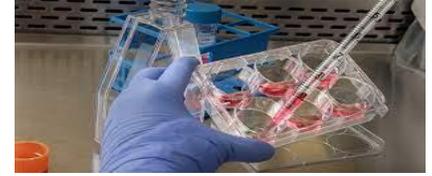




Génétique Microbienne
Génie Génétique
Chapitre I :
 Enzymes utilisés en biologie
 moléculaire



I. Enzymes utilisés en biologie moléculaire

1. Enzyme de restriction
2. Ligases
3. Polymérase
4. Autres enzymes

Tableau1 : Les nucléases.

Les nucléases	
Exonucléases	Endonucléases
Ces enzymes éliminent des nucléases un à partir d'une extrémité de l'ADN. Catalysant des nucléotides d'un ADN à partir d'une extrémité 3' libre	a)- Endonucléases : à clivage non spécifique b)- Endonucléases : à clivage spécifiques (Enzymes de restriction)

1. Enzyme de restriction :

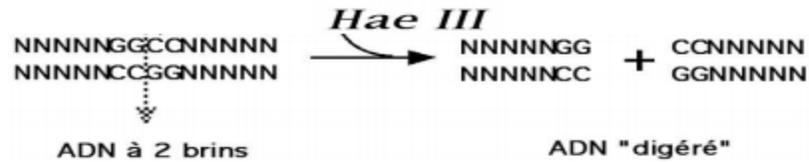
1.1. Définition :

Les enzymes de restriction sont des enzymes bactériennes participant à un mécanisme de défense des bactéries vis-à-vis des virus, ce sont des endonucléases a site de coupure précis, elle reconnaît généralement une séquence palindromique de 4 à 10pb et coupe l'ADN entre des bases déterminées de cette séquence. **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'). C'est par exemple le cas de la séquence suivante, qui est reconnue par l'enzyme appelée ***EcoRI***, une enzyme de restriction d'***E. coli*** :



1.2. Types de coupures : Les enzymes de restriction peuvent donner deux types de coupures.

- **Les coupures à bouts francs :** L'enzyme coupe exactement au même niveau sur les deux brins de la séquence en donnant des extrémités **franches**.



- Les coupures décalées : donnent des extrémités cohésives.



▪ 1.3. Nomenclature des enzymes de restriction :

Le nom de chaque enzyme est dérivé du nom de l'espèce et de la variété de la bactérie qui la produit. On écrit l'initiale du nom du genre, les deux initiales du nom de l'espèce, 1 lettre ou 1 nombre pour désigner la variété (ou souche) et après un espace un chiffre romain pour désigner successivement les différentes enzymes de restriction obtenues à partir de la même souche.



1.4. Restriction / Modification :

L'ADN bactérien présente des sites de restriction susceptible d'être repérés par les enzymes de restriction que possèdent la bactérie, Pour éviter que l'enzyme de restriction coupe l'ADN de son propre génome, la bactérie fabrique aussi une deuxième enzyme appelé méthylase qui reconnaît également le site de restriction.

La méthylase ne coupe pas l'ADN, mais le modifie en lui rajoutant un groupement méthyle sur un ou plusieurs nucléotides du site. Cette méthylation empêche la coupure, Ce mécanisme de défense, appelé système de restriction/modification.

Tableau2 : Exemple d'endonucléases de restriction.

Enzyme	Organisme producteur	Séquence reconnue	Coupure
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	Bouts Cohésifs
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC	Bouts Cohésifs
PvuI	<i>Proteus vulgaris</i>	GGATCG	Bouts Cohésifs
PvuII	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGGAG	Bouts Francs

2. ADN Ligases :

Dans la cellule, la fonction de l'ADN ligase est de réparer les ruptures monocaténaïres (« discontinuités ») qui surviennent dans des molécules d'ADN à double brin pendant, par exemple, la réplication de l'ADN. Les ADN ligases de la plupart des organismes peuvent également recoler deux fragments individuels d'ADN double brin.

