

I. PHENOMENE DE RESTRICTION :

A) **Le phénomène de restriction** a été observé bien avant que les enzymes de restriction ne fussent mises en évidence. En effet, lorsqu'un bactériophage colonise une bactérie, en temps normal, un cycle phagien est lytique. Le phénomène de lyse bactérienne peut ne pas avoir lieu, ceci est expliqué par le fait que:

1. L'ADN phagique est intégré, sous forme silencieuse, dans celui de la bactérie :

Cycle lysogénique.

2. L'ADN phagique est complètement détruit (hydrolysé) par les enzymes de la bactérie hôte.

Ce mécanisme de résistance aux bactériophages, **dénommé restriction**, fut étudié par W. Arber qui a découvert en 1962 que les bactéries sont capables de se protéger de l'infection par un virus, en découpant l'ADN viral.

Des chercheurs ont entamé une série de travaux pour expliquer cette résistance, ils ont trouvé que lorsqu'un bactériophage infecte une bactérie, il lui « injecte » son ADN. Sans système de défense adapté, de nombreux bactériophages seront alors produits dans la bactérie qui sera finalement lysée. Cet acide nucléique viral est porteur de sites particuliers (= **sites de restriction**) reconnus par les **endonucléases de restriction** de la bactérie qui entrent en action et **fragmentent** l'ADN viral étranger. Parallèlement, pour protéger son propre ADN, la cellule bactérienne fabrique **des enzymes de modification, les méthylases**, qui ajoutent un **groupement méthyle** aux nucléotides reconnus par ses propres endonucléases de restriction.

La coexistence chez les bactéries des phénomènes de restriction et de modification amène à la naissance de notion du **système R-M**.

B) Restriction et modification contrôlées par l'hôte

Les systèmes de restriction permettent aux bactéries de vérifier l'origine de tout ADN pénétrant dans la cellule et de le détruire s'il étranger, les endonucléases de restriction reconnaissent des séquences spécifiques dans cet ADN et les coupent en fragment.

Quand l'ADN entrant est celui d'un bactériophage, l'effet est une réduction de l'efficacité de la propagation du phage (les phénomènes de restriction et de modification ont été très bien mis en évidence et étudiés par le comportement du phage lambda infectant de souches différentes d'E.coli.

La restriction n'opère pas au niveau de site l'adsorption des phages sur les cellules hôtes, mais si les phages sont marqués au p³², on constate que leur ADN est dégradé rapidement après l'injection, et l'endonucléase responsable de cette dégradation est appelée endonucléase de restriction ou enzymes de restriction.

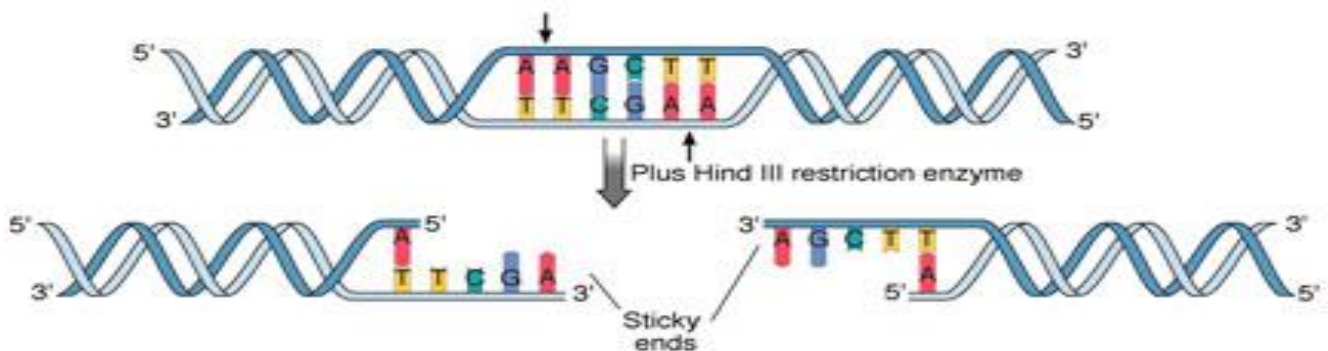
L'hôte restrictif doit bien protéger son propre ADN des effets potentiellement létaux de son endonucléase de restriction et pour cela son ADN doit être modifié de façon appropriée.

