



République Algérienne Démocratique et Populaire
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF
Département de Génétique Moléculaire et Appliquée

COURS 3:

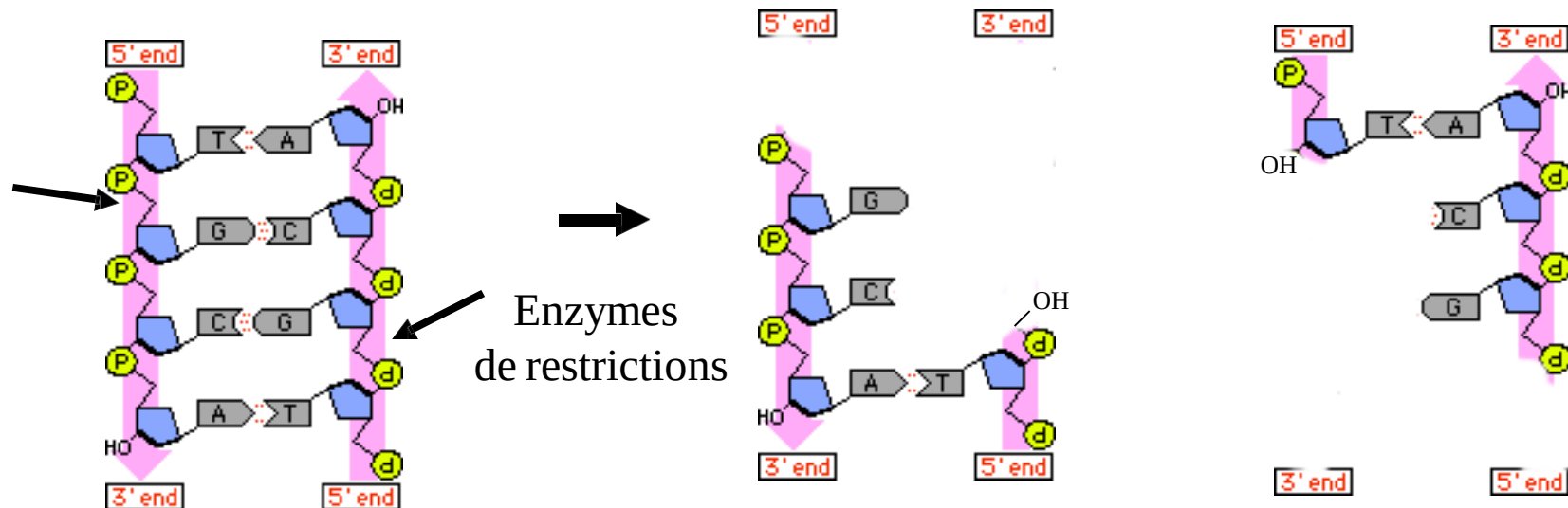
LES OUTILS ENZYMATIQUES EN GÉNIE

GÉNÉTIQUE

Dr ABDI Meriem
Génie génétique, Licence 3 Biochimie

LES ENZYMES DE RESTRICTION

- Les enzymes de restriction sont des endonucléase qui peuvent couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence spécifique (4 à 6 paires de bases) appelée site de restriction.



