

BIOLOGIE MOLECULAIRE

CHAPITRE I: Les Principales Enzymes

I) Rappels sur l'organisation de l'ADN:

L'[ADN](#) est une double hélice constituée de deux simples brins complémentaires et antiparallèles. Cette structure en double hélice est due à l'existence de liaisons hydrogènes entre deux bases complémentaires (2 liaisons entre l'Adénine et la Thymine et 3 liaisons entre la Guanine et la Cytosine)

Fig 1 p 4

Chaque brin comporte une extrémité 3'OH libre et une extrémité 5'P libre. A l'extrémité 5'P d'un brin correspond l'extrémité 3'OH sur l'autre brin et réciproquement (brins antiparallèles)

Fig 2 p 5

II) Les enzymes de synthèse de l'ADN:

1. Les ADN polymérase:

Ce sont des enzymes de [réplication](#) de l'ADN. Elles allongent une [amorce](#) à partir de l'extrémité 3'OH en accrochant les nucléotides complémentaires à ceux de la [matrice](#). L'allongement s'effectue donc dans le sens 5'->3'.

a) éléments nécessaires:

Enzyme	Matrice	Amorce	Désoxyribonucléoside Triphosphate	Ions Mg ⁺⁺
ADN pol	ADNs	Oligonucléotide avec 3'OH libre et hybridé à la matrice	dATP - dGTP - dCTP - dTTP	+

Fig 3 p 6

b) les différentes ADN pol:

[ADN pol I](#) ou: « enzyme de Kronberg »:

C'est une enzyme bactérienne extraite d'E. coli par A. KRONBERG en 1955. Cette [enzyme](#) possède 3 domaines d'activité:

Enzyme	Origine	Domaines		
		ADN pol dans le sens 5'->3'	Exonucléase dans le sens 5'->3'	Exonucléase dans le sens 3'->5'
ADN pol I ou « enzyme de Kronberg »	Extraite d'E. coli	+	+	+

Fig 4 p 7

ADN pol 2 ou: « fragment de Klenow »:

Enzyme	Origine	Domaines		
		ADN pol dans le sens 5'→3'	Exonucléase dans le sens 5'→3'	Exonucléase dans le sens 3'→5'
ADN pol 2 ou « fragment de Klenow »	protéolyse ménagée de l'enzyme de Kronberg	+	-	+

T4 ADN pol (=fragment de Klenow):

Enzyme	Origine	ADN pol dans le sens 5'→3'	Exonucléase dans le sens 5'→3'	Exonucléase dans le sens 3'→5'
T4 ADN pol	Extraite d'E.coli infectée par T4	+	-	+

Taq Polymérase:

Enzyme	Origine	Domaines		
		ADN pol dans le sens 5'→3'	Exonucléase dans le sens 5'→3'	Exonucléase dans le sens 3'→5'
Taq pol	Extraite de <i>Thermus aquaticus</i>	+	-	-

Thermus aquaticus est une bactérie qui vit dans les sources d'eau chaude (thermophile). Son enzyme « Taq pol » est utile pour la technique PCR car elle est stable et optimale à 72°C.

- *Toutes ces enzymes sont DNA-dépendantes: synthèse d'ADN à partir d'ADN
- *La transcriptase reverse est RNA-dépendante: synthèse d'ADN à partir d'ARN

2. La Transcriptase reverse

Découverte en 1964 par TEMIN et BALTIMORE, elle est une étude capitale dans le développement du génie génétique.

- Elle est spécifique des [rétrovirus](#).
- Elle est codée par le gène « pol » des rétrovirus (qui code aussi pour l'intégrase et la protéase).
- Elle synthétise de l'ADNd à partir d'ARNs. Cet ADNd synthétisé est l'[ADN proviral](#).
- Elle a une activité de :
 - *Rnase-H*: hydrolyse des ARN hybridés l'ADN par les liaisons H.
 - *ADN pol*: synthèse d'ADN à partir d'ADN.

Enzyme	Matrice	Amorce	Désoxyribonucléoside Triphosphate	Ions Mg ⁺⁺
Transcriptase reverse	ARNs	Oligonucléotide avec 3'OH libre et hybridé à la matrice	dATP - dGTP - dCTP - dTTP	+

Synthèse d'un brin d'ADN (ADNs) à partir d'un brin d'ARNs.

Fig 5 p 7: les 3 étapes de la transcriptase reverse (in vivo)

In vitro, les choses sont différentes. En effet, la transcriptase reverse (TR) n'est pas fidèle dans son action ADN pol. Ainsi, on utilise l'enzyme de Kronberg pour synthétiser le brin complémentaire (ADNc) de l'ADNs synthétisé par la TR.

