

LES AUTRES ENZYMES D'USAGE COURANT EN BIOLOGIE MOLECULAIRE.

I : Les enzymes recopiant les acides nucléiques. (Les polymérases)

Les polymérases d'acides nucléiques sont des enzymes qui synthétisent un nouveau brin d'acide nucléique complémentaire à une matrice d'ADN ou ARN.

Propriétés générales

Les enzymes recopiant aussi bien une chaîne d'ADN ou d'ARN ont les propriétés générales suivantes

- Elles synthétisent le nouveau brin dans le sens 5' à 3'.
- Cette synthèse s'effectue de manière complémentaire et antiparallèle.
- Elles nécessitent la présence de nucléosides triphosphates (NTPs) ou de désoxynucléosides triphosphates (dNTPs).

I.1) Les DNA polymérases.

1.1.1. Les enzymes recopiant un ADN en ADN (Les DNA polymérases DNA dépendantes)

Les DNA-polymérases sont des enzymes du noyau cellulaire qui agissent en phase S du cycle pour doubler systématiquement l'ensemble du génome diploïde.

Elles ne peuvent démarrer la condensation des nucléotides que sur la fonction alcool en 3' du ribose du dernier nucléotide **d'une amorce** (nucléotide qui doit être hybridé avec le nucléotide complémentaire qui sert de modèle).

Elles utilisent comme substrats des désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et des amorces de RNA et de DNA synthétisées par une **primase** (RNA polymérase capable de synthétiser un brin de RNA complémentaire d'un brin de DNA sur 10 nucléotides).

Certaines d'entre elles ont aussi des activités d'exonucléase qui peuvent s'exercer de 5' vers 3' ou dans l'autre sens, afin de corriger les erreurs d'incorporation (**fonction d'édition**)

Les DNA polymérases ont donc à la fois une **activité de polymérase** pour ajouter des nucléotides au nouveau brin de DNA, et une activité **exonucléase 3'→5'** (**et ou** exonucléase 5'→3') pour hydrolyser le dernier nucléotide incorporé.

Si le nucléotide incorporé est complémentaire du nucléotide du brin modèle et donc que l'hybridation des bases se fait normalement, l'activité de polymérase est plus rapide que celle d'exonucléase et le nucléotide suivant va être incorporé.

Si le nucléotide incorporé n'est pas complémentaire du nucléotide du brin modèle et donc qu'il y a mésappariement, l'activité d'exonucléase est plus rapide que celle de polymérase et ce nucléotide sera hydrolysé.

Beaucoup d'entre elles fonctionnent en milieu alcalin. Leur température optimale d'action se situe habituellement dans une fourchette de 20 à 40 °C.

L'activité de 3'→5' exonucléase permet à l'enzyme au cours d'une synthèse d'un fragment d'ADN de contrôler si l'appariement de la base qui vient d'être ajoutée est conforme aux règles de complémentarité, cette remarquable activité exonucléasique 3'→5' est encore appelée la **fonction d'édition de l'enzyme**.

Exemple 1) : DNA pol I (E. Coli)

La DNA polymérase I d'*Escherichia coli* initie la réaction à l'extrémité 3' rentrante d'une amorce d'ADN ou d'ARN. Elle incorpore des nucléotides à partir des quatre désoxyribonucléosides triphosphates, en hydrolysant un pyrophosphate et en incorporant le nucléoside et le phosphate α .

DNA pol I est douée d'une double fonction d'édition :

- exonucléase 5'→3' pour digérer le deuxième brin à partir de son extrémité 5' (nick translation)
- exonucléase 3'→5' pour digérer l'extrémité 3' d'un brin (correction immédiate des misappariements)

Les activités d'exonucléase s'exercent aussi sur les brins d'ARN hybridés (amorces).

Exemple 2) : Fragment de Klenow

La digestion de la DNA polymérase I par une protéase (la subtilisine) donne deux fragments : celui de 76 kD appelé (**fragment de Klenow**) possède encore deux des activités catalytiques de la polymérase : 5'→3' polymérase et 3'→5' exonucléase. Ce fragment peut être utilisé pour synthétiser le deuxième brin à partir d'un ADN simple brin et d'une amorce.

