, on utilise souvent une enzyme préparée à partir de l’ADN polymérase I qui est appelée fragment de KLENOW. Cette enzyme ne possède plus d’activité exonucléasique 5’→ 3’, il reste les propriétés polymérasiques et les propriétés exonucléasiques 3’→ 5’. L’activité 3’→ 5’ permet à l’enzyme au cours d’une synthèse d’un fragment d’ADN de contrôler si l’appariement de la base qui vient d’être ajoutée est conforme aux règles de complémentarité. Cette remarquable activité exonucléasique est encore appelée la fonction d’édition de l’enzyme.

**Exemple2 : La séquenase**

Cette enzyme est d’origine bactérienne mais elle ne possède plus d’activité 3’→ 5’. Elle est utilisée dans le séquençage de l’ADN.

**Exemple3 : La Taq polymérase**

La Taq polymérase est une ADN polymérase extraite de bactéries présentes dans les sources chaudes. Elle permet de travailler à des températures plus élevées que les températures usuelles. Elle est très utilisée dans les réactions d’amplification génique et également dans les réactions de séquençage de l’ADN. En principe, elle est dépourvue de l’activité exonucléasique 3’→ 5’.

###### 5.3. Les enzymes recopiant un ARN en un ADN :

**Exemple1 : La rétro-transcriptase ou transcriptase inverse**

Cette enzyme est surtout présente dans les rétrovirus. Elle permet de fabriquer à partir d’un ARN messager (ARNm) un ADNc.

Elle possède les propriétés suivantes :

- C’est une ADN polymérase qui synthétise le nouveau fragment dans le sens 5’→ 3’.

- Elle est ARN-dépendante.

- Elle est dépourvue de fonction d’édition. Elle peut donc insérer des bases par erreur.

- Elle a une activité ARNase.

La technique classique pour préparer un [ADNc](#ADNc) à partir d’un ARNm consiste tout d’abord à fournir une amorce à la rétrotranscriptase. Cette amorce peut être une séquence courte par exemple une séquence oligo (dT) capable de s’hybrider avec l’extrémité poly (A) du ARNm. A partir de cette amorce, la rétrotranscriptase poursuit la copie d’ARNm en ADN (élongation). De plus à la fin de la copie, elle est capable de recopier son propre travail, donc elle réalise une boucle à l’extrémité 3’ de l’ADN copié. Un traitement chimique doux permet de détruire le ARNm simple brin mais pas sa copie d’ADN simple brin. On ajoute ensuite de l’ADN polymérase pour réaliser une copie de l’ADN simple en ADN double brin. La nucléase S1 peut ensuite éliminer l’extrémité de l’épingle à cheveu. On a ainsi formé un ADNc double brin. D’autres techniques existent pour préparer d’ADNc à partir d’ARNm.

###### 5.4. Les enzymes recopiant un ADN en un ARN :

Les ARN polymérases réalisent des transcriptions de l’un des deux brins d’ADN en un brin d’ARN. Elles sont extraites des bactéries. Ces ARN polymérases possèdent les propriétés suivantes :

* Elles synthétisent le brin nouveau dans le sens 5’→ 3’.
* Elles n’ont pas besoin d’amorce pour commencer la synthèse (à la différence des ADN polymérases).
* Elles nécessitent des ribonucléosides triphosphates (ou NTPs) et également (comme les autres polymérases) des ions Mg2+.
* Elles sont dépourvues d’activité d’édition.
* Enfin, dans des conditions normales de transcription, les ARN polymérases ne peuvent démarrer la transcription que si l’ADN à transcrire possède le promoteur spécifique correspondant.