



Chapitre III

Digestion et électrophorèse des acides nucléiques

I- Généralités sur les enzymes de restriction

1- Définition

Les enzymes de restriction sont des *endonucléases spécifiques* (enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique). Elles ont la particularité de couper les molécules d'ADN bicaténaire (double brin) à des séquences spécifiques dites « *sites de restriction* ».

2- Origine des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont d'origine bactérienne, elles sont produites au moment des infections lysogéniques. Les bactéries parasitées par des virus à ADN fabriquent et utilisent les enzymes de restriction comme un mécanisme de défense contre les molécules d'ADN étrangères.

Pour éviter une autodestruction de leur propre ADN, les bactéries se protègent contre leurs propres enzymes de restriction par une modification des sites de restriction correspondants.

3- Types des d'enzymes de restriction

Il existe trois types d'enzymes de restriction :

- ❖ **Type I :** Leur action nécessite la présence de Mg^{2+} , l'ATP, et de S-adenosyle-méthionine. Leur site de coupure est éloigné de leur site de reconnaissance (l'enzyme reconnaît sa séquence puis se déplace sur l'ADN et s'arrête d'une *manière aléatoire* 1000 à 5000 paires de bases plus loin du site de reconnaissance et libère quelques dizaines de nucléotides).
- ❖ **Type II :** Pratiquement les seules utilisées en génie génétique, reconnaissent l'ADN à des sites particuliers et coupe dans ces sites ou à proximité immédiate d'eux.
- ❖ **Type III :** après reconnaissance de la séquence spécifique, ces enzymes découpent l'ADN une vingtaine de nucléotides plus loin du site de reconnaissance.

Les enzymes de restriction de type II sont pratiquement les plus utilisées en biologie moléculaire, à cause de leurs propriétés de coupure et de reconnaissance. Les types I et III ne sont pas utilisés à cause de plusieurs raisons :

- ✓ Ce sont des protéines complexes coupant l'ADN bicaténaire en dehors de leur site de reconnaissance.

- ✓ Les enzymes de type I ne coupent pas au niveau du site de reconnaissance, elles digèrent l'ADN au hasard après la séquence de reconnaissance
- ✓ Leur action nécessite la présence des cofacteurs (Mg^{2+} et ATP), et ils portent une activité de méthylation supplémentaire.

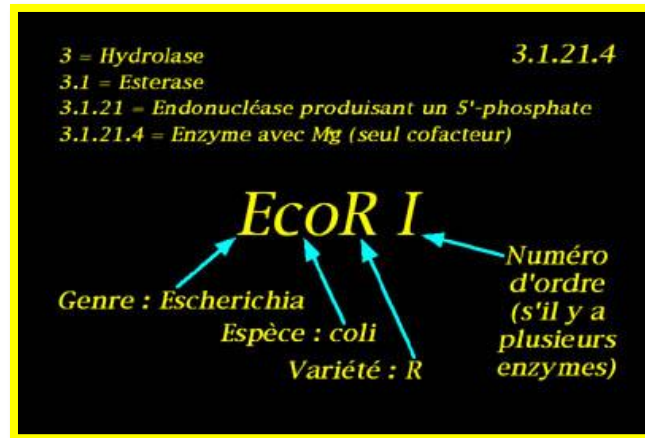
Exemple des enzymes de restriction de type II

Enzyme	L'organisme source	Séquence de reconnaissance
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C/CGG GGC/C
<i>MboI</i>	<i>Moraxella bovis</i>	/GATC CTAG/
<i>NdeI</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>	/GATC CTAG/
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G/AATC CTAA/G
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	/CC(A or T)GG GG(T or A)CC/
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli</i> J62/pGL74	GAT/ATC CTA/TAG
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G/GATCC CCTAG/G
<i>SauI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CC/TNAGG GGANT/CC
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	GCCNNNN/NGGC CGGN/NNNNCCG
<i>NofI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC/GGCCGC CGCCGG/CG
<i>DraI</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>	RG/GNCCY YCCNG/GR

4- Nomenclature des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction présentent une nomenclature bien précise.

