

## Introduction

Au cours du clonage d'un gène, il est nécessaire d'obtenir de l'ADN purifié et de construire une nouvelle molécule d'ADN recombinée, c'est à dire introduire une petite molécule d'ADN dans un vecteur. Pour cela, il est nécessaire de couper les molécules d'ADN en des sites spécifiques : l'ADN à cloner et le vecteur, pour les fusionner de façon contrôlée. D'autres manipulations peuvent être réalisées : raccourcissement, allongement, copies en de nouvelles molécules ADN ou ARN, modifiées ou non... Ces différentes manipulations sont effectuées avec des enzymes spécifiques.

### I. Les nucléases

Les nucléases dégradent les molécules d'ADN en rompant les liaisons phosphodiesteres. Il existe 2 types de nucléases :

**1. Exonucléases** : éliminent des nucléotides à partir d'une extrémité de l'ADN. Ex : *Bal31* : élimine des nucléotides à partir des 2 extrémités des 2 brins ; l'exonucléase 3 d'*E.coli* hydrolyse séquentiellement des nucléotides d'ADN en 3'.

### 2. Endonucléases

**a) à clivages non spécifiques** : coupent des liaisons phosphodiesteres internes. La DNase 1 extraite du pancréas, coupe préférentiellement après une base pyrimidique en 3'OH et en 5'P les ADN simple et double brin. La nucléase S1 d'*A. oryzae* dégrade seulement les acides nucléiques monocaténares.

**b) à clivage spécifique (endonucléases de restriction)** : Ce sont des enzymes produites par de très nombreuses bactéries permettant l'ouverture spécifique du vecteur et le découpage défini de l'ADN bicaténaire à cloner. Elles sont classées en 3 types :

**Type I** : l'enzyme reconnaît sa séquence puis se déplace sur l'ADN et s'arrête de manière aléatoire 1000 à 5000 paires plus loin et libère quelques dizaines de nucléotides.

**Type II** : une fois la séquence reconnue, l'enzyme coupe l'ADN au niveau de cette séquence (les plus utilisés en BioMol)

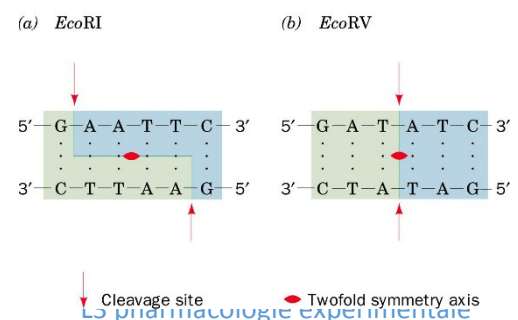
**Type III** : après reconnaissance de la séquence spécifique, ces enzymes découpent l'ADN une vingtaine de nucléotides plus loin.

**Remarque** : ces enzymes participent à un mécanisme de défense « système immunitaire » des bactéries vis-à-vis des virus : "système de restriction méthylation". Les endonucléases de restriction coupent l'ADN étranger à des sites spécifiques. Et afin de protéger l'ADN bactérien de l'hydrolyse par les enzymes, une méthylase va méthyler l'ADN au niveau des sites de coupure pour qu'ils ne soient plus reconnus par l'enzyme de restriction.

Les sites spécifiques ou sites de restriction sont généralement des séquences de **nature palindromique**, c'est-à-dire que la lecture des deux brins complémentaires dans **des sens opposés donne la même séquence**, (« *madam / madam* »). Ex :  $\downarrow$  5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'  $\uparrow$ .

Les enzymes de restriction de **type II** provoquent 2 types de coupure :

- Une coupure franche** c'est-à-dire au même niveau sur les deux brins ; ce sont les bords ou les **bouts francs** : la coupure a lieu au niveau de l'axe de symétrie. Il ne peut pas y avoir de liaison spontanée entre les fragments qui ont résulté de cette coupure.



Seule une **T4 ligase** peut rétablir la ligation des deux brins d'ADN résultant de la coupure.

- 2- **Une coupure décalée** sur les deux brins. On parlera alors d'extrémités (bouts) cohésives (collantes). Les coupures sont décalées l'une par rapport à l'autre sur les deux brins. Les parties simples brins peuvent s'apparier, d'où la possibilité de lier des fragments d'ADN d'origines différentes : c'est le phénomène de la recombinaison génétique. Utilisation : cartographie des gènes, clonage..). GAATTC

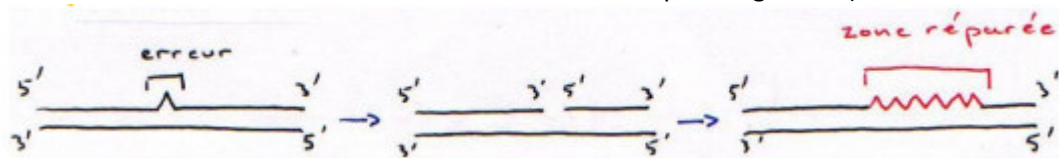
Remarque : les nucléases peuvent porter le nom de leur substrat : DNase (ADN) et RNase (ARN), exemple : la RNase H qui possède 3 activités : une activité endonucléase et 2 activités exonucléase : 3'5', 5'3'.

