

## Cours N°1/ Outils enzymatiques utilisés en biologie moléculaire

### 1. Enzymes de restriction

- Les enzymes de restriction sont d'origine bactérienne. Elles ont la particularité de couper les molécules d'ADN bi-caténaire (ou appelées encore double brin) à des sites spécifiques de la séquence : ce sont des endonucléases.
- Chaque enzyme de restriction reconnaît et coupe une séquence nucléotidique donnée.
- Le nom des enzymes de restriction provient du nom de genre et d'espèce de la bactérie de laquelle elles ont été isolées.
- Il existe trois types d'enzymes de restriction. Les types I et III sont des protéines complexes coupant l'ADN double brin en dehors de leur site de reconnaissance.
- Les enzymes de restriction de type II sont des 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. Une particularité de ces sites est qu'ils sont généralement palindromiques, c'est-à-dire que l'on a la même séquence sur les deux brins, mais en sens inverse.
- De très nombreuses enzymes de restriction sont disponibles dans le commerce. Elles sont généralement fournies avec leur tampon de réaction et la température optimale de fonctionnement est indiquée sur les catalogues. Il est possible de digérer un même fragment d'ADN par deux enzymes de restriction différentes. Si elles fonctionnent dans des conditions analogues (concentrations 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 chaque réaction enzymatique les conditions de l'expérience.
- Les enzymes de restriction utilisées coupent dans la séquence selon deux modes :
- **Coupure franche** : sont obtenues des extrémités franches 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** : sont générées des extrémités monocaténares (simple brin) ayant des séquences complémentaires appelées extrémités cohésives ou bouts collants.  
Exemple :
  1. L'enzyme de restriction EcoRI isolée de la bactérie *Escherichia coli* coupe l'ADN double brin dans la séquence palindromique G/AATTC.
  2. L'enzyme de restriction Pst I isolée de la bactérie *Providencia stuarti* coupe l'ADN double brin dans la séquence palindromique CTGCA/G
- Soit la séquence suivante : GGTACC, cette séquence est coupée par l'enzyme **Kpn I** et l'enzyme **Acc65 I** :

#### Kpn I:

5'-G-G-T-A-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-5'

Ces enzymes sont des **isoschizomères**, elles reconnaissent en effet la même séquences nucléotidique GGTACC, on voit tout de suite que les extrémités des fragments obtenus diffèrent.