- ✓ La première lettre est écrite en majuscule, elle correspond au genre de la bactérie d'où l'enzyme a été extraite.
- ✓ La seconde et la troisième lettre (en minuscules) correspondent à l'espèce de la bactérie d'où l'enzyme est extraite.
- ✓ La quatrième lettre (en majuscule) correspondant à la souche bactérienne.
- ✓ Un chiffre romain indique l'ordre de caractérisation de ces enzymes.



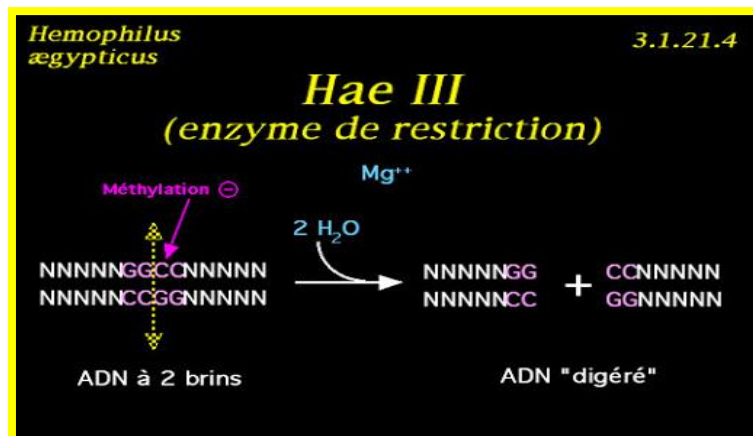
5- Spécificités des sites de restriction

- ❖ Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des séquences dites palindromiques. Les séquences palindromiques sont des séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5' à 3' (gauche-droite) pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens droite-gauche pour le second brin (sens 5' à 3'). **Exemple** : 5'- GAATTC-3' sur un brin et 5'-CTTAAG-3' sur l'autre
- ❖ Les séquences reconnues par les enzymes de restriction sont le plus souvent constituées de 4,6 ou 8 paires de bases.

