

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE Batna 2  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT D'Ecologie et environnement

## POLYCOPIE DE COURS (3)

MODULE

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE  
MASTER I (EDP)

*Réalisé par*

*Mr. Ghedadba Nabil*

**Intitulé du Master : Ecophysiologie et développement des plantes****Semestre : 02****Intitulé de l'UE : UED1.****Intitulé de la matière : Biologie moléculaire****Crédits : 2****Coefficients : 2****Objectifs de l'enseignement :** Initiation théorique et pratique aux techniques de la biologie moléculaire.**Connaissances préalables recommandées :** Biologie moléculaire.**Contenu de la matière :**

- i. Définition
  1. DNA recombinant, clonage,
  2. Expression,
  3. Banques Génomique
- ii. Les outils de la biologie moléculaire
  1. Enzymes de restriction
  2. Les ligases
  3. Phosphatases
  4. Kinases
  5. Les vecteurs de clonage
    - 5.1. Les plasmides
    - 5.2. Les phages
    - 5.3. Phagemides
    - 5.4. Les cosmides
    - 5.5. Autres vecteurs de clonage
  6. les cellules hôtes
  7. Les sondes nucléotidiques
- iii. Techniques de biologie moléculaire
  1. criblage de banques
  2. cDNA
  3. Purification des AN , analyse quantitative séquençage
  4. Technique de Southern blot et Northern blot
  5. PCR
  6. Applications : recherche d'un gène, transfert de gène

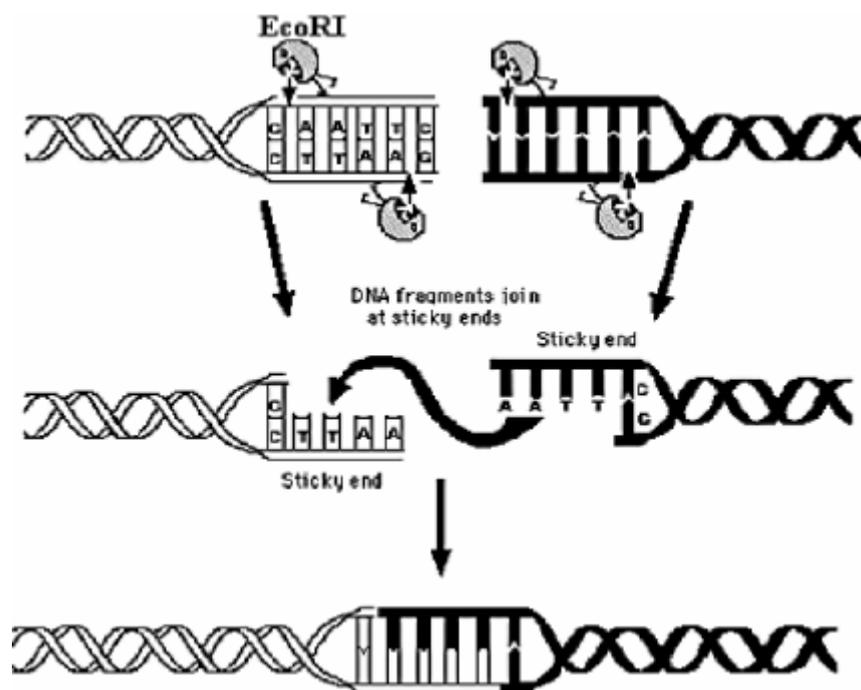
**Mode d'évaluation :** 50% Contrôle continu + 50% examen final