- **ADN ligase d'*E. coli*** : est une enzyme extraite de la bactérie *E. coli* assurant la ligature entre deux extrémités cohésives. Cette ligase assure la formation des liaisons phosphodiester entre extrémité 3' OH et une extrémité 5' phosphate.
- **T4 ADN** : elle est capable d'effectuer des ligation entre 2 ADN à bouts francs.

3. Les polymérases :

Les ADN polymérases sont des enzymes qui synthétisent un nouveau brin d'ADN complémentaire à un modèle d'ADN ou d'ARN existant (figure 4.5a). La plupart des polymérases ne peuvent fonctionner que si le gabarit possède une région à double brin qui sert d'amorce pour l'initiation de la polymérisation. Quatre types d'ADN polymérase sont utilisés couramment dans le génie génétique. La première est l'ADN polymérase I, qui est habituellement préparée à partir d'*E. Coli*.

4. Autres enzymes :

➤ Fragment de Klenow :

L'hydrolyse (décomposition chimique faisant intervenir de l'eau) d'une molécule d'ADN polymérase I (molécule formée de 3 enzymes, intervenant dans la réplication de la molécule d'ADN chez la bactérie *Escherichia Coli*) la coupe en deux fragments distincts. Le plus grand de ces fragments, composé de 2 enzymes,

se nomme fragment de Klenow. Les enzymes formant le fragment de Klenow sont une enzyme polymérase et une enzyme exonucléase. Le second fragment ne porte qu'une enzyme exonucléase. Le fragment de Klenow, plus simple à utiliser que la molécule d'ADN polymérase entière, est souvent employé en laboratoire pour effectuer diverses expériences et recherches.

➤ **La transcriptase inverse :**

Elle transcrit l'ARNm en ADN complémentaire, elle polymérise l'ADN dans le sens 5' 3', et elle a besoin d'une amorce et d'une matrice (ARNm). La transcriptase réverse 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,

➤ **La terminale transférase :**

C'est une enzyme qui catalyse l'addition des nucléotides terminales en 3', la transférase terminale est utilisée au laboratoire pour ajouter une queue à l'extrémité 3' de l'ADN donc elle est surtout utilisée pour transformer les extrémités franches en cohésives). Marquer les extrémités 3' de l'ADN avec un nucléotide marqué.

➤ **L'ARN polymérase :**

C'est une enzyme qui transcrit l'ADN double brin en ARN simple brin, elle n'a pas besoin d'amorce. La Taq polymérase : C'est une enzyme ARN polymérase extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*, espèce bactérienne vivant dans les eaux chaudes et qui présente une grande résistance à la dénaturation thermique (thermorésistante). Elle est utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

➤ **DNase1 :** une endonucléase qui dégrade l'ADN double brin ou simple brin. Les coupures sont complètement aléatoires sans spécificité de site.

➤ **Nucléase S1 :** Cette enzyme extraite d'un champignon, elle dégrade l'ADN simple brin. Elle n'attaque pas les ADN doubles brins et les hybrides ADN-ARN.

➤ **RNase A :** est une nucléase qui catalyse la dégradation de l'ARN.

➤ **La phosphatase alcaline :** Les phosphatases sont des enzymes qui enlèvent les groupements phosphates situés en 5' d'un fragment d'ADN. Elle est active à pH basique. La phosphatase alcaline est utilisée au laboratoire pour déphosphoryler les extrémités 5' des acides nucléiques, soit pour préparer un

marquage en 5' par un polynucléotide kinase, soit pour empêcher la reconstitution d'un ADN circulaire linéarisé (vecteurs de clonage).

- **Les kinases** : à l'inverse des phosphatases, sont des enzymes qui ajoutent un groupement phosphate à l'extrémité 5'd'un ADN, en présence d'ATP. La polynucléotide kinase catalyse le transfert du phosphate de l'ATP sur une fonction alcool du carbone 5' d'un ADN ou d'un ARN. Elle est utilisée au laboratoire pour incorporer du phosphate radioactif sur l'extrémité 5' d'un acide nucléique.