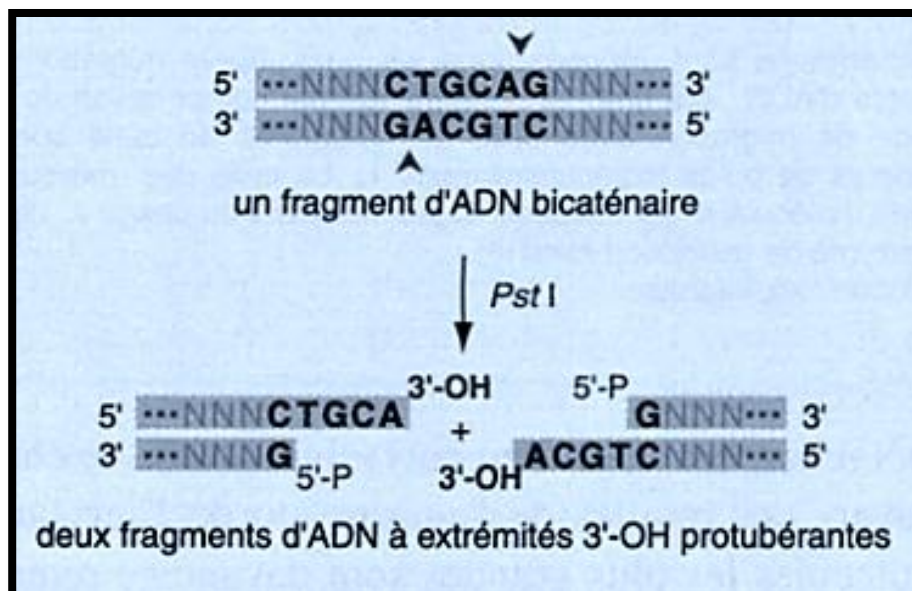
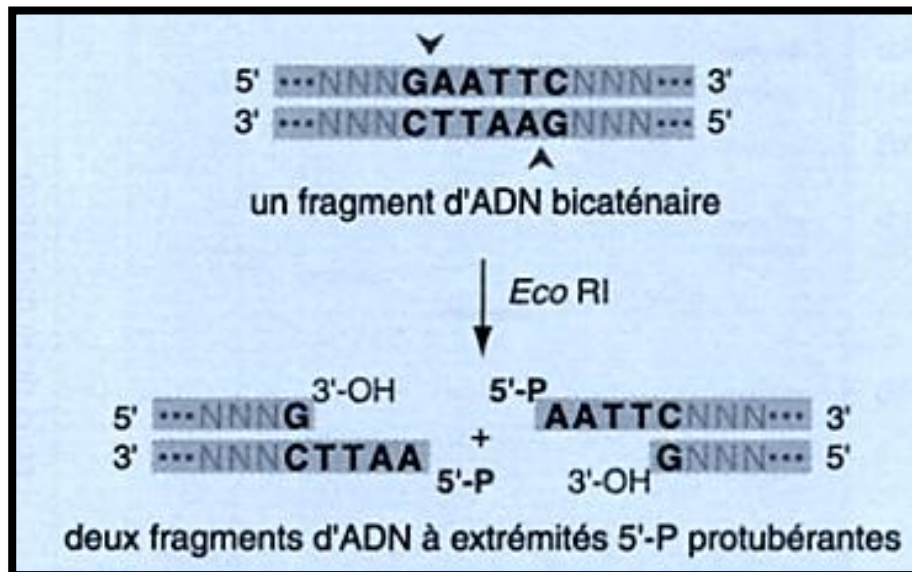
6- Types de coupures

Les enzymes de restriction coupent dans la séquence nucléotidique selon deux modes :

- ✓ Coupures franches : qui donnent des bouts francs non sortants et non-cohésifs (non-collants). Exemple : l'enzyme Hae III isolée de *Haemophilus aegyptius* coupe l'ADN double brin au niveau de la séquence GG/CC.



- ✓ **Coupsures cohésives** : qui sont excentriques et qui donnent des bouts sortants cohésifs (capable de s'apparier avec d'autres bouts complémentaire) (dits aussi bouts collants).
Exemples : - l'enzyme de restriction Eco RI isolée de la bactérie *Escherichia coli* coupe l'ADN bicaténaire dans la séquence palindromique G/AATTC ; L'enzyme de restriction Pst I isolée de la bactérie *Providencia stuarti* coupe l'ADN bicaténaire dans la séquence palindromique CTGCA/G.



7- La fréquence de coupure

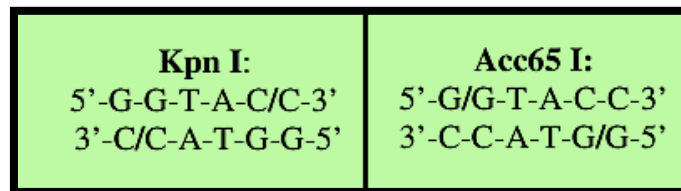
La fréquence de coupure d'un ADN par une enzyme de restriction donnée peut être approchée statistiquement en considérant le nombre de nucléotides de la séquence spécifique reconnue par l'enzyme.

- ✓ Une enzyme reconnaissant 4 bases coupera en moyenne toute la 4^e base soit tous les 256 nucléotides. Exemple : la séquence GATC reconnue par l'enzyme Mbo I est présente avec une fréquence statistique de 1 / 256 paires de bases (1/ 44).
- ✓ La séquence de six nucléotides : GGATCC reconnue par l'enzyme Bam HI, on aura donc une fréquence de coupure statistique de 1 / 46, soit 1 coupure tous les 4096 nucléotides.