La modification s'effectue par la **méthylation** de certaines bases d'un petit nombre de motifs de séquences dans l'ADN, qui sont les sites de reconnaissance par l'endonucléase de restriction

II) LES ENDONUCLEASES (ENZYMES) DE RESTRICTION

Définition : Ce sont des enzymes, principalement d'origine **bactérienne**, capables de **couper** de manière bien définie et **reproductible** l'ADN double brin (et ce quel que soit son origine) à des endroits **spécifiques** (séquences nucléotidiques) appelés sites de restriction généralement de 4 à 8 paires de bases, ces sites sont de type **palindrome** :(lecture identique dans un sens sur un brin, et dans l'autre sur l'autre brin). (Ésope reste ici et se repose)

Elles appartiennent à la classe des **endonucléases**, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver (hydrolyser) les **liaisons phosphodiester** entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique. Les endonucléases se différencient des **exonucléases** qui dégradent la molécule d'ADN à partir de l'une de ses extrémités (3' ou 5').



Séquences d'ADN reconnues par les enzymes 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'). Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4, 5 ou 6 paires de bases. Il faut remarquer que dans une molécule d'ADN, on rencontre statistiquement des séquences reconnues par des enzymes de restriction. Ainsi,

le nombre de fragments de restriction obtenus en traitant un génome par une enzyme de restriction est fonction de la fréquence des sites de reconnaissance présents. Cette fréquence est statistiquement plus élevée si la séquence est plus courte.

En effet, 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. Ainsi, par exemple, la séquence GATC reconnue par l'enzyme *MboI* est présente avec une fréquence statistique de $1 / 256$ paires de bases ($1/4^4$), dans la séquence de six nucléotides : GGATCC reconnue par l'enzyme Bam HI, on aura donc une fréquence de coupure statistique de $1 / 4^6$, soit 1 coupure tous les 4096 nucléotides. (Séquence de N nucléotides se répète généralement $1/4^N$).

Origine des enzymes de restriction.

Les enzymes de restriction sont extraites de **micro-organismes**, le plus souvent des **bactéries**. Les bactéries peuvent être parasitées par des virus à ADN. Les bactéries fabriquent des enzymes de restriction qui sont capables de cliver les ADN étrangers. Pour éviter une auto-destruction de leur propre ADN, elles se protègent contre leurs propres **enzymes de restriction** par une modification des sites de restriction correspondants. Ces enzymes de modification sont des **méthylases** bactériennes (ou enzymes de méthylation). La **méthylation** (surtout de la **cytosine** [sur le carbone 5] ou de l'**adénine** [sur l'azote 6]) appartenant à des sites de restriction aboutit à une inactivation de l'enzyme de restriction correspondante. Cette méthylation peut se réaliser sur une base ou sur plusieurs bases appartenant au site de restriction.

Nomenclature des enzymes de restriction (Systèmes de Restriction – Modification) :

La découverte d'un grand nombre de **systèmes de restriction – modification** rendait nécessaire l'utilisation d'une nomenclature uniformisée. Une nomenclature adéquate fut proposée par Smith et Nathans (1973), Cette nomenclature n'obéit pas aux règles de l'IUPAC (**I**nternational **U**nion of **P**ure and **A**pply**C**hemistry), mais dépend de règles spécifiques qui tiennent compte de la bactérie dont a été isolée l'enzyme de restriction, le nom comporte plusieurs lettres (3 ou 4)

- La première lettre, **en majuscule**, représente l'initiale du genre bactérien
- Les deux lettres, **minuscules**, qui suivent la première sont représentatives de l'espèce.
- Le chiffre romain qui suit ces trois lettres est le numéro d'ordre de découverte de l'enzyme pour la même bactérie source.
- La dernière lettre majuscule n'est pas obligatoire pour toutes les endonucléases de restriction. Elle est représentative de la souche de la bactérie d'où l'enzyme a été isolée. Les trois premières lettres de cette abréviation sont toujours écrites en italique.

Exemple :

***Bam*HI**

- ***B*** première lettre du **genre** bactérien (*Bacillus*)
- ***am*** lettres de l'**espèce** bactérienne (*amyloliquefaciens*)
- ***H*** représente la souche bactérienne (*H*)
- ***I*** ; numéro de l'enzyme extraite.

HpaI

- **H** première lettre du **genre** bactérien (*Haemophilus*)
- **Pa** lettres de l'**espèce** bactérienne (*parainfluenzae*)
- **I** ; numéro de l'enzyme extraite.