LES ENZYMES DE RESTRICTION

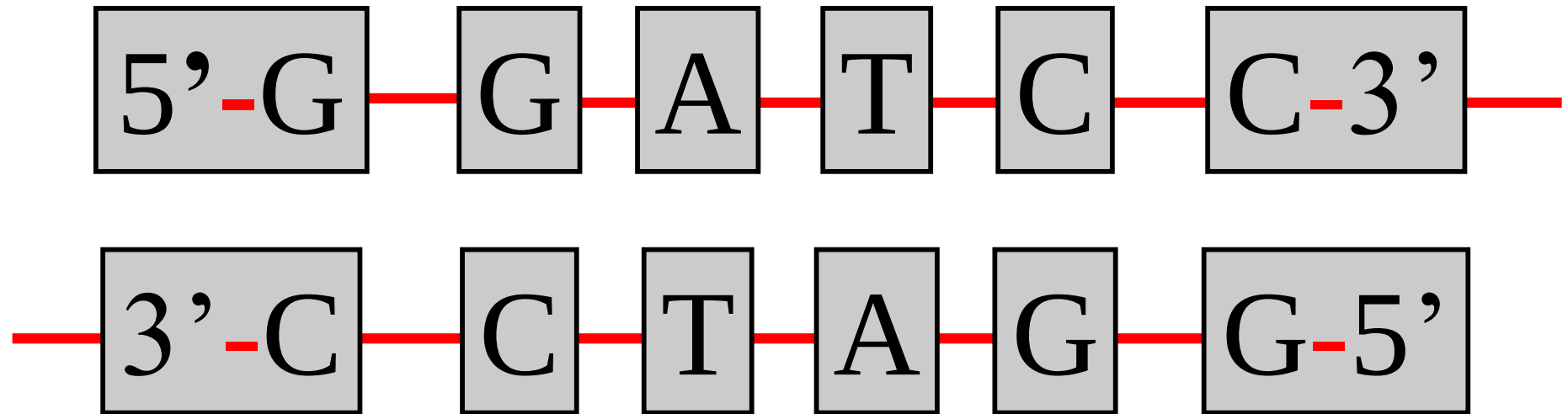
- Plusieurs centaines d'enzymes de restriction sont actuellement connues, on en retrouve naturellement dans un grand nombre d'espèces de bactéries.
- Elles sont produites par les bactéries pour se protéger de l'ADN étranger provenant d'autres organismes.
- Elle constitue un mécanisme de défense contre les infections par les bactériophages, des virus spécifiques des bactéries.

LES ENZYMES DE RESTRICTION

- Les enzymes de restrictions appartiennent à la classe des endonucléases, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur de la chaîne d'un acide nucléique.
- Les endonucléases diffèrent des exonucléases, puisqu'elles peuvent cliver les brins d'acide nucléique de manière interne, alors que les exonucléases n'attaquent la molécule d'acide nucléique qu'au niveau de ses extrémités.

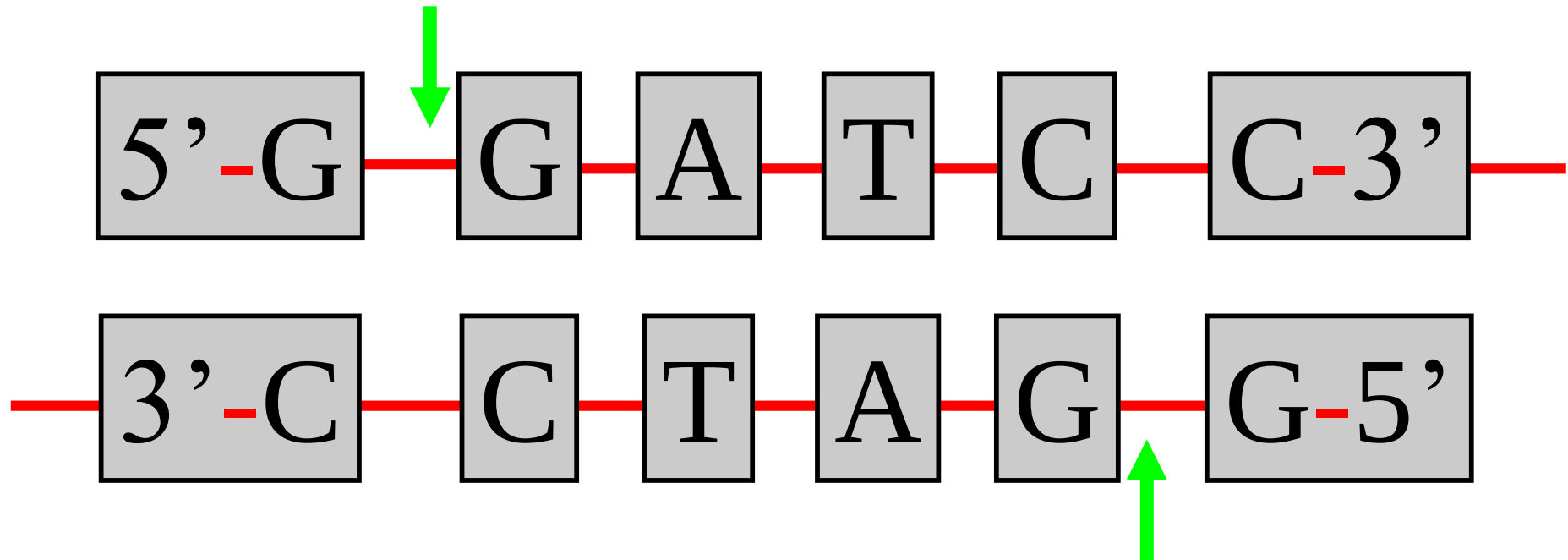
SÉQUENCES RECONNUES PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION

- Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des séquences dites **palindromiques**. Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4, 5 ou 6 paires de bases.