III) Les enzymes de synthèse de l'ARN:

Origine	Matrice	Amorce	Ribonucléoside Triphosphate	Ions Mg ⁺⁺	Sens
extraite d'E. coli infectée par SP6	ADNs	-	ATP - GTP - CTP - UTP	+	5'→3'
extraite d'E. coli infectée par T7	ADNs	-	ATP - GTP - CTP - UTP	+	5'→3'

Ces enzymes ont aussi besoin des promoteurs spécifiques non-obligatoires (SP6 marche avec T7).

!! Un gène eucaryote dans une cellule eucaryote a besoin d'un promoteur eucaryote. Mais un gène eucaryote placé dans une cellule bactérienne a besoin d'un promoteur bactérien (pour que la bactérie soit capable de savoir l'utiliser) !!

IV) Les enzymes de coupure de l'ADN:

1. Les enzymes de restriction:

Découverte en 1965 par ARBER (étude chez les phages)

En temps normal, un cycle phagien est lytique; exceptions:

- Lysogénie: intégration de l'ADN au chromosome; la bactérie lysogène vie.
- Restriction: Fig 6 p 8

Définition: Ceux sont des endonucléases spécifiques des bactéries, capables de reconnaître dans tout ADN étranger (non-bactérien) des séquences particulières appelées sites de restriction, et capable de couper l'ADN.

Nomenclature: Fig 7 p8

EcoRI signifie: **E**=Escherichia **co**=coli **R**=souche **I**=numéro de l'enzyme extraite.

3 types d'enzymes de restriction:

- * Type 1: coupe l'ADN 1000 à 4000 pb après le site de restriction reconnu.
- * Type 2: coupent au niveau du site de restriction (utile)
- * Type 3: = type 1 mais à 20 pb après le site de restriction.

Les enzymes de restriction de type 2:

Sites de restriction = séquences palindromiques de 4 à 6 nucléotides.

**Palindrome = séquence lu de manière identique en 3'→5' et en 5'→3'

2 types de coupures:

coupures franches: ex HaeIII	coupures décalées: ex EcoRI
<p>5' <u>GGCC</u> 3' 3' <u>CCGG</u> 5'</p> <p>↓</p> <p>Libération de bouts francs</p> <p>5' <u>GG</u> <u>CC</u> 3' 3' <u>CC</u> <u>GG</u> 5'</p>	<p>5' <u>GAATTC</u> 3' 3' <u>CTTAAG</u> 5'</p> <p>↓</p> <p>Libération de bouts adhérents</p> <p>5' <u>G</u> <u>AATTC</u> 3' 3' <u>CTTAA</u> <u>G</u> 5'</p>

Résultat des enzymes de restriction: profils de restriction

mise en évidence: électrophorèse sur gel d'agarose:

!! Tous les fragments sont chargés – donc leur mouvement est du – vers le +

!! Le gel d'agarose agit comme un filet; le mouvement est donc inversement proportionnel à la taille, la longueur du fragment en kb.

□ Ainsi plus un fragment est long en kb, plus il sera lent et donc plus il sera proche de la zone des puits (-).

Pour mettre en évidence les fragments d'ADN dans le gel après l'électrophorèse, on utilise du bromure d'éthylidium: c'est un agent intercalant (donc un puissant mutagène) qui rend l'ADN fluorescent à 250nm (UV).

*Profil de restriction d'un ADN plasmique: pBR322: Fig 9 p 10

Attention: un même ADN plasmique peut être Relâché (= encombrant) ou Superenroulé (= peu encombrant).

*Profil de restriction d'un ADN génomique humain = totalité de l'ADN chromosomique:

Il y a tellement de fragments qu'il se tassent et forment des « traînées » fluorescentes aux UV. Si du fluo apparaît au niveau des puits c'est qu'il y reste de l'ADN très encombrant (non-digéré).

2. Les nucléases:

a) DNase I: C'est une endonucléase qui coupe l'ADNs ou d après une pyrimidine (C ou T) de préférence.

b) Nucléase SI: elle coupe l'ADNs.

V) Enzymes de coupure de l'ARN:

a) RNase A: Elle coupe l'ARNs après C ou U.

b) RNase H: Elle détruit l'ARN des hybrides ADN-ARN en rompant les liaisons H.

c) Transcriptase Reverse: activité de RNase H.

VI) Enzymes de soudure des acides nucléiques:

Elles établissent une liaison phosphodiester entre deux fragments d'acide nucléique, l'un ayant une extrémité 3'OH libre et l'autre une extrémité 5'P libre;

Fig 10 p 11

1) ADN ligase d'E. coli: Il faut que les extrémités soient de type adhésives.

2) T4 ADN ligase: que les extrémités soient adhésives ou non. extraite d'E. coli infectée par T4

3) T4 ARN ligase: idem pour ARN