

Outils de la biologie moléculaire - I

I- Introduction :

La biologie moléculaire consiste à étudier la **structure des gènes, leur expression et le contrôle de leur expression**. Elle conduit donc à travailler essentiellement avec des molécules d'ADN, et d'ARNm (expression génique). Le développement des outils et des techniques de biologie moléculaire, ainsi que le **génie génétique (OGM)**, ont fait apparaître une nouvelle discipline : **la biotechnologie**.

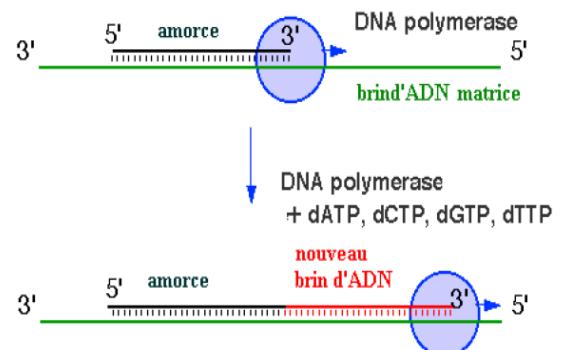
II- Les enzymes :

A- Les polymérases :

Toutes les polymérases agissent (synthétisent) dans le sens **5' → 3'**

1- Les ADN polymérase ADN dépendantes : ont besoin

- D'une matrice ADN.
- D'une amorce (fragment court d'ADN d'environ 18 à 25 nucléotides).
- Elles ont une activité d'exonucléase 3' → 5' (correction de l'activité de l'ADN polymérase), et d'exonucléase 5' → 3' (activité de réparation de l'ADN).



Exemple: l'**ADN polymérase I de E. Coli**: présente les 03 activités:

1) Polymérase 5' - 3' = Synthèse

$$5' - \text{TAACCA} \rightarrow - 3'$$

$$3' - \text{ATTGTCATC} - 5'$$

2) Exonucléase 3' - 5' = Correction des erreurs de synthèse

$$5' - \text{TAACC} \circlearrowleft - 3'$$

$$3' - \text{ATTGTCATC} - 5'$$

\downarrow

$$5' - \text{TAAC} - 3'$$

$$3' - \text{ATTGTCATC} - 5'$$

\downarrow

$$5' - \text{TAACA} \rightarrow - 3'$$

$$3' - \text{ATTGTCATC} - 5'$$

3) Exonucléase 5' - 3' = réparation de l'ADN



L'ADN polymérase ADN dépendante la plus utilisée est la **Taq polymérase**, extraite à partir d'une bactérie **Thermus aquaticus**, active de 75°C à 95°C , utilisée dans la technique PCR, en vue d'une amplification de l'ADN in vitro.

2- Les ADN polymérases ARN dépendantes (les reverse transcriptases)

- Ont besoin d'une extrémité 3'OH libre poly A au niveau de l'ARN.
- D'une amorce poly T et des désoxyribonucléotides.

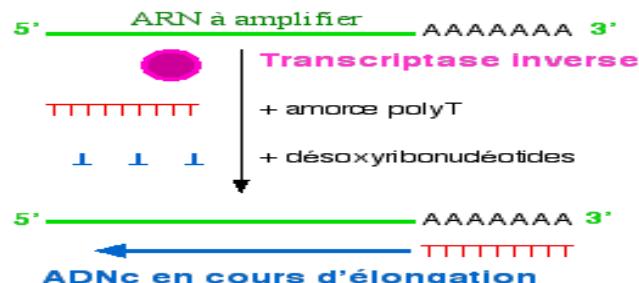
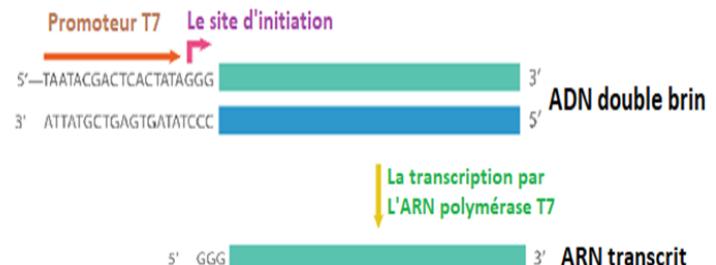