Les conditions de milieu et la vitesse de réaction sont les mêmes que celles de l'enzyme entière.

Le fragment de Klenow est utilisé pour :

- la synthèse du deuxième brin complémentaire d'un cDNA, le marquage du DNA et le séquençage du DNA par la technique des didésoxynucléotides.

Exemple 3) : T4 DNA polymérase

Dans une culture d'E. Coli infectée par le bactériophage T4, on peut purifier la DNA polymérase de ce phage. Comme le fragment de Klenow elle est dépourvue d'activité 5'→3' exonucléase, mais elle possède une activité 3'→5' exonucléase 200 fois plus grande.

L'activité de la T4 polymérase est aussi rapide que celle de la DNA polymérase I.

La DNA polymérase du phage T4 est utilisée pour le marquage du DNA.

Exemple 4) : Sequenase

Les séquenases sont une famille d'enzymes issues de la DNA polymérase du bactériophage T7.

Elles sont dépourvues par une modification du gène de toute activité d'édition (5'→3' exonucléase et 3'→5' exonucléase).

Les séquenases sont les plus rapides de toutes les DNA polymérases, elles sont utilisées dans les techniques de séquençage avec des didésoxyribonucléotides (Sanger).

Exemple 5) : Taq polymérase

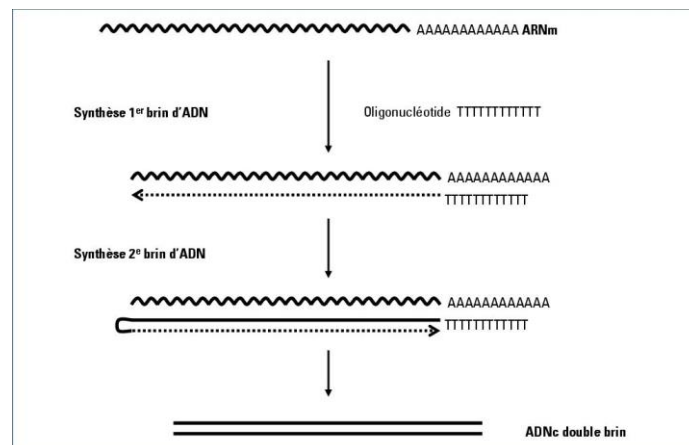
Thermus aquaticus est une bactérie thermophile des sources chaudes. Elle possède des enzymes thermorésistantes, dont une DNA polymérase (**Taq polymérase**) résistante à l'ébullition et active à 75-80 °C. La Taq poly est dépourvue d'activités d'édition (5'→3' exonucléase et 3' 5' exonucléase), et par conséquent elles dépourvu d'activité de correction, ce qui explique la fréquence élevée des erreurs commissent lors de la réplication.

La Taq polymérase est utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction = PCR), technique courante d'amplification des fragments de DNA.

1.1.2. Les enzymes recopiant un ARN en ADN (Les DNA polymérases RNA dépendantes)**Reverse transcriptase**

Les transcriptases réverses sont des DNA polymérases qui peuvent synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc) en prenant un ARN comme matrice, pour former un hybride ADN-ARN, elles catalysent donc la réaction inverse de la transcription, d'où le nom de transcriptases réverses. Les transcriptases réverses sont produites par des cellules infectées par des **rétrovirus**, virus à ARN qui font synthétiser un **ADNc** par la cellule-hôte afin de permettre leur réplication.

La transcriptase réverse est utilisée pour l'étude des ARN. Après la synthèse de l'ADN complémentaire, on détruit l'ARN matrice, puis on soumet l'ADNc à l'amplification par PCR (construction des banques ADNc). Elle possède aussi une activité **RNAase H**.



I.2 Les RNA polymérase.

Les enzymes recopiant un ADN en un ARN (Les RNA polymérase DNA dépendantes)

A) RNA polymérase II

Les RNA polymérase II de tous les organismes transcrivent l'un des deux brins d'ADN de la double hélice de l'ADN en un ARNm simple brin, la synthèse s'effectue sans amorce dans le sens 5'→3'.