La bactérie **Escherichia coli Ry13**

Les

Les enzymes **EcoRI**: première enzyme isolée chez **Escherichia coli Ry13**

Les enzymes **EcoRV**: cinquième enzyme isolée chez **Escherichia coli Ry13**

Les enzymes de modification (méthylases) reconnaissent les mêmes sites que les endonucléases de restriction et pour faire la distinction entre les activités de restriction et de méthylation en matière de nomenclature on utilise respectivement les préfixes R et M, par exemple ; R.**SmaI** et M.**SmaI**.

Les classes d'enzymes de restriction.

Ces enzymes sont classés en fonction de leur site de reconnaissance et leur lieu de coupure, on distingue 3 types d'enzymes de restriction :

1. **Enzymes de type I** : Les enzymes de type I reconnaissent des séquences sur l'ADN sans aucune symétrie. Ces enzymes ne coupent pas au niveau de la séquence de reconnaissance mais 1000 à 5000 paires de bases plus loin et libèrent plusieurs dizaines de nucléotides.
2. **Enzymes de type II** : Ce sont les plus nombreuses et les plus utilisées aux laboratoires de génie génétique. Leurs sites de restrictions de 4 à 8 paires de bases sont des séquences palindromiques (se lisent de droite à gauche et inversement, comme le mot radar et la phrase "esope reste ici et se repose"). Elles coupent au niveau de leurs sites de restriction.
3. **Enzymes de type III** : L'enzyme reconnaît une séquence symétrique mais coupe à une vingtaine de paires de bases plus loin.

En résumé, on a 3 types d'enzymes de restriction :

- * Type I : coupe l'ADN 1000 à 5000 paires de bases après le site de restriction reconnu.
- * Type II : coupent au niveau du site de restriction (utile)
- * Type III= type I mais à 20 paires de bases après le site de restriction

pour mieux comprendre lire le paragraphe suivant:

Les différents types de système restriction et modification (R-M)

Le premier système caractérisé était du **type I** dont un exemple est celui d'**E. coli K-12**, l'enzyme active comporte deux sous unités impliquées dans la restriction, deux sous unités de modification (méthylation), et une sous unité responsable de la reconnaissance. Les réactions de méthylation et de coupure de l'ADN nécessitent l'**ATP** et des **cofacteurs**. Les séquences reconnues sont assez longues et ne représentent pas une symétrie, de plus l'enzyme coupe l'ADN à une certaine distance de la séquence reconnue. Comme la même enzyme effectue les réactions de coupure et de méthylation. L'ADN cible peut être modifié avant d'être coupé **ce qui limite considérablement l'utilité de système du type I pour la manipulation génétique.**

Les enzymes de **type III** reconnaissent des séquences symétriques mais ressemblent par ailleurs aux systèmes du type I et sont donc peu utiles.

La plupart des systèmes R-M utiles sont du type II. Ils présentent une série d'avantages par rapport aux autres systèmes (I et III). D'abord la restriction et la modification sont effectuées par des enzymes distinctes, de sorte qu'il est possible de couper l'ADN sans interférence de la modification, ensuite la réaction de restriction ne nécessite pas l'ATP et des cofacteurs. Le facteur le plus important est certainement que ces enzymes coupent l'ADN dans la séquence qu'elles reconnaissent spécifiquement.

Remarque : La position à laquelle l'enzyme de restriction coupe est habituellement indiquée par le symbole [/] et les nucléotides méthylés par l'enzyme de modification sont marqués d'un astérisque dans le cas de *EcoRI*, cela donne ;

5'-G/AA*TTC-3'

3'-CTTA*A/G-5'

On simplifie souvent la description des sites de reconnaissance en ne montrant qu'un des brins d'ADN dans le sens 5' vers 3', donc le site de reconnaissance *EcoRI* sera décrit comme suit

G/AA*TTC

Types de coupures induites par les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction de type II provoquent **2 types de coupure** :

1) Soit une coupure franche : la coupure a lieu au milieu du site de restriction (même niveau sur les deux brins : **centre de symétrie** du palindrome), ce qui donne des extrémités à **bouts francs**, Il ne peut pas y avoir de liaison spontanée entre les fragments qui ont résulté de cette coupure. Seule une T4 ligase peut rétablir la ligation des deux brins d'ADN résultant de la coupure.