**PALINDROME**

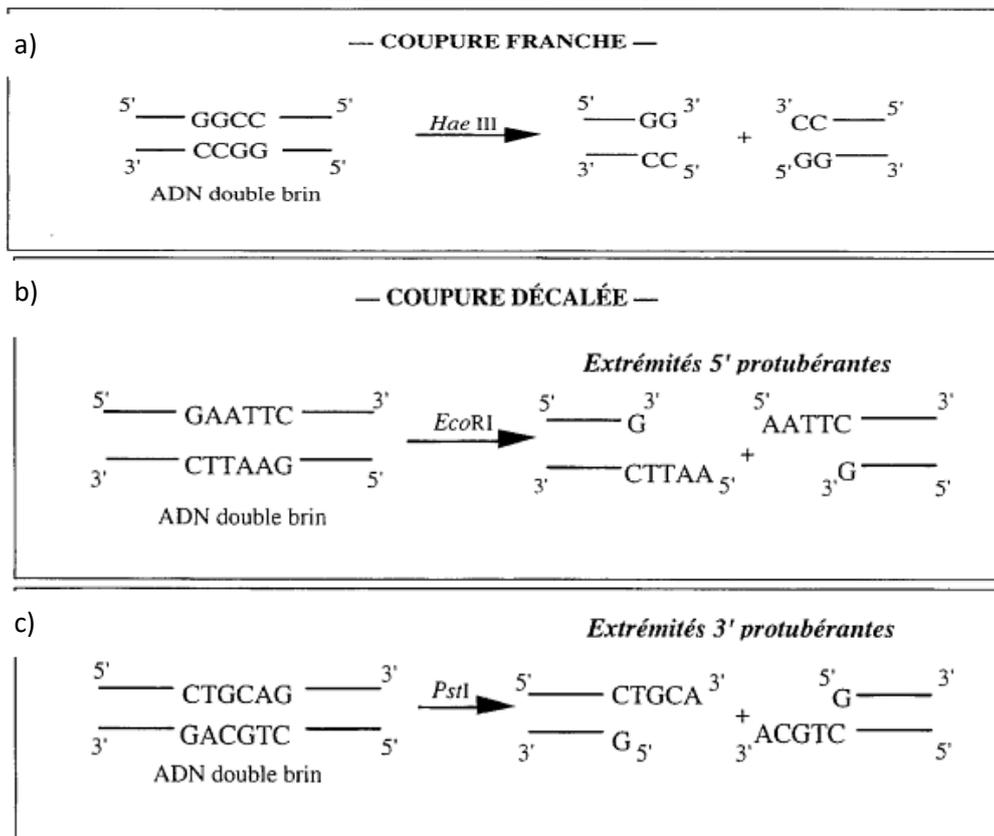
- RADAR
- LAVAL
- ELU PAR CETTE CRAPULE
- MADAM I'M ADAM

Sont des mots ou des phrases qui peuvent être lus d'une manière identique dans les deux sens. Dans l'ADN, les palindromes se présentent sous forme de séquences répétées et inversées où la même séquence (en gras) se trouve inversée si l'on passe d'un brin à son complément à partir d'un centre de symétrie.



Certains palindromes sont courts. C'est le cas des séquences reconnues par certaines **enzymes de restriction**. D'autres sont beaucoup plus longues séquences nucléotidiques. Ils marquent pour certaines la fin d'éléments génétiques mobiles, pour d'autres le lieu de recombinaisons spécifiques.

**ENZYMES DE RESTRICTION**



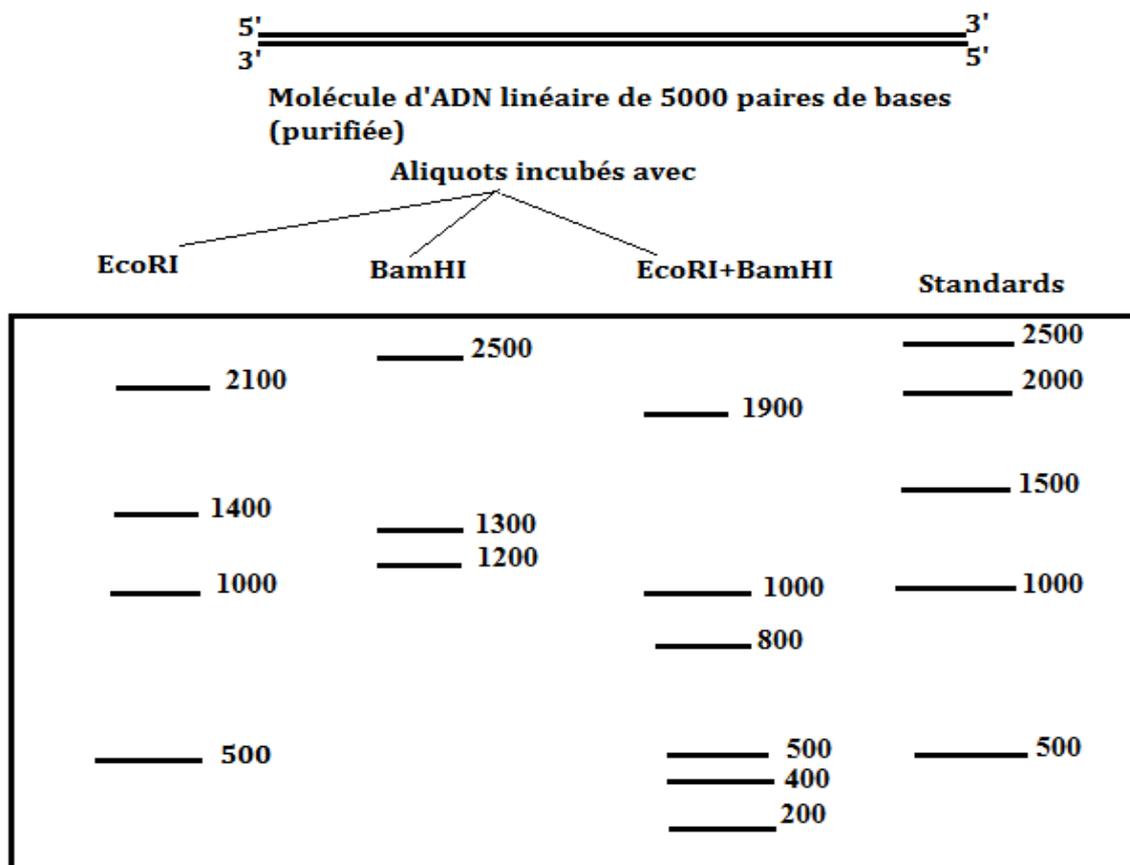
**Figure 1. Clivage de l'ADN par des endonucléases de restriction.** Dans l'ADN existent des séquences reconnues par des endonucléases de restriction. Ces séquences peuvent être de 4 ou 6 paires de bases. Les exemples présentés ont des sites à 6 paires de bases. Les trois types de clivage se distinguent par la nature des fragments obtenus : **a)** fragments à bords francs. **b)** fragments protubérants en 5'. **c)** fragments protubérants en 3'.