8- Notion d'isoschizomères

Les isoschizomères sont des enzymes de restriction différentes qui peuvent reconnaître les *mêmes sites de restriction*, et fournissent après clivage enzymatique des fragments dont les extrémités sont différentes.

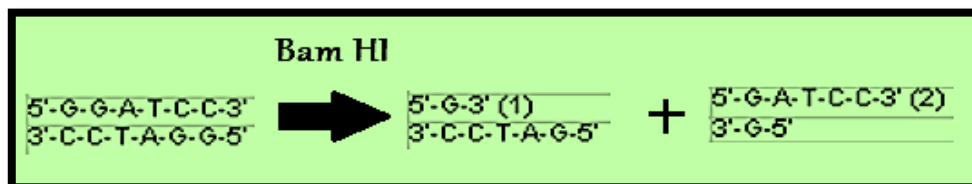
Exemple :



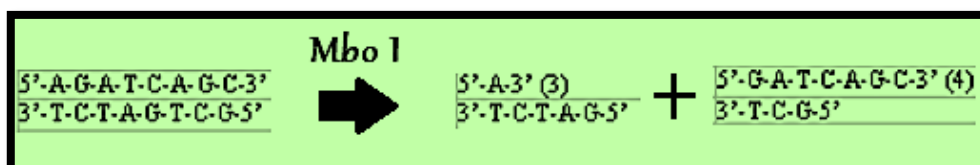
9- Notion d'enzymes compatibles

Deux enzymes de restriction sont dites compatibles quand elles génèrent après digestion des fractions aux extrémités cohésives complémentaires. Ces fragments peuvent être facilement ligaturés. **Exemple :**

Après action de Bam HI



Après action de Mbo I



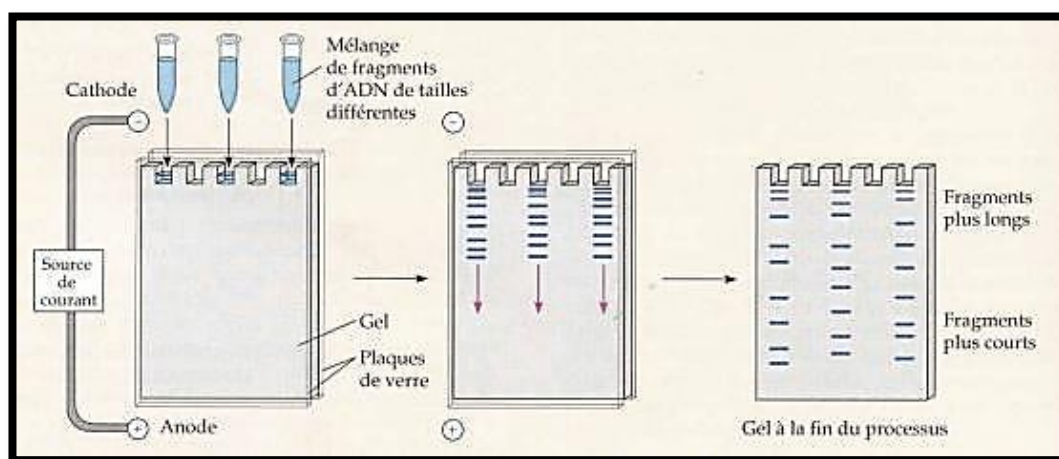
Ligatures possibles : 1+4 et 2+3.

II- Electrophorèse des acides nucléiques

L'action d'une enzyme de restriction sur une molécule d'ADN génère des fragments de restriction. Ces fragments d'ADN peuvent être séparés suivant leur taille sur un gel d'agarose ou d'acrylamide.

1- Principe

L'électrophorèse sur gel est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer les acides nucléiques ou les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Elle est basée sur la séparation des molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers une matrice (un gel d'agarose ou de polyacrylamide). Le gel agit à la manière d'un tamis moléculaire au travers duquel les molécules en mouvement doivent passer ; Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures (due aux difficultés de passage à travers les mailles (pores)).