SÉQUENCES RECONNUES PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION

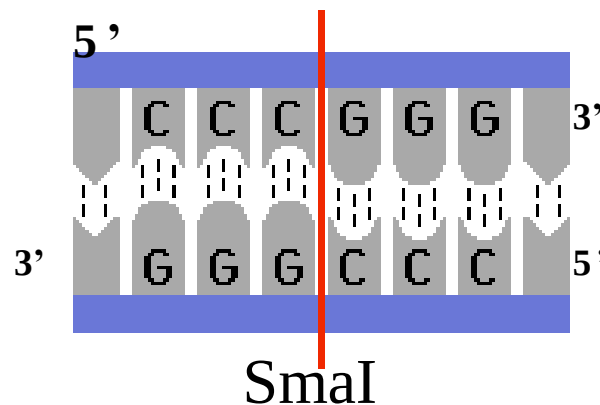
Les enzymes de restriction clivent au niveau des liaisons phosphodiester.



Lorsqu'une endonucléase de restriction coupe un ADN, plusieurs
extrémités peuvent être générées

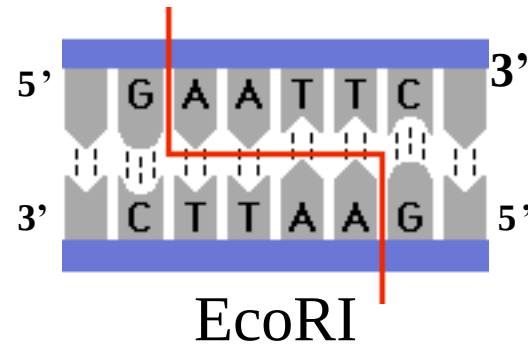
EXTREMITES FRANCHES OU BOUTS FRANCS

- La coupure a lieu au milieu du site de restriction.
- Pas de liaison spontanée entre les fragments qui ont résulté de cette coupure.
- La T4 ligase peut rétablir la ligation des deux brins d'ADN.

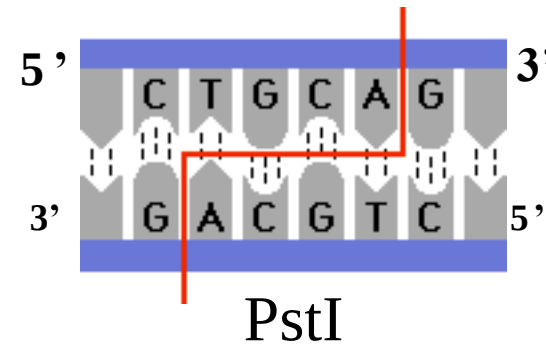


EXTREMITES COHESIVES OU BOUTS COHESIFS

- Les coupures sont décalées l'une par rapport à l'autre sur les deux brins.
- Les parties simples brins peuvent s'apparier.



5'rentrant



5'sortant

NOMENCLATURE DES ENZYMES DE RESTRICTION

Le nom comporte 3 ou 4 lettres correspondant à la bactérie à partir de laquelle l'enzyme est extraite:

- La première lettre correspond à la première lettre du genre de la bactérie
- La seconde et troisième lettre en minuscule correspondent aux deux premières lettres de l'espèce bactérienne
- La quatrième lettre correspond à la souche bactérienne, elle n'est pas présente dans toutes les enzymes de restriction
- Un chiffre romain pour le numéro d'ordre de caractérisation de l'enzyme

NOMENCLATURE DES ENZYMES DE RESTRICTION

Exemple : Enzyme de restriction **EcoRI**

Genre: Escherichia

Espèce: coli

Souche: RY317

Ordre de découverte: (I)

TYPES D'ENZYMES DE RESTRICTION

Selon la relation spatiale entre la séquence reconnue et le lieu de coupure, on distingue trois types d'enzymes de restriction:

Enzymes de type I : L'enzyme reconnaît un site particulier qui n'a aucune symétrie et coupe l'ADN à environ 1000 jusqu'à 5000 nucléotides plus loin.

Enzymes de type III : L'enzyme reconnaît une séquence mais coupe à une vingtaine de paires de bases plus loin

TYPES D'ENZYMES DE RESTRICTION

Enzymes de type II : les plus utilisées en génie génétique. Leurs sites de restrictions sont des séquences palindromiques. Elles coupent au niveau de leurs sites de restriction.

Enzyme	Source	Sequence reconnue	Coupure	Extrémités (après coupure)
Eco RI	<i>Escherichia coli</i>	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'	Cohésives
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'	Cohésives
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'	Cohésives
MstII	<i>Microcoleus species</i>	5'CCTNAGG 3'GGAMTCC	5'---CC TNAGG---3' 3'---GGAMT CC---5'	Cohésives
TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	5'TCGA 3'AGCT	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'	Cohésives

PROBABILITE DE COUPURE

Quelle est la probabilité de trouver un site Sau3A (5'-GATC) dans une séquence d'ADN composée de 25% de A, 25% de G, 25% de C et 25% de T ?

En une position quelconque on a une chance sur 4 de trouver un G (base 1 du site).
Si une position est indépendante de la suivante, la probabilité de trouver juste après, un A est également $\frac{1}{4}$.

Trouver la sous séquence GATC a donc une probabilité de $(\frac{1}{4})^4 = \frac{1}{256}$.

Ce qui signifie qu'en moyenne on rencontre un site Sau3A toutes les 256bp et que l'enzyme de restriction Sau3A va donner des fragments d'une taille moyenne de 256bp.

AUTRES OUTILS ENZYMATIQUES

I. EXONUCLÉASES

Des enzymes qui éliminent des nucléotides un à un à partir d'une extrémité de l'ADN.

Exemple :

- **Bal31**: obtenue de cultures d'*Alcaligenes eschschschmannii*, elle élimine des nucléotides à partir des deux extrémités des deux brins.
- **L'exonucléase 3**: obtenue à partir d'*E. coli*, elle catalyse l'hydrolyse séquentielle des nucléotides d'un ADN à partir de l'extrémité 3' libre.

AUTRES OUTILS ENZYMATIQUES

II. ENDONUCLÉASES NON SPECIFIQUES

Des enzymes capables de rompre des liaisons phosphodiester internes.

Exemple :

- **La DNase 1:** extraite du pancréas, coupe préférentiellement après une base pyrimidique.
- **La nucléase S1:** extraite de culture d'*Aspergillus oryzae* dégrade seulement les acides nucléiques monocaténaux.

AUTRES OUTILS ENZYMATIQUES

III. LES POLYMÉRASES

Sont des enzymes qui synthétisent un nouveau brin d'ADN complémentaire à une matrice d'ADN ou ARN.

Deux types de polymérases sont couramment utilisées en génie génétique :

- **L'ADN polymérase I:** Extraite d'E-coli, elle se fixe à une région monobrin et synthétise totalement le brin complémentaire. L'activité polymérasique s'effectue dans le sens 5'-3' à partir d'une amorce 3'OH.

AUTRES OUTILS ENZYMATIQUES

III. LES POLYMÉRASES

- **La transcriptase réverse:** Codée par les gènes Pol des rétrovirus, elle transcrit l'ARN en ADN complémentaire.

L'activité polymérasique s'effectue dans le sens 5' vers 3'.

AUTRES OUTILS ENZYMATIQUES

IV. LES LIGASES

Des enzymes qui permettent de relier deux fragments d'ADN double brins.

- **ADN ligase:** elle assure la formation des liaisons phosphodiester entre une extrémité 3'OH et une extrémité 5'phosphate de fragments d'ADN à bout cohésifs.
- **T4 ligase:** Elle est capable d'effectuer des ligations entre deux fragments d'ADN a bouts francs.

UTILITÉS DES ENZYMES DE RESTRICTION

Les enzymes de restriction peuvent être utilisées en génie génétique pour:

1. Etablir une carte génétique appelée « carte de restriction » d'une molécule d'ADN. Cette carte donne l'ordre des sites de restriction le long de cette molécule, et la taille des fragments produits.
2. Faire produire à des cellules hôte une protéine exogène. Les enzymes de restriction jouent un rôle crucial dans ce processus car elles permettent l'intégration d'un brin d'ADN exogène dans un plasmide dans le but de l'exprimer dans la cellule hôtes.