## 2- Les principaux outils de la biologie moléculaire (partie 2)

### 2-1- Les enzymes

#### ✚ Les enzymes qui coupent l'ADN (les enzymes de restriction)

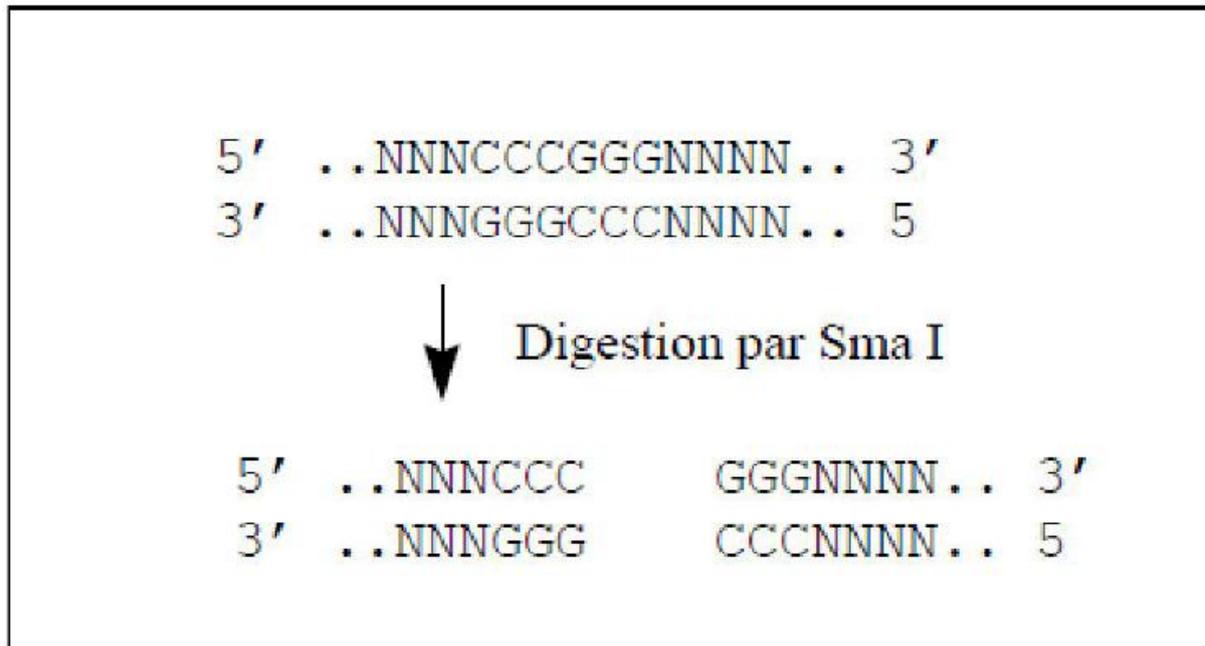
Les enzymes de restriction sont des enzymes qui vont modifier l'ADN au niveau de séquences spécifiques donc ils sont capables de **couper des molécules d'ADN double brin** en des sites très spécifiques de chaque enzyme et reconnus par lui. Ces enzymes sont classés en fonction de leur site de reconnaissance et leur lieu de coupure. Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont nommées « **palindrome** ».



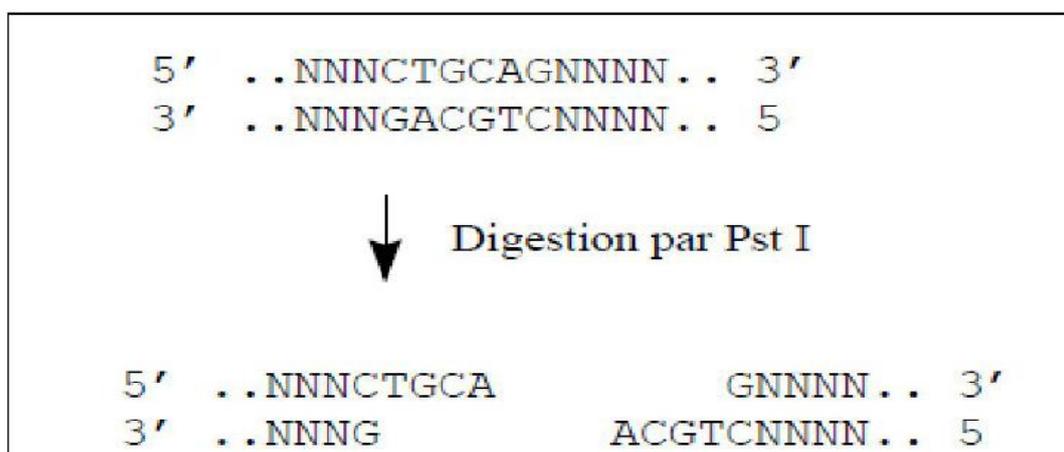
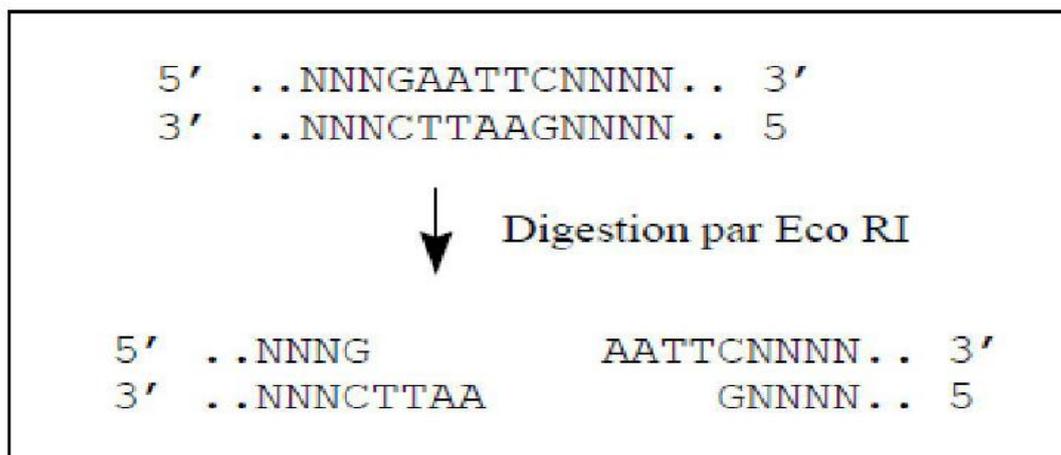
Les enzymes de restriction sont isolés de micro-organismes, bactéries le plus souvent. On donne à ces enzymes des noms à trois ou quatre lettres qui rappellent l'origine du micro-organisme d'où ils ont été isolés. Par exemple : EcoR1 est isolé de *E. coli*, HpaI de *Haemophilus parainfluenzae* (R signifie une endonucléase, le chiffre romain est utilisé lorsque plusieurs enzymes ont été isolés à partir d'une même souche).