2- Applications de l'électrophorèse

- ❖ Séparation de fragments ADN digérés
- ❖ Estimation du poids moléculaire de fragment d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction
- ❖ Analyse d'ADN après une amplification par PCR

3- Electrophorèse des acides nucléiques

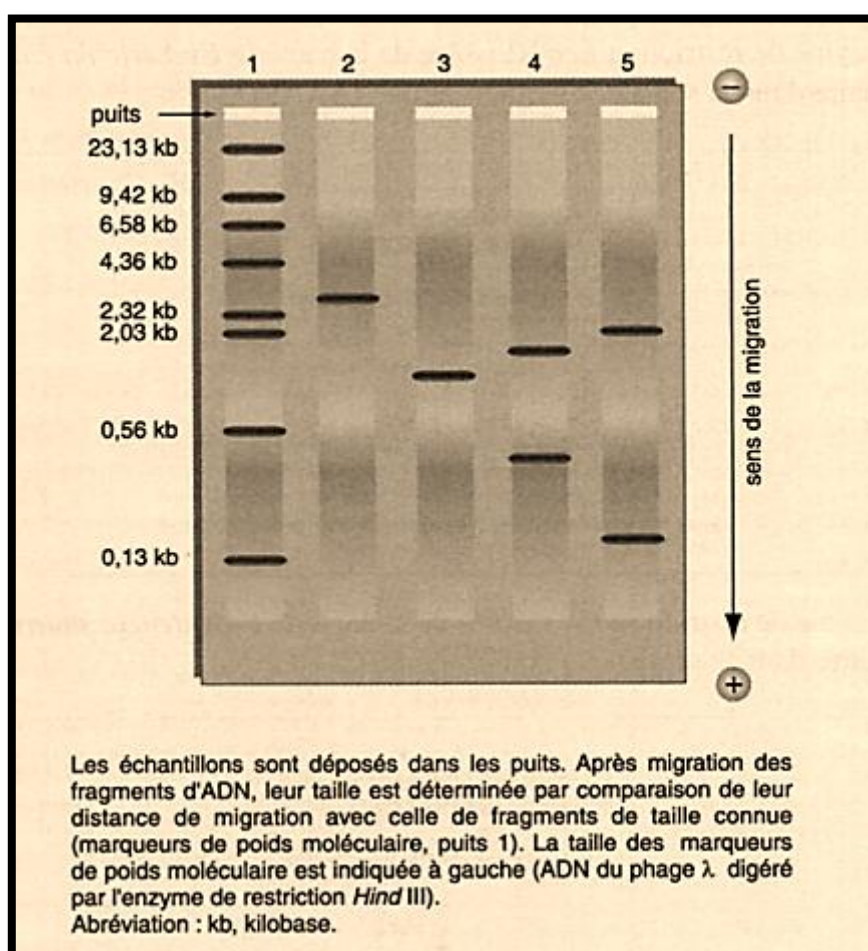
Le mélange contenant l'ADN coupé par l'enzyme de restriction est déposé à une extrémité du gel qui est ensuite soumis à un champ électrique.

Les molécules d'ADN (chargées négativement à pH 7~8) migrent dans le champ électrique vers l'anode (+). En passant au travers des mailles de l'agarose ou de l'acrylamide. Elles se séparent selon leur taille : les molécules les plus grandes sont retenues que les petites molécules et migrent moins vite et donc moins loin.