Schéma du principe de la réaction de transcription inverse en présence d'amorce poly T

3- Les ARN polymérases

L'ARN polymérase T7 du bactériophage T7, est la plus utilisée, elle reconnaît l'ADN double brin cloné sur un vecteur, et son promoteur sur lequel elle se fixe pour transcrire l'ADN en ARN.



La transcription par l'ARN polymérase T7

B- Les enzymes de dégradation (les nucléases) :

1- Les ADNase (endonucléases = endodésoxyribonucléases) : hydrolyse les liaisons phosphodiesters au milieu des fragments d'ADN, on distingue :

a\ ADNase à reconnaissance non spécifique :

La plus utilisée est la **ADNase I** extraite de **E. coli** qui reconnaît l'ADN double brin et le coupe de façon non spécifique.

b- Les ADNases de restriction :

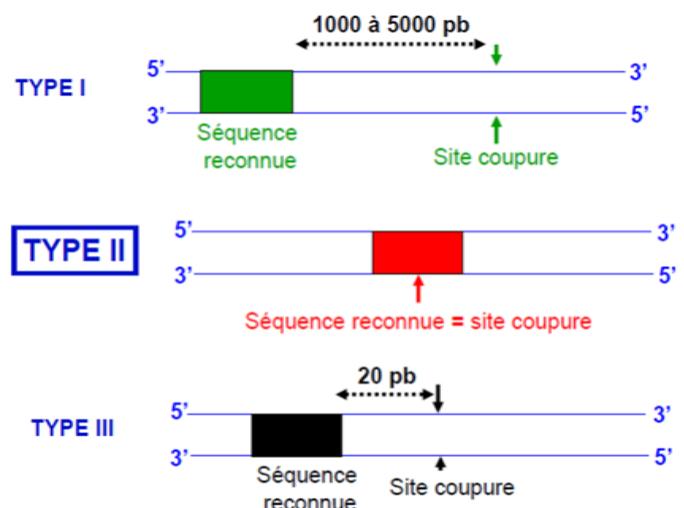
Ce sont des **endonucléases** extraites à partir de microorganismes (généralement des bactéries) qui sont capables de **cliver les liaisons phospho-diester** au niveau des acides nucléiques. Elles reconnaissent spécifiquement de courtes séquences d'ADN d'environ **4 à 10 pb**, ces séquences sont appelées « **sites de restrictions** », ces sites sont de **nature palindromique**, c'est-à-dire que la lecture des deux brins complémentaires dans **des sens opposés donne la même séquence**.

-Les bactéries synthétisent les enzymes de restriction pour se protéger contre les infections de virus (les bactériophages). La plupart des enzymes de restriction reconnaissent une **séquence spécifique**, le plus souvent palindromique et coupe l'ADN au niveau d'un site spécifique appelé « **site de coupure** ». Il existe trois types d'enzymes de restriction isolées des bactéries :

1- Type I : leur site de coupure est éloigné d'environ 1000 à 5000 pb leur site de reconnaissance.