On observe deux types de coupures par les enzymes de restriction :

**-coupure donnant des « extrémités franches » :** la coupure d'une molécule d'ADN peut se faire au milieu du palindrome ;



-**coupure donnant des « extrémités adhésives » (ou « bouts collants »)** ; d'autres types d'enzymes agissent en coupant de part et d'autre du centre de symétrie.



Un enzyme de restriction est donc capable de repérer sur toute la longueur d'un ADN certaines séquences caractéristiques. Si cette séquence se trouve cinq fois dans une molécule d'ADN, l'enzyme coupera cet ADN en ces cinq endroits, ce qui donnera cinq fragments d'ADN. Donc selon l'enzyme utilisé, un même ADN sera coupé différemment.

#### ❖ La DNase

La DNase utilisée au laboratoire est généralement d'origine bovine (pancréas). C'est une endonucléase qui possède la propriété de couper une molécule d'ADN double brin au hasard, engendrant ainsi des fragments d'ADN double brin.

#### ❖ La nucléase S1

La nucléase S1 (isolée d'un champignon, *Aspergillus oryzae*) n'attaque que l'ADN simple brin.

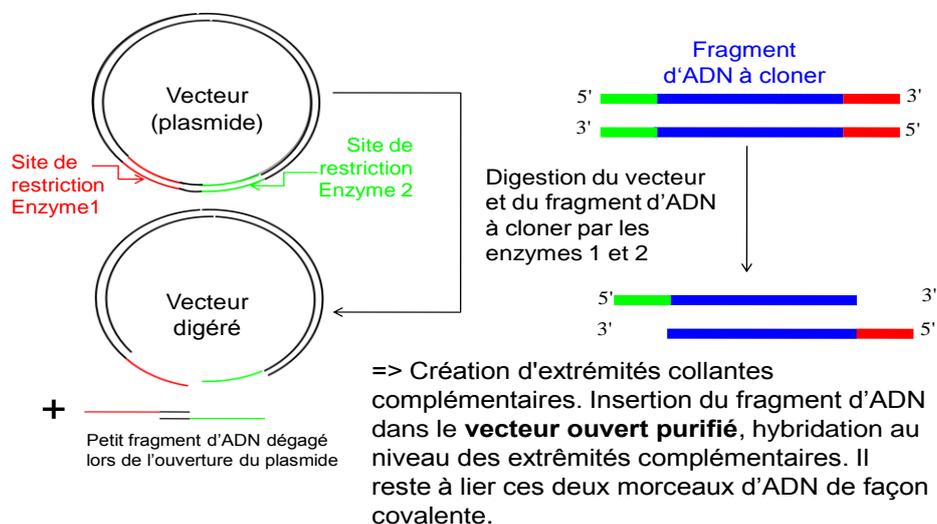
#### ❖ Les exo-nucléases

Les exo-nucléases coupent les extrémités libres des molécules d'ADN en libérant des nucléotides. Par exemple, l'exonucléase III hydrolyse séquentiellement les extrémités 3' libres des molécules d'ADN dans le sens 3' vers 5'.

