

### Module : Biologie moléculaire et Génie Génétique

## Chapitre I: Les enzymes de restriction et autre enzymes utilisés en biologie moléculaire

### I- Les enzymes de restrictions

#### Rappel: les bactériophages

Les bactériophages sont des virus qui infectent les bactéries. Ils sont composés d'un génome d'acide nucléique (ADN simple brin ou double brin ou ARN) entouré par une couverture protéique protectrice.

Les bactériophages ne peuvent se multiplier qu'en utilisant la machinerie moléculaire de la bactérie qu'ils infectent. L'infection d'une cellule par un phage peut suivre une voie lytique ou lysogénique.

- Infection lytique: le phage provoque la lyse de la cellule hôte après son injection. (exp phage T4)
- Infection lysogénique : le phage ne provoque pas la lyse immédiatement mais après une long période pendant laquelle il se développe en même temps que le génome bactérien. (exp phage lambda:  $\lambda$ )

#### 1- Les enzymes de restriction

Par fois, l'infection de la bactérie par le phage ne provoque ni la lyse de la cellule bactérienne ni la multiplication du phage. Ce constat expérimental peut résulter de deux phénomènes: **la lysogénie** ou **la restriction**. Dans le premier cas le DNA du phage est intégré dans le DNA bactérien sous forme silencieuse, néanmoins susceptible d'être réveillée par une agression physique (UV, chauffage...). Dans le second cas le DNA phagique est détruit dès son entrée dans la bactérie par un système de protection: **les enzymes de restriction**.

**Les endonucléases de restriction** sont des enzymes bactériennes participant à un mécanisme de défense des bactéries vis-à-vis des virus : système de restriction-méthylation. Elles catalysent la coupure de l'ADN non méthylé en des endroits caractérisés par une séquence spécifique de nucléotides (site de restriction). Les produits de cette digestion sont les fragments de restriction, dont la longueur, toujours la même pour un ADN donné, ne dépend que de la séquence primaire de cet ADN. 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').

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 (sur une adénine ou une cytosine) pour qu'ils ne soient plus reconnus par l'enzyme de restriction.

L'ensemble du gène de **restriction** et du gène de **méthylation** constitue un système de défense de la bactérie vis-à-vis des phages.

#### 2- 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**. Les séquences palindromiques sont des

séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5'→3' (gauche-droite) pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens droite-gauche pour le second brin (sens 5'→3'). Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4 ou 6 paires de bases.



Des enzymes de restriction différentes peuvent reconnaître des mêmes sites spécifiques, on les appelle *isoschizomères*.

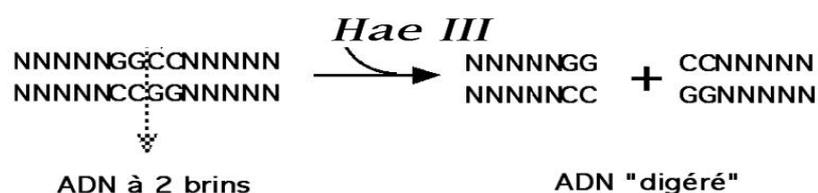
### 3- Nomenclature des enzymes de restriction:

Les enzymes de restriction présentent une nomenclature bien précise. Leur nom comporte plusieurs lettres (3 ou 4). 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.



**4- Types de coupures réalisées par les enzymes de restriction:** Les enzymes de restriction peuvent donner deux types de coupures: la coupure à **bouts francs** et la coupure à **bouts collants (cohésifs)**.

- **La coupure à bouts francs** aboutit à une coupure au milieu de la séquence palindromique, il ne peut donc pas y avoir d'association spontanée entre les fragments résultant de la coupure.



- **La coupure à bouts collants** (ou à extrémités adhésives) correspond à une coupure qui se fait de part et d'autre du centre de symétrie. Après une coupure de ce type les parties simple-brin complémentaires peuvent s'apparier.





- **Exemple d'application des enzymes<sup>4</sup> de restriction : Méthode de Southern Blot.**

Le DNA à analyser est complètement coupé par une ou plusieurs enzymes de restriction. Le produit de la digestion est ensuite migré sur un gel d'électrophorèse en agarose afin de séparer les fragments de restriction en fonction de leur taille.