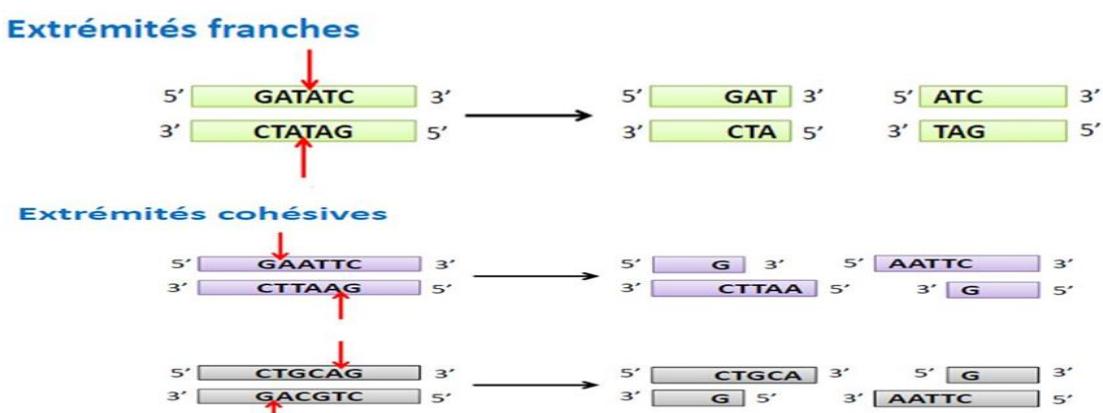
2- Type II : reconnaissent des séquences spécifiques et coupent à des endroits spécifiques de cette séquence (le plus souvent palindromique), sont les plus utilisés en biologie moléculaire.

3- Type III : leur site de coupure est éloigné d'environ 20 pb de leur site de reconnaissance.



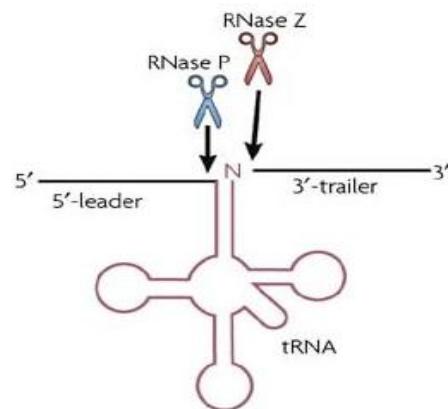
-Les enzymes de restriction donnent deux types d'extrémités après coupure :

- Des Extrémités **franches** (la coupure est située au même niveau sur les deux brins).
- Des extrémités **cohésives** (simples brins qui résultent de coupures décalées l'une par rapport à l'autre au niveau de la séquence palindromique) d'où la possibilité de lier des fragments d'ADN d'origine différentes : c'est le phénomène de la **recombinaison génétique**.



2- RNAases (ribonucléases) :

Les plus utilisées en biologie moléculaire sont les ARNases **Z** et **P**, présentes chez *E. coli* et la grande majorité des bactéries. Assurent la maturité des pré ARNt en ARNt, qui consiste à couper l'extrémité 3' des **pré ARNt (catalysée par l'RNase Z)** et l'extrémité 5' des **pré ARNt (catalysée par l'RNase P)**.



C- Les ligases :

- Les **ADN ligases** sont des enzymes de la classe des ligases qui catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre deux segments d'ADN qui ont été coupés par les enzymes de restriction.
- Les 02 ADN ligases les plus utilisées sont l'ADN ligase de *E. coli* et l'ADN ligase du bactériophage T4.

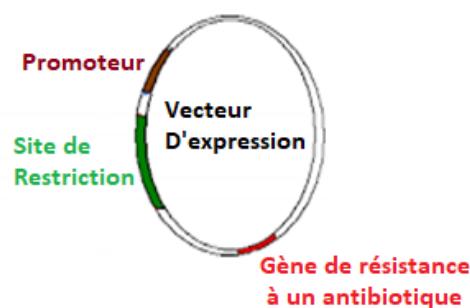
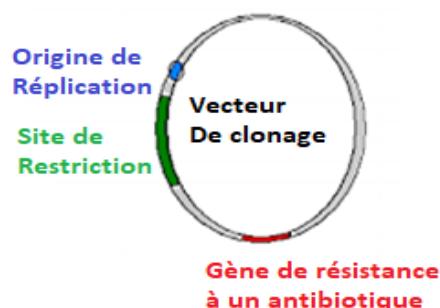
III- Les vecteurs