#### ✚ Les enzymes qui ligaturent : les ligases

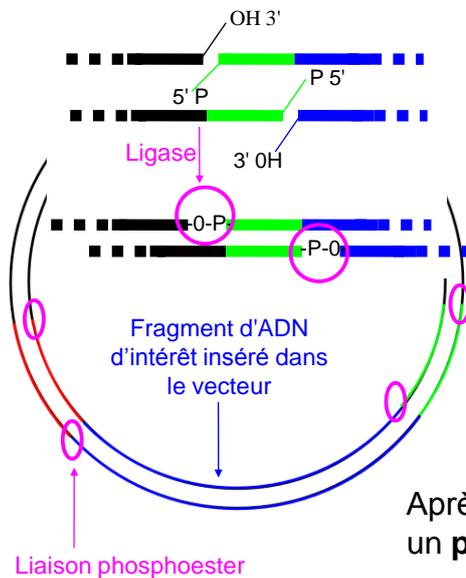
Pour lier, souder deux fragments d'ADN, on utilise une ligase, en présence d'ATP. Il est plus facile de liguer deux fragments à extrémités cohésives que deux fragments à coupure franche. La ligase choisie est en général la ligase du virus T4 (extraite de bactéries infectées par le virus T4). Lorsqu'il existe une coupure d'un des deux brins d'une molécule d'ADN double brin, la ligase est également capable d'effectuer une ligation entre les deux nucléotides adjacents séparés par une brèche.

### b) Ligation du fragment d'ADN dans le vecteur



37

4) Insertion de l'ADN dans le vecteur  
 b) Ligation du fragment d'ADN dans le vecteur



- La **ligase** est une enzyme capable de former des **liaisons covalentes** (formation de liaisons *phosphoester*) entre deux molécules d'ADN (au niveau d'une zone d'hybridation des molécules d'ADN)
- Intérêt d'utiliser deux enzymes différentes lors de la digestion :
  - insertion orientée de l'ADN à cloner dans le vecteur
  - limitation de la religation du vecteur sur lui-même

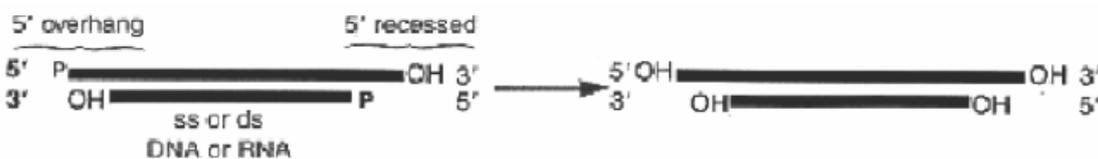
Après ligation, on obtient un **plasmide recombiné**

38

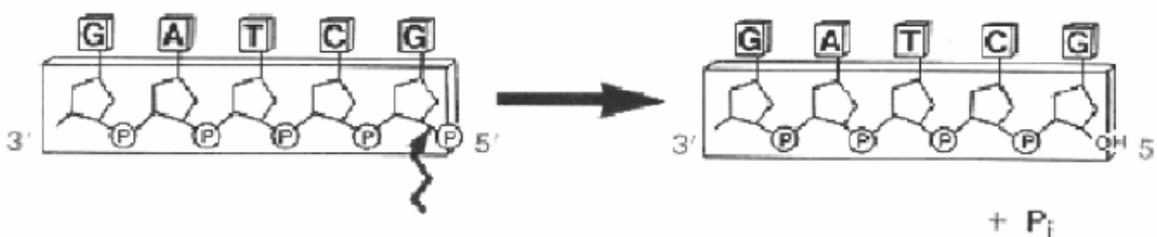
⚡ Les enzymes qui déphosphorylent : **les phosphatases**

**Les phosphatases** catalysent l'élimination d'un groupement phosphate en 5' d'une chaîne d'ADN. Il est courant de déphosphoryler un vecteur que l'on vient d'ouvrir par un enzyme de restriction, afin d'éviter une refermeture de ce vecteur (auto-ligation) qui empêcherait alors d'insérer le fragment d'ADN à étudier.