Afin de visualiser le (ou les) fragment(s) d'intérêt, il est nécessaire de réaliser l'hybridation moléculaire entre ces fragments et une sonde moléculaire qui leur est complémentaire. Les conditions nécessaires à cette hybridation moléculaire étant incompatibles avec le support en agarose, SOUTHERN eut l'idée de réaliser une réplique du gel en transférant l'ADN sur un support solide constitué par une membrane de nitrocellulose avant l'hybridation. Ce support est aujourd'hui remplacé par une membrane de nylon. Précédant l'étape de transfert de l'ADN sur une membrane, l'ADN est rendu monobrin à l'aide d'un agent dénaturant (soude NaOH) de façon à ce qu'il puisse ensuite s'hybrider avec la sonde. Le transfert est obtenu par capillarité (**blotting**) en déposant le gel d'agarose recouvert de la membrane sur un système qui assure son hydratation. Un courant liquidien ascendant créé à l'aide d'une couche de papier absorbant et d'un poids va permettre le déplacement de l'ADN du gel vers la membrane. A la fin de l'opération qui dure quelques heures, la membrane contient l'ensemble des fragments d'ADN qui étaient contenus dans le gel et aux même positions que dans celui-ci : il s'agit donc d'une réplique exacte du gel d'électrophorèse.

L'ADN génomique transféré est ensuite fixé de façon irréversible sur la membrane par cuisson à 80°C (nitrocellulose) ou irradiation aux UV (nylon). Après une étape dite de préhybridation (préincuber la membrane avec de l'ADN pour en éliminer tous les sites qui n'ont pas été saturés par l'ADN lors du transfert) au cours de laquelle la membrane contenant l'ADN est mise dans les conditions de température, de pH et de salinité nécessaires à l'hybridation, celle-ci est réalisée en mettant en contact l'ADN génomique et la sonde moléculaire marquée à l'aide d'un traceur radioactif ou chimioluminescent. Cette étape d'hybridation est réalisée en milieu liquide et sous agitation. Lorsqu'une molécule d'ADN sonde va rencontrer une molécule d'ADN cible (fragment d'intérêt), la complémentarité des séquences va permettre la réassociation des deux molécules simple brin en une molécule double brin. Après une étape de lavage destiné à éliminer les molécules de sondes marquées qui ne se sont pas hybridées, la membrane est soumise à une autoradiographie qui va permettre la visualisation des fragments d'intérêt.

## II- Autres enzymes d'usage courant en biologie moléculaire

### 1- Les polymérases des acides nucléiques

#### ▪ La DNA polymérase I

La DNA polymérase I d'*Escherichia coli* (DNA pol I) est une protéine qui assure la fonction de réplication de l'ADN bactérien, par son activité DNA polymérasique dans le sens 5'→3' à partir d'une l'extrémité 3' OH d'une amorce d'ADN ou d'ARN. Une matrice d'ADN simple brin est indispensable; le DNA synthétisé est strictement complémentaire de la matrice.

La DNA pol I est douée d'une double fonction d'édition :

Une activité exonucléasique 5'→3' pour digérer le deuxième brin à partir de son extrémité 5' (*nick translation*)

Une activité exonucléasique 3'→5' pour digérer l'extrémité 3' d'un brin (correction immédiate des misappariements)

**Origine :** enzyme bactérienne extraite de *E. coli*

**Utilisation :** synthèse de DNA à partir d'une matrice, on utilisant des amorces synthétiques.

La construction de vecteurs à partir de DNA simple brin.

L'ADN pol I permet la détermination de la séquence de DNA par la méthode des di-désoxynucléotides.

#### ▪ Fragment de Klenow de la DNA polymerase I

La digestion de la DNA polymérase I par une protéase (subtilisine) donne deux fragments : celui de 76 kD (fragment de Klenow) possède encore deux des activités catalytiques de la polymérase : 5'→3' polymérase et 3'→5' exonucléase. Ce fragment peut-être utilisé pour synthétiser le deuxième brin à partir d'un ADN simple brin et d'une amorce.

Le fragment de Klenow est utilisé pour :

La synthèse du deuxième brin, complémentaire d'un cDNA ;

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 mutagénèse dirigée à partir d'oligonucléotides synthétiques.

#### ▪ LA T4 DNA polymérase

Dans une culture d'*E. coli* infectée par le bactériophage T4, on peut purifier la DNA polymérase de ce phage. L'enzyme est dépourvue d'activité 3'→5' exonucléase, mais elle possède une activité 5'→3' exonucléase 200 fois plus grande. L'activité de la T4 polymérase est aussi rapide que celle de la DNA polymérase I.