Ce sont des **petites molécules d'ADN transporteuses**, qui possèdent des sites de restriction qui permettent l'insertion **d'un fragment d'ADN ou d'un gène** et de le faire **pénétrer dans une autre cellule** appelée cellule hôte (le plus souvent une bactérie), ils possèdent aussi un gène de résistance à un antibiotique. Ces petits ADN sont généralement des virus bactériens (bactériophages) ou des plasmides permettant ainsi **la réPLICATION ou l'EXPRESSION DES GÈNES**. Il existe **deux types vecteurs** :

Vecteur de clonage : renferme une origine de réPLICATION, permet de **cloner** et de **répliquer un gène**.

Vecteur d'expression : renferme un promoteur, permet le **clonage et l'expression du gène**.

Un poly-linker : est un petit fragment de nucléotides **double brin**, synthétisé chimiquement, renfermant **plusieurs sites de restriction**, le poly-linker est introduit dans un vecteur permettant d'insérer plusieurs gènes.



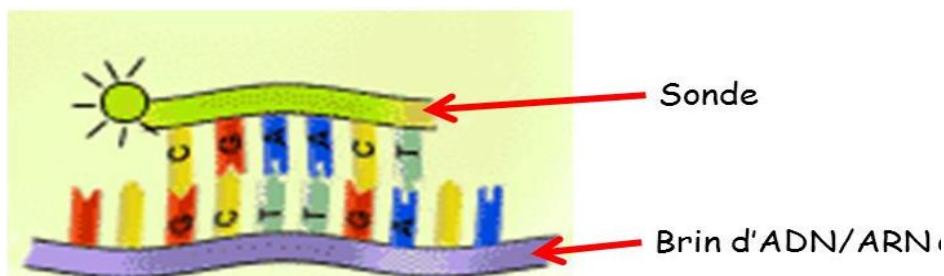
Il existe différents vecteurs de clonage selon la taille du fragment à cloner :

- **Plasmide** : 30 kpb.
- **Phage** : 15 à 20 kpb
- **Cosmide** : 30-45 kpb



IV- Les sondes moléculaires :