# Eviter l'auto-ligation: phosphatase



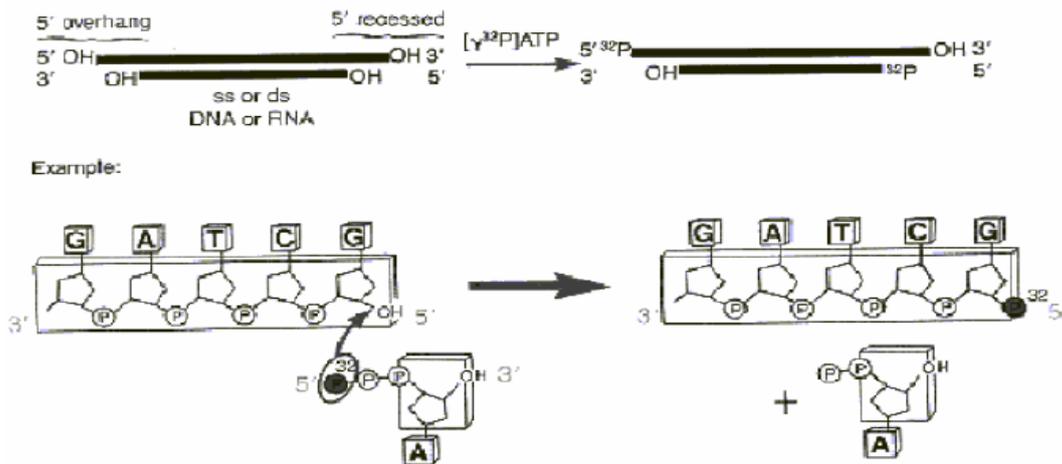
Example:



### ✚ Les enzymes qui phosphorylent : **les kinases**

Les **kinases** permettent le transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP. Il s'agit du phosphate en position gamma (le plus externe des trois groupements fixés sur l'Adénosine). Il sera transféré à l'extrémité 5' d'un ADN déphosphorylé.

## Marquer: kinase



### ✚ Les enzymes qui « recopient » un acide nucléique

La copie d'une chaîne d'acides nucléiques, qu'il s'agisse de synthétiser une chaîne d'ADN ou d'ARN, s'effectue de manière complémentaire et antiparallèle (l'addition des nouveaux nucléotides se faisant dans le sens 5'phosphate vers 3' OH).

#### • ADN-ADN

Les **ADN polymérase** synthétisent une chaîne d'ADN à partir d'un modèle. En effet, une ADN polymérase n'est pas capable de commencer une chaîne d'acides nucléiques. Il est nécessaire d'apporter dans le milieu réactionnel, une amorce d'acide nucléique.

#### • ADN polymérase I et enzyme de Klenow

L'ADN polymérase habituellement utilisée est l'ADN polymérase d'*E.coli*. Elle est constituée d'une seule chaîne peptidique et possède trois activités enzymatiques :

- une activité de **synthèse ADN polymérase 5'-3'**;
- une activité de **dégradation exonucléase 3'-5'** expliquant ses propriétés d'enzyme « à fonction d'édition » ;
- une activité de **dégradation exonucléase 5'-3'**.

L'**enzyme de Klenow** est un enzyme très souvent utilisé au laboratoire, il est obtenu à partir de l'ADN polymérase I d'où l'on a éliminé, clivage avec une protéase, le petit fragment

responsable de l'activité exonucléase 5'-3'. Il ne reste donc plus que les activités polymérase 5'-3' et exonucléase 3'-5' (**fonction d'édition**).

La suppression de l'activité exonucléase 3'-5' permet d'augmenter la processivité de la polymérase, ce qui permet de synthétiser des fragments de grande longueur.

- **Les ADN polymérases thermorésistantes**

La **Taq polymérase** a été la première à être identifiée. C'est une ADN polymérase isolée des bactéries vivant dans les sources d'eau chaude. Elle agit à une température voisine de 65°C. Cette propriété trouvera son utilité dans les réactions où il faut utiliser une ADN polymérase thermostable, comme dans la **polymerase chain restriction PCR (réaction d'amplification d'ADN)**.

Elle peut aussi être utilisée dans **les techniques de séquençages de l'ADN** car elle permet de travailler à température élevée.