## II. Les polymérases et enzymes apparentées

Sont des enzymes qui synthétisent un nouveau brin d'ADN complémentaire à une matrice d'ADN ou ARN. La plupart des polymérases ne peuvent fonctionner que si la matrice d'ADN ou d'ARN possède une région double brin qui agit comme amorce pour l'initiation de la polymérisation. Toutes les polymérases synthétisent les acides nucléiques de 5' vers 3'.

Les polymérases les plus couramment utilisés en génie génétique :

1. **ADN polymérase I** : Extraite d'E. coli, a une activité 5'-3' polymérase, une activité 3'-5' exonucléase (activité de correction) et une activité 5'-3' exonucléase (activité de réparation : répare plus que ce qui est nécessaire : elle permet ainsi le renouvellement de l'ADN. Cette activité est parfois gênante).



2. **Fragment de Klenow** : obtenu par digestion enzymatique de la polymérase I d'E. coli.

Il est dépourvu d'activité exonucléase 5'-3'. La **T4 polymérase** : possède les mêmes propriétés.

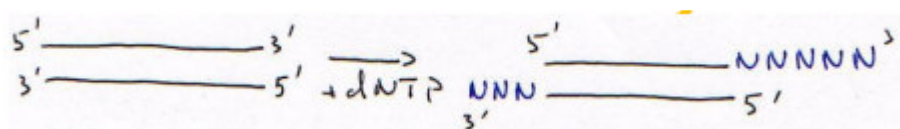
3. **Transcriptase reverse** : ou DNA polymérase ARN dépendante, trouvée chez les rétrovirus, cette enzyme transcrit l'ARN (matrice) en ADN complémentaire (cADN) en 5' vers 3'.

## 4. ADN polymérases thermostables

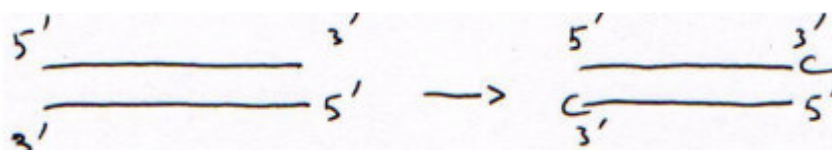
La Taq ADN polymérase est initialement extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* dans les sources géothermiques de Yellowstone National Park (États-Unis). Son avantage est d'être thermostable, active à 74°C avec une demi-vie de 40min à 95°C, utilisée dans la technique PCR, en vue d'une amplification de l'ADN in vitro. Elle ne possède que l'activité polymérase.

## 5. La terminale transférase

Cette polymérase n'a pas besoin de matrice comme les autres polymérases, elle ajoute des nucléotides en 3' à l'extrémité du brin d'ADN. Si on veut en ajouter qu'un seul nucléotide, on ajoute un ddNTP. Avec un ribose sans fonction OH en 3', la synthèse est arrêtée au bout d'un nucléotide. Ce nucléotide sans fonction OH est dit didéoxynucléotide (ddNTP).



Ajout d'un seul nucléotide



Utilisation : Fabrication d'une queue homopolymérique, fabrication d'une extrémité cohésive en 3'.

## III. Les ligases

Ce type d'enzyme permet de relier les 2 fragments d'ADN double brins. La ligation entre deux molécules d'ADN par une liaison covalente entre l'extrémité 3'-OH d'un brin et celle 5'-P de l'autre brin est le résultat

de l'action d'une ligase. Dans la cellule, l'ADN ligase répare les discontinuités qui peuvent apparaître dans l'ADN, notamment lors de la réplication.

- **L'ADN ligase d'E. coli** : lie des extrémités cohésives double brin d'ADN. L'ADN ligase d'E. coli est inefficace pour liguer des extrémités franches ou pour liguer de l'ARN.
- **La T4 ARN ligase** : lie 2 ADN à bouts francs. Catalyse aussi la jonction entre un 5'P d'un ARN ou d'un ADN simple brin avec un 3' OH.
- **La T4 DNA ligase** fonctionne sur de l'ADN double brin avec au moins, une liaison OH-Phosphore.

#### IV. Enzymes modifiant l'ADN

Enzymes modifient l'ADN par addition ou suppression de groupes chimiques spécifiques. Les principales sont :

1. **Les phosphatases** : retirent le phosphate en 5' sur l'ADN, l'ARN et les nucléotides libres. L'élimination des phosphates en 5' empêche toute action des ligases. Un vecteur ouvert ainsi traité ne pourra pas se refermer sur lui-même et cette fermeture redeviendra possible par intégration d'un ADN étranger.
2. **T4 polynucléotide kinase** : transfère le phosphate de l'ATP sur le 5'OH de l'ADN ou l'ARN.  
Utilisation : marquage de l'extrémité 5' de l'ADN (P32) ou des oligonucléotides.

#### 3. Les méthylases

Ces enzymes reconnaissent les mêmes sites que les endonucléases de restriction. Elles catalysent la méthylation du carbone 5 de certaines cytosines et de l'azote 6 des adénines pour empêcher la coupure par l'endonucléase de restriction. **Utilisation** : on pourra utiliser ces méthylases pour inhiber la digestion d'un fragment.