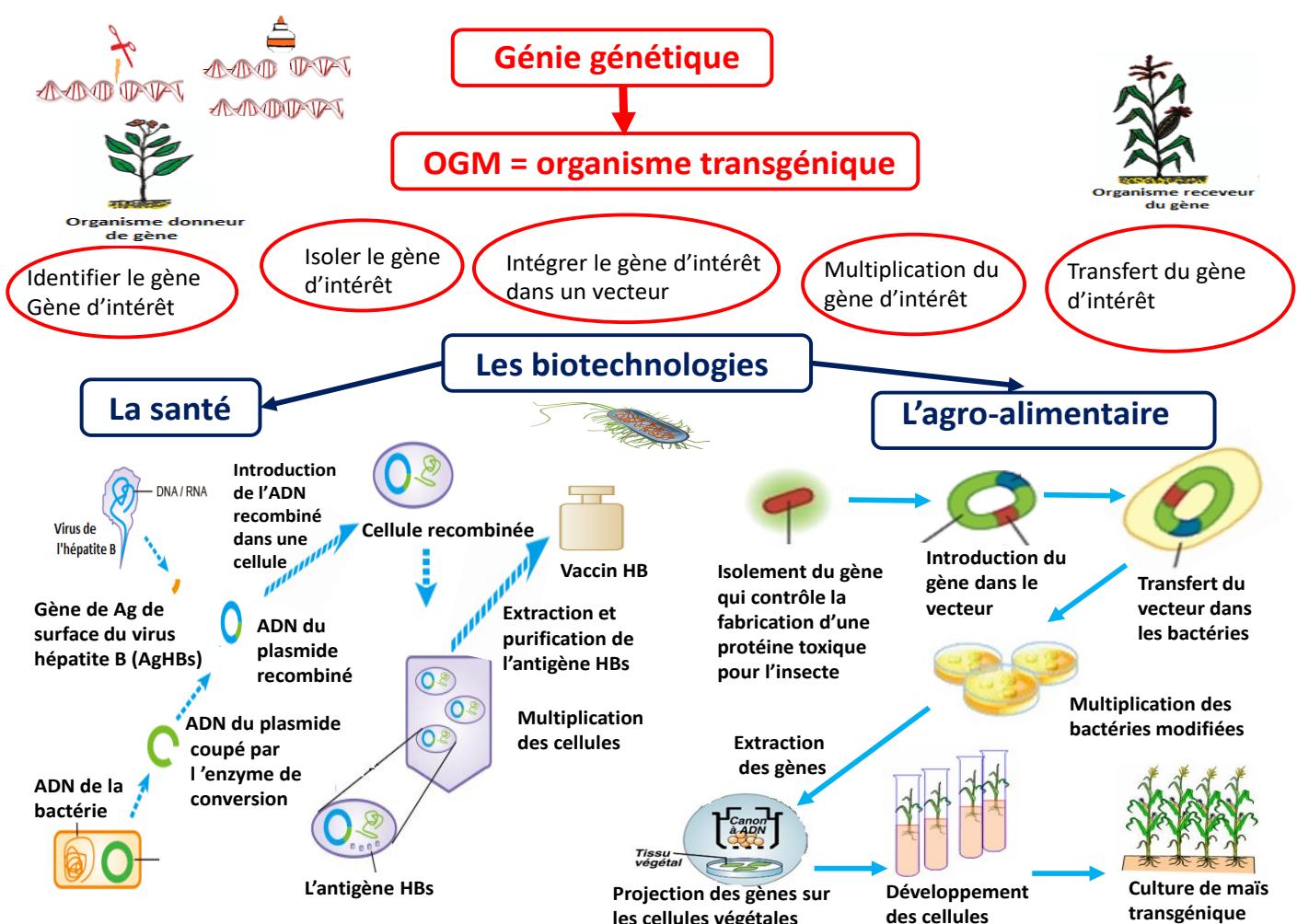
Ce sont des séquences monocaténaires d'ADN ou d'ARN, courtes, marquées avec un élément radioactif (le plus souvent P32) et complémentaire à la séquence à détecter (séquence cible monocaténaire). Les sondes moléculaires permettent de détecter les séquences cibles en s'hybridant avec elles.



Conclusion :

La découverte d'enzymes qui permettent de couper en des endroits déterminés les molécules d'ADN, et des enzymes qui autorisent la soudure des fragments d'ADN coupés est né le **génie génétique**, ayant pour objectif de **modifier le génome des êtres vivants**.

Le développement des techniques de biologie moléculaire appliquées dans la **détection des mutations** et la **thérapie génie** ainsi que le développement du génie génétique, ont fait apparaître une nouvelle discipline qu'on appelle la **biotechnologie** qui utilise des microorganismes vivants eucaryotes ou procaryotes, le plus souvent modifiés génétiquement, pour des applications dans différents domaines tels que la **santé** et l'**agroalimentaire**.



Bibliographie:

1. Cantacuzene J. Les biotechnologies aux Etats-Unis. Revue d'économie industrielle. 1981;18(1):335-348. doi:10.3406/rei.1981.1128
2. Griffiths, Anthony.J.F.Miller, Jefferey. H. SUZUKI, DAVIDT. 3éd. Introduction à l'analyse génétique. Paris: de boeck; 2002,
3. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. Accessed June 10, 2020. <https://www.jbc.org/content/264/11/6427.short>
4. Pluthero FG. Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. Nucl Acids Res. 1993;21(20):4850-4851. doi:10.1093/nar/21.20.4850
5. Redko Y, Li de la Sierra-Gallay I, Condon C. When all's zed and done: the structure and function of RNase Z in prokaryotes. Nat Rev Microbiol. 2007;5(4):278-286. doi:10.1038/nrmicro1622