- **ARN-ADN**

- **La rétrotranscriptase « RT » (ou transcriptase reverse)**

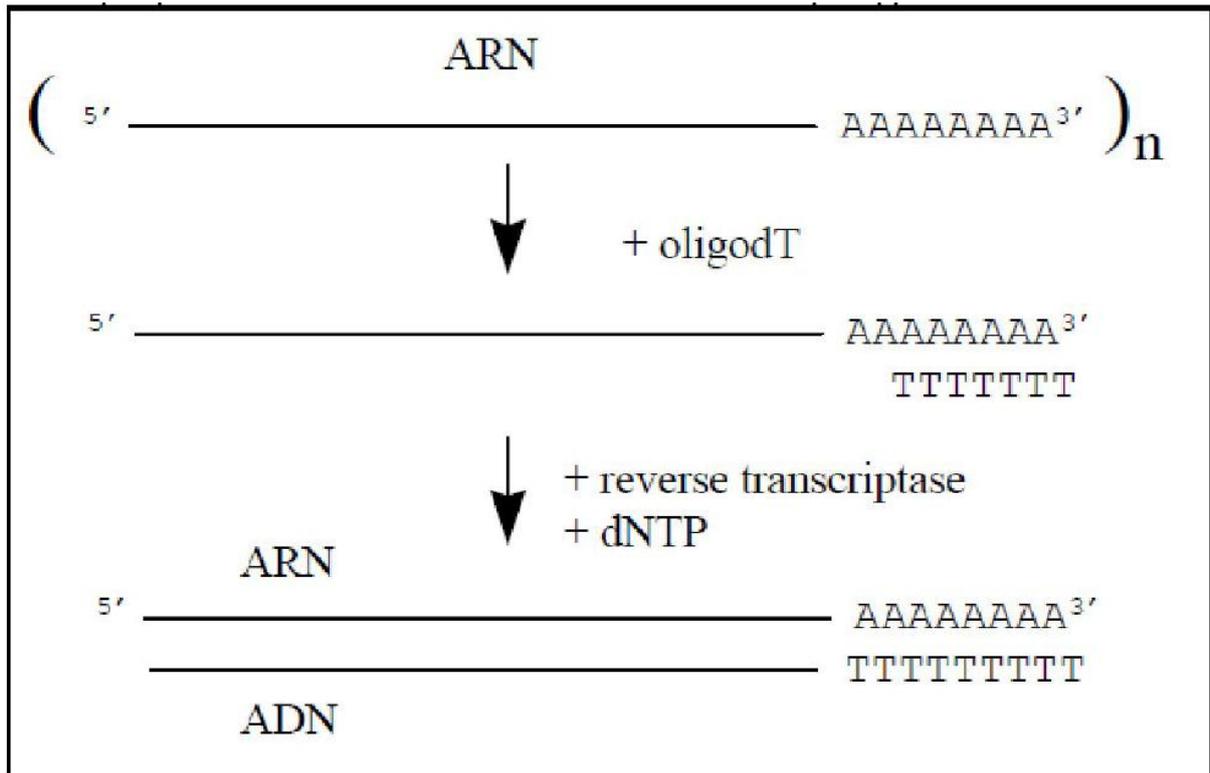
La RT est un enzyme isolé de **rétrovirus** comme HIV (virus de SIDA) et coronavirus (mais existant également ailleurs que dans les rétrovirus), qui permet de fabriquer un **ADNc à partir d'un ARNm**.

La **RT** est une **ADN polymérase 5'-3'** ayant les caractéristiques suivantes :

- elle est ARN dépendante ;
- elle est dépourvue d'activité exonucléase 3'-5' et est donc dénuée de fonction d'édition ; elle est ainsi encline aux erreurs ;
- elle possède une activité RNase.

Elle permet de synthétiser le premier brin de l'ADNc (ADN double brin) à partir d'un ARNm. Une amorce **oligo (dT)** qui s'hybrideront au poly (A) de l'ARNm et permettra d'initier l'action de la RT, qui synthétisera une copie complémentaire de l'ARNm jusqu'à son extrémité.

Une réaction très utile se produit à la fin de la copie de l'ARNm. La RT provoque le retournement de l'extrémité 3' du transcrit sur lui-même. Elle « tourne le coin » et est prête à recopier son propre travail, ce qui crée une épingle à cheveu de 10 à 20 bp. Seules quelques bases à la toute extrémité de la boucle ne sont pas appariées.



- ADN-ARN

- L'ARN polymérase

L'ARN polymérase est utilisé pour effectuer des transcriptions *in vitro*.