La transcription qu'elle catalyse nécessite des ribonucléosides triphosphates comme substrats (ATP, CTP, GTP et UTP).

- Elles sont dénuées d'activité d'édition.

L'énergie de la réaction est fournie par l'hydrolyse des liaisons riches en énergie des nucléosides triphosphates.

Enfin, dans des conditions normales de transcription, les RNA polymérase ne peuvent démarrer la transcription que si l'ADN à transcrire possède le promoteur spécifique correspondant (site de reconnaissance et site de départ).

B) RNA polymérase (phages)

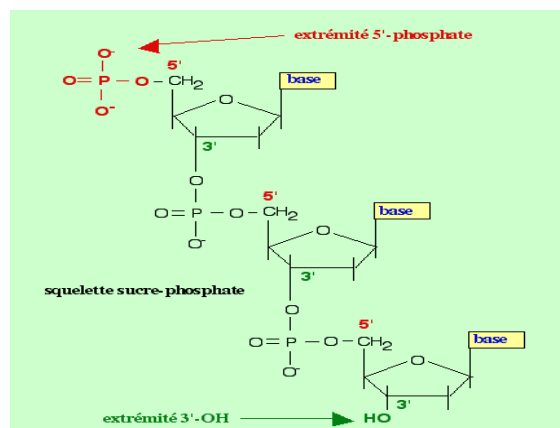
Les RNA polymérase sont les enzymes de la transcription. Elles sont essentielles au cycle des bactériophages à ADN comme le phage T7 d'*Escherichia coli*. Les RNA polymérase des phages sont utilisées pour la transcription in vitro, pour la synthèse des sondes d'ARN et pour l'analyse des messagers

II. Les ligases

Dans la cellule, l'ADN ligase répare les discontinuités qui peuvent apparaître dans un ADN double brins, notamment lors de la réplication.

C'est une enzyme capitale puisqu'elle permet la construction de molécules d'ADN recombinées

Les DNA ligases sont des enzymes qui sont capables de reconstituer la liaison phosphoester entre le carbone 3'-OH et le phosphate-5' de deux nucléotides voisins sur un brin de DNA.



A) DNA ligase (E. Coli)

Les DNA ligases catalysent la liaison de l'extrémité 5'-phosphate terminale d'un brin d'ADN avec l'extrémité 3'-OH terminale d'un autre brin. La DNA ligase de *E. coli* ne lie pas les bouts francs de l'ADN, mais elle est toujours active pour souder les fragments d'ADN double brin à extrémités collantes, ou pour fermer une brèche dans un brin d'ADN dont la resynthèse est achevée.

La DNA ligase d'*E. coli* utilise le **NAD+** comme coenzyme donneur d'énergie.

Elle n'a pas d'activité sur les RNA.

Les DNA ligases sont utilisées dans le clonage des fragments d'ADN et dans la construction des vecteurs.

B) DNA ligase (phage T4)

La DNA ligase du bactériophage T4 est moins spécifique que celle d'*E. coli* : elle lie bien les fragments de DNA à bouts francs et fonctionne dans la plupart des tampons utilisés par les enzymes de restriction. La T4 DNA ligase agit aussi mais moins rapidement sur les ARN.

La DNA ligase du phage T4 utilise l'ATP comme donneur d'énergie.

C) RNA ligase (phage T4)

La RNA ligase du bactériophage T4 catalyse la liaison des fonctions 5'-phosphate des ADN ou ARN simple brin à la fonction 3'-OH d'autres fragments simple brin d'ARN ou d'ADN. Elle est utilisée pour le marquage des ARN sur leur extrémité 3' et pour la synthèse d'oligonucléotides.

III. Les nucléases

Définition : les nucléases dégradent les molécules d'ADN en rompant les liaisons phosphodiester liant un nucléotide au suivant

III.1. Endonucléases

III.1.1. DNAase


A) Désoxyribonucléase I (extraite du pancréas de bovin)

La **désoxyribonucléase I** est l'enzyme de la digestion des ADN chez les animaux. Elle hydrolyse les ADN **double ou simple** brin jusqu'à un mélange de nucléotides et d'oligonucléotides. Elle agit comme **une endonucléase**, préférentiellement sur les liaisons adjacentes aux nucléosides **pyrimidiques (C ou T)**. Elle hydrolyse les liaisons au hasard indépendamment de la séquence.