Exemple : les coupures de ***HaeIII*** (*Haemophilus aegypticus*):

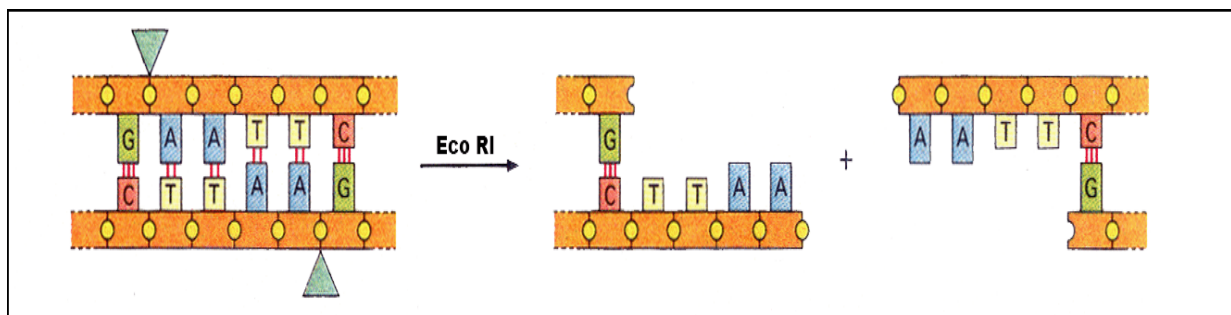


Les bouts francs n'ont pas un grand intérêt en génie génétique

2) Soit une coupure décalée : sur les deux brins, donne des **extrémités cohésives**.

Extrémités débordantes résultent d'une coupure décalée sont auto complémentaire entre elles. Elles peuvent donc se réapparier spontanément si les conditions sont favorables et une ligase viendra rattacher les deux brins par une liaison phosphodiester. On parle alors d'extrémités cohésives ou de **bouts collants** (5' sortantes, ou 3' sortantes).

Ces enzymes sont très utilisées pour fabriquer des ADN recombinant, car les fragments de différents ADN coupés par la même enzyme donnent les mêmes bouts qui peuvent s'associer par leurs extrémités cohésives. L'association est ensuite rendue covalente par l'action d'une ADN ligase



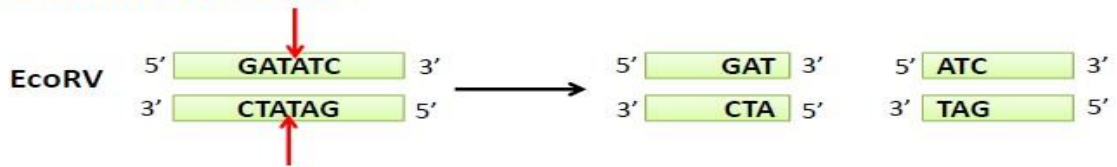
Coupure décalée du côté 5' : ce type de coupure génère des extrémités 5'P débordantes ou sortantes, exemple, les coupures de *EcoRI*



Coupure décalée du côté 3' : ce type de coupure génère des extrémités 3'OH débordantes ou sortantes, exemple, les coupures de *PstI*