### Construction de la carte de restriction (cartographie)

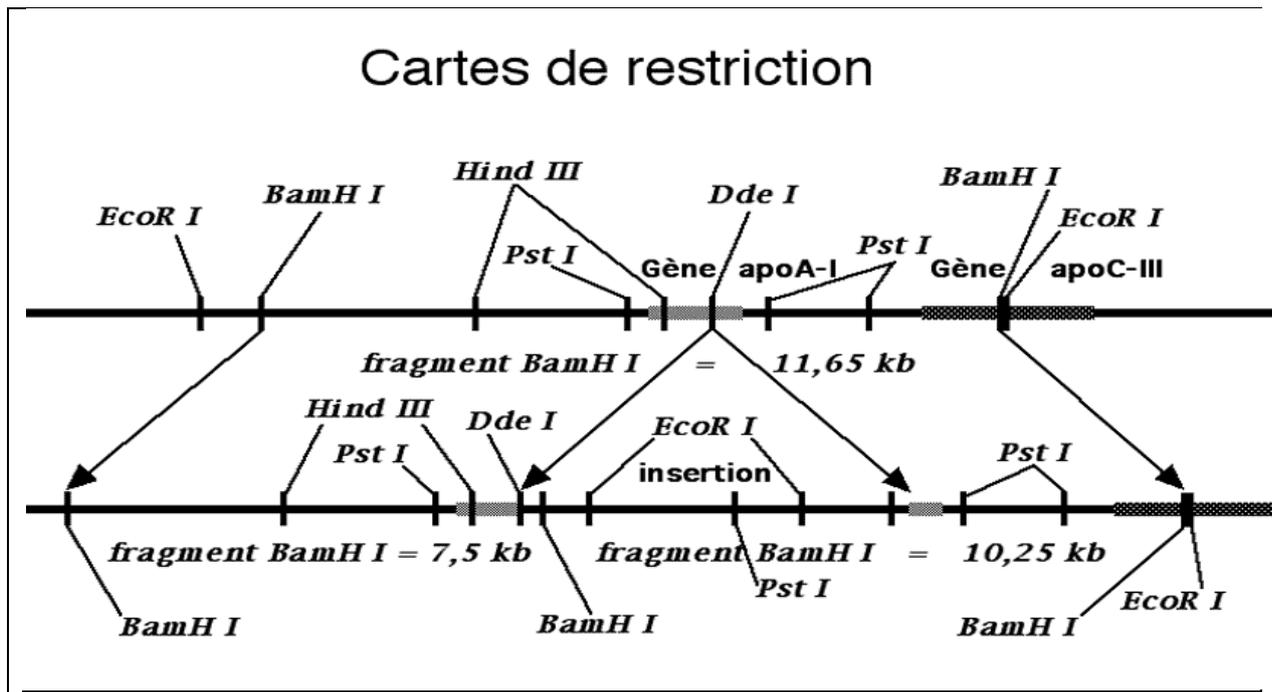
Soit une molécule d'ADN linéaire de 5000 paires de bases

Une digestion avec l'enzyme

- -EcoRI (E) permet d'obtenir 4 fragments : 2100, 1400, 1000, et 500 pb, il existe donc 3 sites de coupure (sites de restriction) pour cette enzyme.
- Bam HI (B) possède deux sites de restriction, elle coupe l'ADN en 3 morceaux : 2500, 1300 et 1200 pb.
- En ajoutant les deux enzymes en même temps dans le milieu d'incubation. Après digestion complète (tous les sites reconnus par l'une ou l'autre enzyme sont coupés) l'électrophorèse permet de séparer des fragments de 1900, 1000, 800, 600, 500 et 200 pb.
- Le raisonnement repose sur l'additivité parfaite des tailles : si le fragment E 2100 possède un site B à 200 pb de l'extrémité, les fragments générés par la double digestion seront de 200 et 1900 pb.
- On remarque que les fragments 1000 et 500 se trouvent à la fois dans la double digestion, il s'agit donc des extrémités.
- La suite repose sur le chevauchement des fragments produits par l'une ou l'autre enzyme, si l'on choisit 1000 pb comme premier site de coupure pour E, on doit trouver dans la double digestion un fragment « n » tel que  $1000 + \text{« n »} = \text{taille d'un fragment B}$  qui correspond au 1<sup>er</sup> site reconnu par B200 est candidat et l'on place un site B à 1200 pb de l'extrémité...et ainsi de suite.