La DNA polymérase du phage T4 est utilisée pour le marquage du DNA.

#### ▪ La taq polymérase

DNA polymérase thermostable produite par *Thermus aquaticus* (une bactérie thermophile des sources chaudes), résistante à l'ébullition et active à 75-80 °C. La Taq polymérase est dépourvue d'activités d'édition (3'→5' exonucléase).

La Taq polymérase est utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* = PCR), technique courante d'amplification des fragments de DNA.

- **La terminal-transférase**

La transférase terminale catalyse l'addition de désoxynucléotides, sans matrice, sur une fonction alcool 3'OH terminale de l'ADN. Elle incorpore plus spécifiquement les purines ou les pyrimidines en fonction du cation divalent qu'on lui donne comme cofacteur : Mg<sup>++</sup> pour les purines, Co<sup>++</sup> pour les pyrimidines ou encore Mn<sup>++</sup>.

La transférase terminale du commerce est extraite du thymus de veau.

La transférase terminale est utilisée au laboratoire pour :

Construire des séquences polymérisées de nucléotides (queues) à l'extrémité 3'OH de l'ADN (en vue du clonage des fragments d'ADN) ;

Marquer les extrémités 3' de l'ADN avec un nucléotide marqué sur le phosphate  $\alpha$  ;

Ajouter un nucléotide à la fin d'une séquence pour induire une mutation (mutagenèse dirigée).

- **La polynucléotide phosphorylase**

Enzyme synthétise des RNA, sans matrice, à partir de ribonucléotides diphosphates en présence de Mg<sup>++</sup>. Cette enzyme possède aussi une activité nucléolytique qui permet de libérer des nucléotides monophosphates ainsi qu'une activité d'échange de phosphate en position  $\beta$  sur les ribonucléotides diphosphates.

Les formes commerciales sont extraites soit de *E. coli* soit de *M. luteus*.

Cette enzyme a été utilisée avant l'ère de la biologie moléculaire pour synthétiser les polynucléotides qui ont permis de déchiffrer le code génétique. Ses applications sont: la synthèse de polynucléotides froids et radioactifs, la dégradation de la queue poly A des messages eucaryotes, marquage intense de l'extrémité OH des polynucléotides, le marquage sur le phosphore en  $\beta$  des ribonucléotides diphosphates.

- **La reverse transcriptase**

Les transcriptases reverses sont des DNA polymérases qui peuvent synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc ou cDNA) en prenant un ARN comme matrice, pour former un hybride ADN:ARN. Elles catalysent donc la réaction inverse de la transcription, d'où le nom de transcriptases reverse.

Les transcriptases reverses sont produites par des cellules infectées par des rétrovirus, virus à ARN qui font synthétiser un ADNc par la cellule-hôte afin de permettre leur réplication.

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.

- **Les ARN polymerases**

Les ARN polymérases transcrivent l'un des brins d'ADN double brin en un brin d'ARN. La synthèse s'effectue sans amorce et nécessite des ribonucléosides triphosphates comme substrats (ATP, CTP, GTP et UTP), plusieurs cofacteurs protéiniques ainsi que des Mg<sup>++</sup>, la

synthèse s'effectue dans le sens 5'→3'. Elles sont essentielles au cycle des bactériophages à ADN comme le SP6 de *Salmonella typhimurium* ou le phage T7 d'*Escherichia coli*.

Les RNA polymérases des phages sont utilisées pour la transcription in vitro, pour la synthèse des sondes d'ARN et pour l'analyse des messagers (protection à la RNase).

## 2- Les ligases

### ▪ La DNA ligase de *E. coli*

Les DNA ligases sont des enzymes qui sont capables de reconstituer la liaison phosphoester entre le carbone 3'-OH et le phosphate-5' de deux nucléotides voisins sur un brin de DNA.

La DNA ligase de *E. coli* ne lie les bouts francs de l'ADN qu'en présence de réactifs d'exclusion (polyéthylène glycol ou Ficoll), mais elle est toujours active pour souder les fragments d'ADN double brin à extrémités cohésives. Elle utilise le NAD<sup>+</sup> comme coenzyme donneur d'énergie.

Les DNA ligases sont utilisées dans le clonage des fragments d'ADN et dans la construction des vecteurs.