L'électrophorèse sur gel d'agarose présente plusieurs avantages :

- ❖ Préparation du gel d'agarose est aisée, rapide, et peu coûteuse.
- ❖ L'agarose est plus ferme et moins toxique que le gel de polyacrylamide
- ❖ Les échantillons peuvent être récupérés en vue d'analyses supplémentaires (Pas de dénaturation des échantillons)

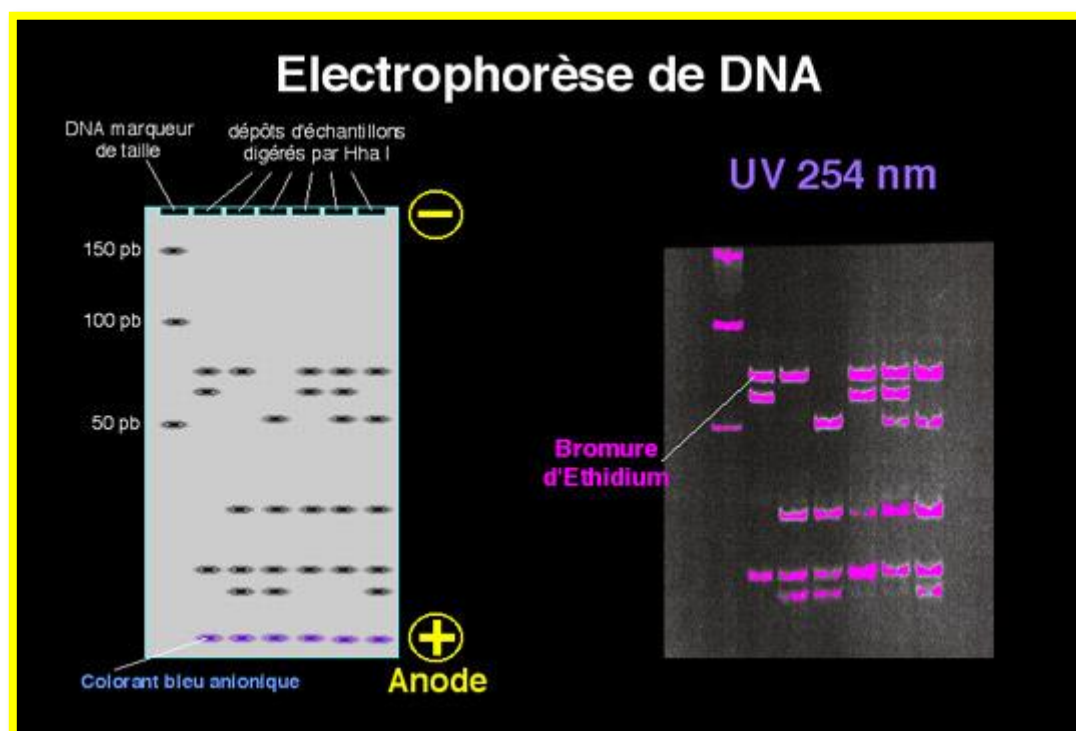
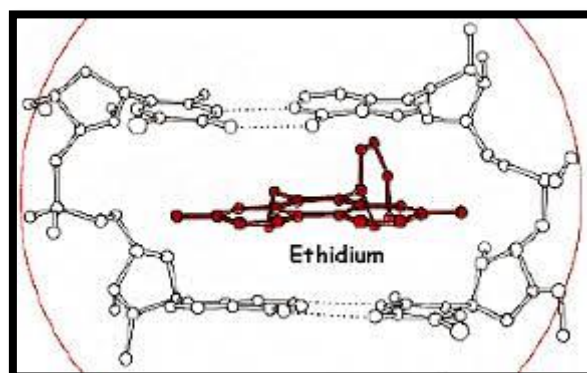
Cependant, l'acrylamide a un pouvoir séparateur plus important que l'agarose. Mais ce produit est toxique et la préparation des gels d'acrylamide est difficile.