- Extrémités franches



- Extrémités cohésives

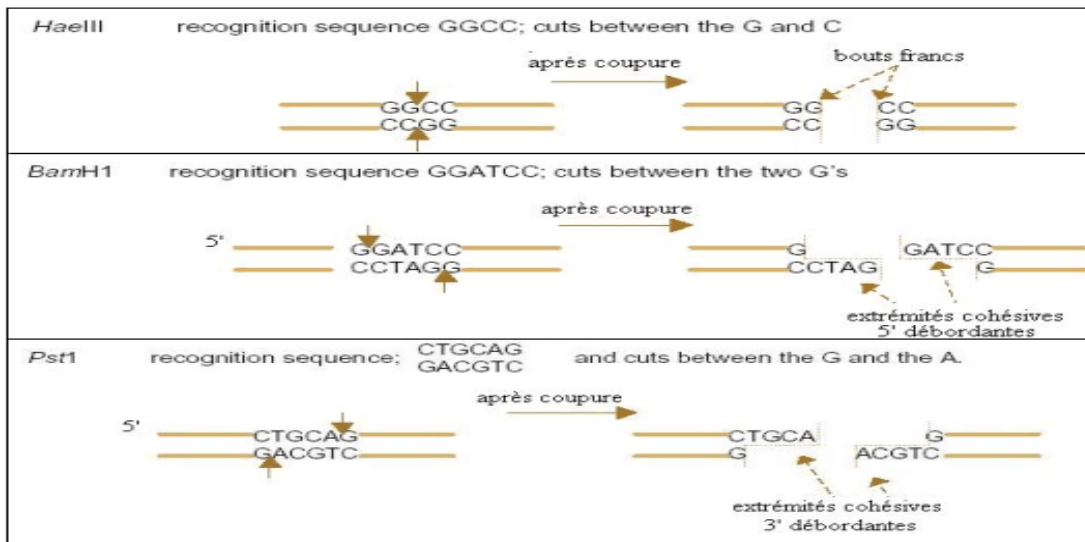
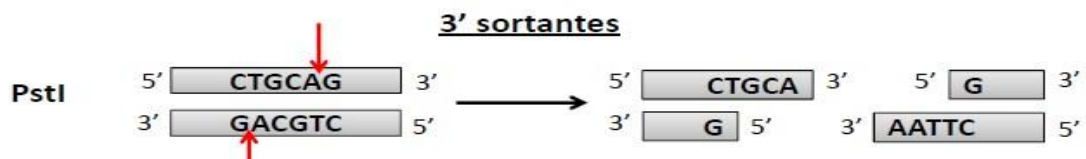
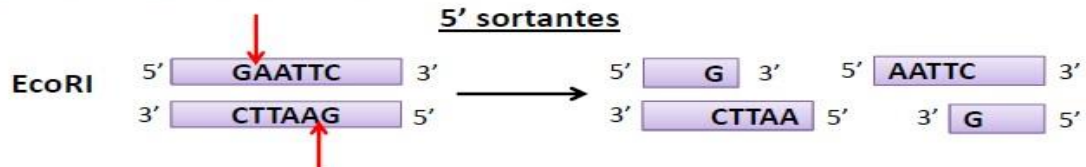
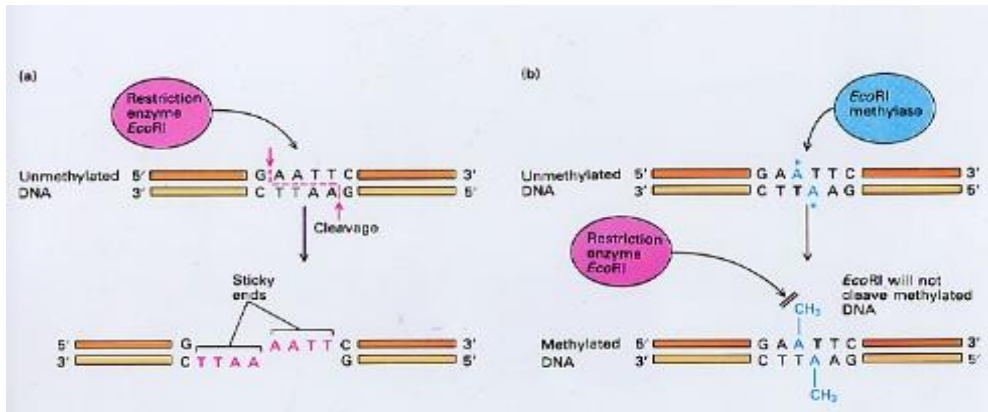


Figure 2 : présentant les trois sortes de coupures générées par des enzymes de restriction

Méthylation des sites de restriction et inactivation des enzymes de restriction.

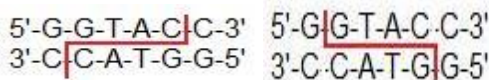
L'ADN bactérien présente des sites de restriction susceptibles d'être repérés par les enzymes de restriction que possède la bactérie. Pour éviter une auto-destruction, les enzymes de modification de l'ADN bactérien interviennent. Ces enzymes de modification sont des méthylases bactériennes (ou enzymes de méthylation). La méthylation de la cytosine (sur le carbone 5) ou de l'adénine (sur l'azote 6 ou 7) appartenant à des sites de restriction aboutit à une inactivation de l'enzyme de restriction correspondante. Cette méthylation peut se réaliser sur une base ou sur plusieurs bases appartenant au site de restriction.



Notion d'isoschizomères

Des enzymes de restriction qui reconnaissent la même séquence et la coupent de façon identique sont dites **isoschizomères**.