### ▪ La T4 DNA ligases

La DNA ligase du bactériophage T4 est moins spécifique que celle de *E. coli* : elle lie bien les fragments de DNA 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.

La DNA ligase du phage T4 utilise l'ATP comme donneur d'énergie.

### ▪ La T4 RNA ligases

La RNA ligase du bactériophage T4 catalyse la liaison des fonctions 5'-phosphate des ADN ou ARN simple brin à la fonction 3'-OH d'autres fragments simple brin d'ARN ou d'ADN.

Une molécule d'ATP est nécessaire, elle est hydrolysée en AMP et PPi.

La RNA ligase du bactériophage T4 est utilisée pour le marquage des ARN sur leur extrémité 3' et pour la synthèse d'oligonucléotides.

## 3- les nucléases

### ▪ La DNase

Cette enzyme extraite du pancréas est une endonucléase coupant préférentiellement après une pyrimidine en libérant une extrémité 3' OH et une extrémité 5'P libres. Le DNA peut être aussi bien sous forme simple brin que double brin, dans le dernier cas la coupure peut se faire sur un seul brin aussi bien que sur les deux brins.

### ▪ La nucléase S1

La nucléase S1 est une nucléase spécifique des ADN (ou ARN) simple brin, 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 :

Pour faire des bouts francs aux extrémités des fragments d'ADN double brin ;

Pour hydrolyser les fragments d'ADN simple brin

Pour isoler les hybrides ADN:ARN lors de l'hybridation entre un gène et le cDNA correspondant ;

Pour ouvrir les épingles à cheveux formées lors de la synthèse des cDNA.

- **L'exonucléase III**

L'exodésoxyribonucléase III d'*Escherichia coli*, qu'on rencontre aussi chez *Haemophilus influenzae*, hydrolyse de préférence les extrémités 3'OH des DNA double-brin en remontant vers le côté 5'. (3'→5' exonucléase). Elle produit des nucléosides 5'-phosphate.

L'exonucléase III permet la formation de DNA simple brin à partir d'une de ses extrémités, sa conjugaison avec la nucléase S1 permet d'effectuer des délétions à des sites définis dans un DAN.

- **Les ARNses**

**Les ribonucléases A** : la ribonucléase A est l'enzyme de la digestion des ARN chez les animaux. Elle agit comme une endonucléase, préférentiellement après les nucléotides à pyrimidine, en hydrolysant la liaison entre le phosphate et le carbone 5' du nucléotide suivant. La ribonucléase pancréatique est une des plus petites et des mieux connues des enzymes. Elle est thermorésistante et extrêmement active.

Il existe des inhibiteurs de la RNase : soit des détergents comme le SDS (Dédocyl sulfate de sodium), soit des protéines comme celle extraite du placenta qui est souvent utilisée pour protéger les ARN dans les réactions enzymatiques.

**Les ribonucléases H** : La ribonucléase H est une ribonucléase bactérienne qui intervient dans la maturation des RNA amorces qui servent à initier la réplication des plasmides.

Elle est utilisée lors de la synthèse du deuxième brin d'un cDNA issu d'une transcription reverse, afin de limiter les brins synthétisés en dehors de l'amorce spécifique (*self-primed strands*).

**Autres enzymes importantes:**

- **La T4 polynucléotides Kinase**

La polynucléotide kinase catalyse le transfert du phosphate  $\gamma$  de l'ATP sur une fonction alcool du carbone 5' d'un ADN ou d'un ARN.

La polynucléotide kinase du commerce est extraite d'une bactérie (*E. coli*) infectée par le bactériophage T4.

La polynucléotide kinase est utilisée au laboratoire pour incorporer du phosphate radioactif ( $P^{32}$ ) sur l'extrémité 5' d'un acide nucléique, soit par transfert, soit par échange.

- **La phosphatase alcaline**

Retire le phosphate en 5' sur le DNA, les ARN et les nucléotides libres. L'hydrolyse libère un phosphate inorganique libre et une extrémité 5' OH. La phosphatase alcaline du commerce est celle extraite de l'intestin de veau.

La phosphatase alcaline est utilisée au laboratoire pour déphosphoryler les extrémités 5' des acides nucléiques, soit pour préparer un marquage en 5' par une polynucléotide kinase, soit pour empêcher la réannélation d'un ADN circulaire linéarisé (vecteurs de clonage).

**Enseignante responsable Mm R. GHARZOULI FERTOUL**