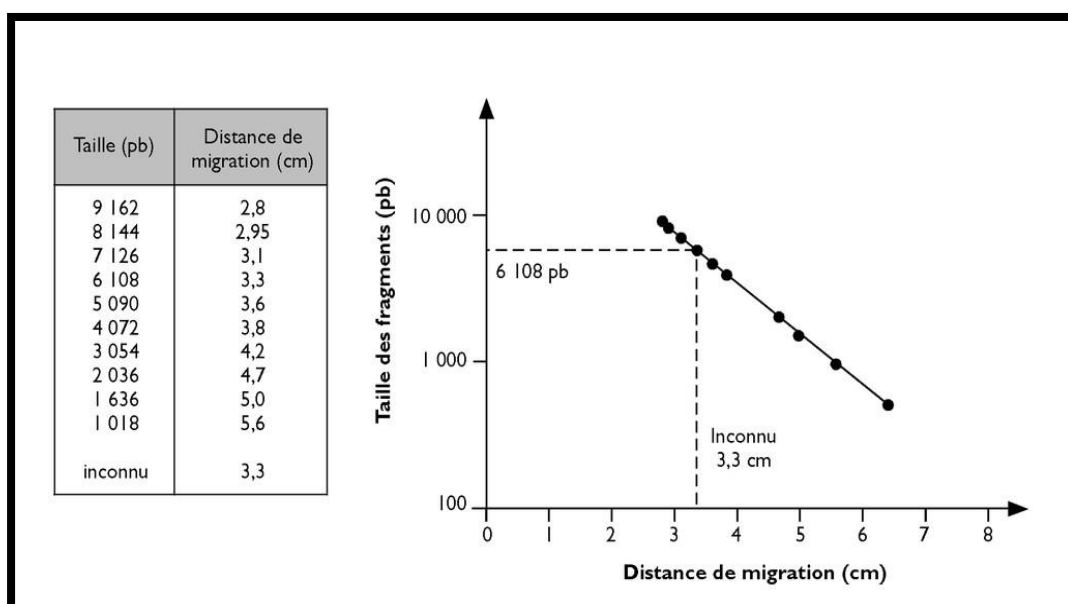
Afin de visualiser les fragments d'ADN après électrophorèse, le gel est trempé dans une solution contenant du bromure d'éthidium. Cette molécule s'intercale entre les bases des acides nucléiques et a la propriété d'émettre une fluorescence rouge orange lorsqu'elle est

excitée par la lumière ultraviolette. Le gel est alors observé sous une lampe à U.V (à 254 nm) et les molécules d'ADN complexées au bromure d'éthidium deviennent visibles.

NB : Le bromure d'éthidium est un produit dangereux mutagène et cancérigène qui doit être manipulé dans des conditions particulières (gants, blouse, déchets recyclés...).



Comme la distance de migration est proportionnelle au logarithme du nombre de bases, il est possible de déterminer la taille des fragments de restriction obtenus en comparant leur mobilité électrophorétique à celle de fragments d'ADN de taille déterminée (marqueurs de taille). Il existe également des marqueurs permettant d'estimer pour chaque fragment la quantité d'ADN bicaténaire.



Dans certains cas, les molécules à séparer sont préalablement marquées par l'incorporation d'un isotope radioactif, ce qui permet une détection facile par autoradiographie (les particules énergétiques émises par le radio-isotope impressionnent un film photographique placé sur le gel. Il suffit ensuite de développer le film comme un film photographique ordinaire pour voir apparaître des signaux (bandes) noirs correspondant aux molécules radioactives).

NB : Les films autoradiographiques sont de plus en plus souvent remplacés par des écrans autoradiographiques dont les signaux sont révélés par numérisation.

Facteurs affectant la migration :

Les facteurs les plus importants sont :

- ❖ **La longueur de la molécule d'ADN** : la séparation se fait en fonction du poids moléculaire et donc de la taille de l'ADN.
- ❖ **La concentration du gel** : L'augmentation de la concentration d'agarose dans un gel réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragment d'ADN de plus petite taille.
- ❖ **Le voltage** : plus le voltage est important, plus la vitesse de migration augmente. Toutefois le voltage est limité en intensité (5V/cm) : un fort voltage induit une augmentation de température ce qui peut faire fondre le gel.
- ❖ **La conformation de l'ADN** : l'ADN plasmidique, non digéré par une enzyme de restriction, migre à différentes vitesses (du plus lent au plus rapide) : ADN circulaire, ADN linéaire et ADN superenroulé.