Des enzymes de restriction qui reconnaissent la même séquence mais la coupent de façon différente sont dites **néoschizomères**. *SmaI* (CCC/GGG) et *XmaI* (C/CCGGG)



***KpnI*Acc65I**

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 : Les enzymes ***BamHI***(G / GATCC) et ***MboI***(/ GATC):

Après action de ***BamHI***:

Premier fragment avant clivage par <i>BamHI</i> :	Après clivage par <i>BamHI</i> :
5'-G-G-A-T-C-C-3'	5'-G-3' (1)
3'-C-C-T-A-G-G-5'	3'-C-C-T-A-G-5'
	+
	5'-G-A-T-C-C-3' (2)
	3'-G-5'

Après action de ***MboI***

Second fragment avant clivage par <i>MboI</i> :	Après clivage par <i>MboI</i>
5'-A-G-A-T-C-A-G-C-3'	5'-A-3' (3)
3'-T-C-T-A-G-T-C-G-5'	3'-T-C-T-A-G-5'
	+
	5'-G-A-T-C-A-G-C-3' (4)
	3'-T-C-G-5'

Ligatures possibles : 1+4 et 2+3.

Enzyme	site reconnu	extrémités cohésives	bout collant
Sau3A I	GATC		5'-GATC
BscF I	GATC		5'-GATC
BstX2 I	RGATCY		5'-GATC
BfuC I	GATC		5'-GATC
Xho II	RGATCY		5'-GATC
BstEN II	GATC		5'-GATC
BamH I	GGATCC		5'-GATC
Bcl I	TGATCA		5'-GATC
Bgl II	AGATCT		5'-GATC

Tableau : Enzymes qui génèrent des extrémités cohésives identiques et donc compatible

Activité étoile (star activity) :

Dans des conditions particulières telles qu'un PH élevé ou une force ionique basse, certaines enzymes de restriction coupent des séquences similaires mais pas identiques à leur séquence de reconnaissance normale, cette spécificité modifiée est appelée l'activité étoile (star activity) exp; *EcoRI** (l'activité modifiée de *EcoRI*) coupe la séquence N/AATTN dans laquelle N représente n'importe quelle base, alors que le *EcoRI* coupe la séquence G /AATTC

Application Enzymes de restriction

- Découpage de l'ADN à des endroits précis
- Mise en évidence de mutations : les mutations changent la séquence de l'ADN et peuvent donc faire apparaître un nouveau site de restriction ou en faire disparaître un qui existait.
- Insertion d'un nouveau gène dans un génome grâce aux « bouts collants » (sticky ends) générés par ces enzymes : voir la fiche « création d'OGM »

Exemples des enzymes de restriction

Hae III (est une enzyme de restriction produite par *Haemophilus aegypticus*)

Le site de liaison à l'ADN est formé de **quatre paires** de nucléotides :



- Les sites de restriction sont souvent de **type palindrome**, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiesterse **fait au centre de symétrie** du palindrome toutes les paires de nucléotides restent appariées : les fragments qui en résultent sont dits « **à bouts francs** ».

- La **méthylation** de la cytosine immédiatement en aval du site d'hydrolyse inhibe la reconnaissance du site par *Hae III*. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

EcoRI (est une enzyme de restriction produite par **Escherichia coli, souche R.**)

- Le site de liaison à l'ADN est formé de **six paires** de nucléotides :



Les sites de restriction sont souvent de type **palindrome**, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait **loin du centre de symétrie du palindrome** certaines paires de nucléotides restent non appariées : les fragments qui en résultent sont dits « **à bouts collants** ».

- La méthylation des adénines ou de la cytosine du site d'hydrolyse inhibent la reconnaissance du site par *EcoRI*. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

A RETENIR

- ❖ Deux molécules d'ADN coupées par le même enzyme ont les mêmes bouts cohésifs (complémentaires) et peuvent donc être soudées par des liaisons covalentes par l'aide d'un enzyme ligase. Ainsi, 2 ADNs venant de deux espèces différentes peuvent être soudées et forment ainsi un ADN recombiné.
- ❖ Pour joindre deux fragments d'ADN, il n'est pas indispensable qu'ils aient été produits par la même endonucléase de restriction, plusieurs endonucléases de restriction génèrent des extrémités cohésives compatibles.
- ❖ Certaines enzymes peuvent reconnaître des séquences de restriction non palindromiques (**palindrome imparfait**), par exemple : *MstII* (*Microcoleus species*) : Le N et le M dans la séquence de *MstII* peuvent être remplacés par une des 4 bases et son complément et cette séquence de restriction du *MstII* est un exemple de **palindrome imparfait** puisqu'il comporte un nombre impair de paires de bases.;;