La DNase pancréatique est utilisée pour introduire des brèches au hasard dans l'ADN double brin en vue d'un marquage par la DNA polymérase.

On l'emploie aussi par exemple lorsqu'on veut éliminer l'ADN d'une solution.

B) Nucléase S1(isolée d'un champignon, *Aspergillus oryzae*)

La nucléase S1 est une nucléase spécifique des ADN (ou ARN) simple brin, **bien qu'à des concentrations élevées** elle agisse aussi sur les hybrides  (à conditions de ne pas utiliser de grandes quantités d'enzyme)

Elle est utilisée pour ouvrir les épingles à cheveux formées lors de la synthèse des cDNA.

III.1.2. RNAase**A) Ribonucléase A**

La ribonucléase A est l'enzyme de la digestion des ARN chez les animaux. Elle agit comme une endonucléase, en 3' préférentiellement après les nucléotides pyrimidiques (après C et U)

La ribonucléase pancréatique est une des plus petites et des mieux connues des enzymes. Elle est thermorésistante et extrêmement active. Il existe des inhibiteurs de la RNase comme les protéines extraites du placenta qui sont souvent utilisée pour protéger les ARN dans les réactions enzymatiques.

Elle est utilisée pour éliminer l'ARN dans une préparation protéique ou de DNA

B) Ribonucléase T1 (champignon ; (aspergillus)

La ribonucléase T1 hydrolyse spécifiquement les ARN en rompant les liaisons 3'-5' phosphodiester en aval des GMP.

Elle est utilisée pour hydrolyser les ARN non-hybridés lors des expériences d'hybridation ARN-ADN.

C) Ribonucléase H

La RNase H :La ribonucléase H est une ribonucléase bactérienne qui intervient dans la maturation des RNA amorces qui servent à initier la réplication des plasmides. Elle coupe après tous les nucléotides.

Elle est utilisée lors de la synthèse du deuxième brin d'un cDNA issu de la reverse transcription, afin de limiter les brins synthétisés en dehors de l'amorce spécifique, et elle permet de détruire l'ARN dans les hybrides ADN- ARN.

III.1. Exonucléases

Les exonucléases sont des enzymes qui hydrolysent le premier ou le dernier nucléotide au bout d'un brin d'acide nucléique.

A) Exonucléase III

L'exodésoxyribonucléase III d'*Escherichia coli*, hydrolyse de préférence les extrémités 3'OH des DNA double-brin en remontant vers le côté 5'. (3'→5' exonucléase). Elle produit des nucléosides 5'-phosphate.

B) Nucléase BAL 31(obtenue de cultures d'*Alcaligenes faecalis*)

La nucléase BAL 31 est tout d'abord une exonucléase 3'→5' qui résorbe progressivement les extrémités 3' des ADN double brin. Sur les brins 5' sortants qu'elle isole elle agit ensuite comme une endonucléase pour détruire les fragments d'ADN simple brin. (est une exo- endonucléase sur les deux brin d'un ADN double brin : exo sur le double brin et endo sur le simple brin).

B) Exonucléase de phage λ

L'exodésoxyribonucléase du bactériophage λ, qu'on rencontre aussi chez les bactériophages T4 ou T7, ainsi que chez les Mammifères (DNase IV), hydrolyse de préférence les extrémités 5'-phosphate des DNA double-brin en continuant vers le côté 3'. (5'→3' exonucléase).

A noter

La phosphatase alcaline : elle retire le phosphate en 5' sur l'ADN, l'ARN et les nucléotides libres. L'élimination des phosphates en 5' empêche toute action des ligases.

La T4 polynucléotide kinase : elle transfère le phosphate d'un ATP sur le phosphate en 5' d'un polynucléotide.

Rq)

Les enzymes qui déphosphorylent : les phosphatases : Les phosphatases catalysent l'élimination d'un groupement phosphate en 5' d'une chaîne d'ADN.

Les enzymes qui phosphorylent : les kinases Les kinases permettent le transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP.