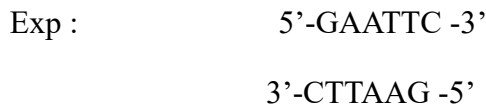


# 1 Les enzymes de restriction :

## 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 à 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').



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

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

Ex : *Hae* III



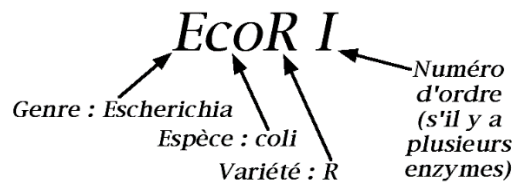
1.2.2 Les coupures décalées donnent des extrémités cohésives.

Ex : *EcoR* I



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 appelée 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**.

#### 1.5 Enzymes spécifiques :

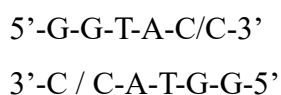
Deux enzymes de restriction sont dites compatibles quand elles génèrent après digestion des fractions aux extrémité cohésives complémentaire, ces fragments peuvent être facilement ligaturés.

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

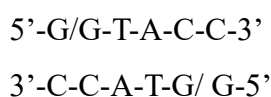
Exemple :

La séquence suivante : GGTAAC, cette séquence est coupée par l'enzyme Kpn I et l'enzyme Acc65 I :

Kpn I:



Acc65 I:



Les enzymes de restriction sont utilisés pour établir une carte 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

## **2 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,

## **3 ADN polymérase I**

Elle possède trois activités :

- Activité polymérasique 5'- 3', à partir d'une amorce en 3' d'ADN et d'une matrice d'ADN.
- Activité exonucléasique dans le sens 5'- 3', et 3'- 5'  
Cette enzyme est utilisée pour préparer les sondes.

### **3.1 Fragment de Klenow de l'ADN polymérase**

- Le fragment de Klenow est préparé à partir de la DNA polymérase I d'E. coli. Ce fragment ne possède plus d'activité exonucléasique 5'-3' mais garde l'activité polymérasique et l'activité exonucléasique 3'-5'. Le fragment de Klenow est utilisé pour :
- La synthèse du deuxième brin complémentaire d'un ADNc ;
- Le marquage de l'ADN par la technique des amorces aléatoires (multiamorsage au hasard).
- Le séquençage de l'ADN

## **4 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

## 5 L'ARN polymérase

C'est une enzyme qui transcrit l'ADN double brin en ARN simple brin, elle n'a pas besoin d'amorce.

### 5.1 La Taq polymérase : C'est une enzyme ARN polymerase 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),

## 6 Les ligases

- Les ADN ligases ont pour fonction de relier de façon covalente deux fragments d'ADN ou d'ARN, Grâce à une molécule d'ATP qui leur fournit l'énergie nécessaire, les ADN ligases créent une liaison phosphodiester entre deux nucléotides.
- **ADN ligase d'*E. coli*** : est une enzyme extraite de la bactérie *E. coli* assurant la ligature entre deux extrémités cohésives.
- **ADN ligase T4** : provient du phage T4 et elle assure la formation de la liaison phosphodiester entre deux extrémités franches, elle est utilisée pour l'insertion de l'ADN étranger dans un vecteur.
- **ARN ligase T4** : relie deux ARN

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

8 **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.

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

## 10 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 une polynucléotide

kinase, soit pour empêcher la reconstitution d'un ADN circulaire linéarisé (vecteurs de clonage).

- 11 **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.