**Figure 2. Electrophoregramme des séquences nucléotidiques**



**Tableau 1. Quelques nucléases de restriction couramment utilisées**

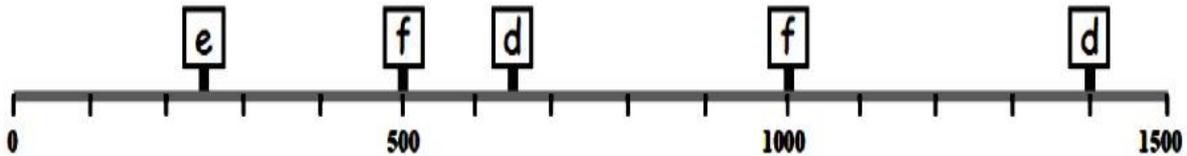
Nucléase	Source (rappelée dans le nom de l'enzyme)	Site reconnu
Hæ III	<i>Hæmophilus ægyptus</i>	GGCC CCGG
Mbo I	<i>Moraxella bovis</i>	GATC CTAG
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC CCTAGG
Eco RI	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC CTTAAG
Eco RII	<i>Escherichia coli</i>	GCCTGGC CGGACCG
Hpa II	<i>Hæmophilus parainfluenzæ</i>	CCGG GGCC
Taq I	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA AGCT
Bgl II	<i>Bacillus globiggi</i>	AGATCT TCTAGA
Hin dIII	<i>Hæmophilus infleuzæ</i>	AAGCTT TTCGAA
Pst I	<i>Providentia stuartii</i>	CTGCAG GACGTC

**EXERCICE 01 :**

Si nous travaillons avec un ADN linéaire tel que celui montré dans la figure ci-dessous,

- Quelle est la taille en paires de bases (pb) des fragments d'ADN obtenus en effectuant des digestions simples par les enzymes **d**, **e** et **f** et des doubles digestions avec diverses combinaisons entre eux ?

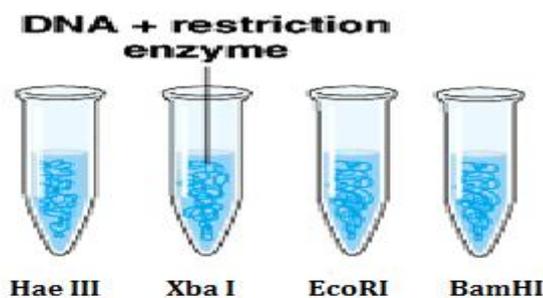
**NB : les chiffres correspondent au nombre de paires de bases d'ADN (taille totale est de 1500 pb)**



Digestion <b>e</b>	.....
Digestion <b>f</b>	.....
Digestion <b>d</b>	.....
Digestion <b>d+e</b>	.....
Digestion <b>d+f</b>	.....
Digestion <b>e+f</b>	.....

**Exercice 02:**

Dans le but d'établir une carte de restriction d'un fragment d'ADN génomique humain de 14.4 kpb. On réalise une série d'incubation en présence de plusieurs enzymes de restriction : **Hae III**, **Xba I**, **EcoRI** et **BamHI**. Après chaque incubation, l'échantillon est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium et l'électrophorégramme est révélé par fluorescence en UV. Les résultats obtenus sont les suivants :



**a) L'action de Hae III sur l'ADN génomique conduit à l'obtention de 2 bandes de 6.9 et 7.5 Kpb.**

-le fragment de 6.9 Kpb, incubé en présence de BamHI fournit 4 bandes de 0.7-1.1-1.8 et 3.3 Kpb et incubé en présence de EcoRI donne 2 bandes de 3.2 et 3.7 Kpb.

-le fragment de 7.5 Kpb incubé en présence de Bam HI fournit 2 bandes de 3.3 et 4.2 Kpb et incubé en présence de EcoRI fournit 4 bandes de 1.5-1.75-2-et 2.25 Kpb.

**b) L'action de XbaI sur l'ADN génomique aboutit à la formation de 3 fragments de 1.3, de 2.5 et 10.6 Kpb.**

**c) L'action de EcoRI sur l'ADN génomique conduit à l'obtention de 5 bandes de 1.75-2-2.25-3.2-5.2 Kpb.**

-Seuls les bandes de 2.25 et 3.2Kpb sont sensibles à une incubation en présence de XbaI et sont clivées en 2 fragments de 0.5 et 1.75 Kpb pour la bande 2.25, de 1.3 et 1.9 Kpb pour la bande 3.2

-De la même manière seule la bande de 5.2 Kpb est clivée en deux fragments de 1.5 et 3.7 Kpb par HaeIII.

-Enfin, les bandes de 2.25 et 5.2 Kpb sont seuls sensibles à l'action de BamHI et fournissent respectivement une bande de 2.20 Kpb et 3 fragments de 0.7-1.8 et 2.6Kpb.

**d) Enfin l'action de BamHI sur l'ADN génomique initial fournit 5 fragments de 0.7-1.8-3.3-4.2-4.4 Kpb.**

A l'aide de ces données établir la carte de restriction complète du fragment d'ADN génomique.