

2: Les enzymes de restriction

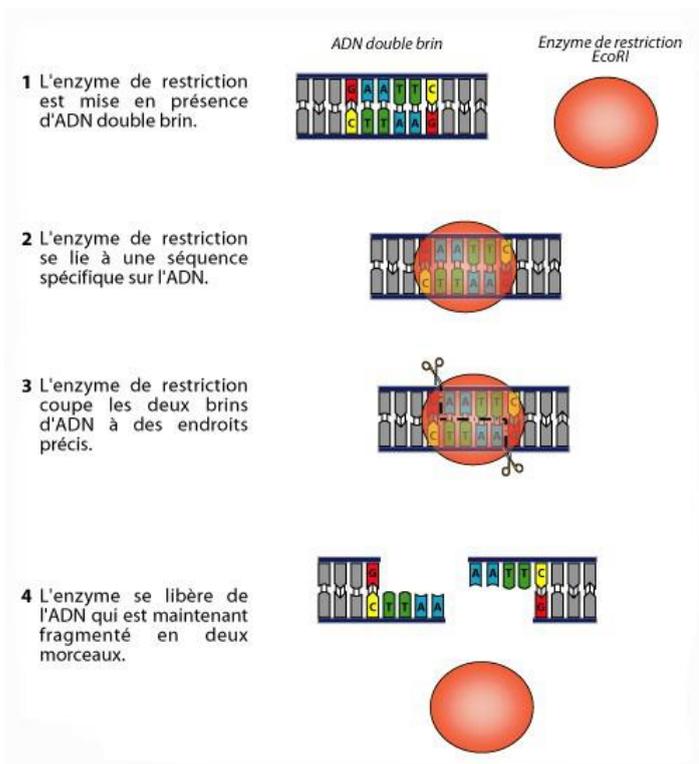
Les enzymes de restriction sont des protéines synthétisées par des bactéries pour se protéger des infections de virus (bactériophages). Ces enzymes coupent l'ADN viral à des endroits spécifiques. Ce mécanisme de résistance aux bactériophages, dénommé restriction, fut étudié par W. Arber à l'Université de Genève dans les années 60. Il obtint avec D. Nathans et H. Smith le prix Nobel de Médecine en 1978 pour la découverte et les applications des enzymes de restriction.

Thèmes: Enzymes de restriction, coupure de l'ADN, séparation par électrophorèse sur gel d'agarose, complexité des génomes, cartes de restriction.

Introduction: 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. De manière à résister à cette infection la bactérie synthétise des enzymes de restriction qui vont fragmenter l'ADN viral étranger. Parallèlement, la bactérie possède des méthylases capables de modifier (méthyle) son propre ADN afin qu'il ne soit pas reconnu par les enzymes de restriction.

Aujourd'hui plusieurs centaines d'enzymes de restriction différentes sont disponibles commercialement. Elles font parties des outils (ciseaux moléculaires) indispensables aux biologistes moléculaires. Ces outils permettent de couper l'ADN afin d'isoler certains fragments, de construire des cartes génétiques (cartes de restriction), de créer de nouvelles combinaisons d'ADN, etc. Les enzymes de restrictions ont permis l'avènement de la biologie moléculaire.

Le nom d'une enzyme de restriction indique son origine: *Sau3A* provient de *Staphylococcus aureus* 3A, *BamHI* provient de *Bacillus amyloliquefaciens* H, *EcoRI* provient de *Escherichia coli*, *MspI* provient de *Moraxella species*, *KpnI* provient de *Klebsiella pneumoniae*. Ces enzymes reconnaissent et coupent des séquences de nucléotides très spécifiques appelées sites de restriction. Ces sites sont pour la plupart palindromiques, c'est-à-dire qu'ils sont composés de séquences nucléotidiques identiques sur les deux brins mais en orientations antiparallèles.



Sites de restriction	Résultats après coupure
<p><i>EcoRI</i></p> <p>NNNN <u>GAATTC</u> NNNN NNNN <u>CTTAAG</u> NNNN</p>	<p>NNNNG AATTCNNNN NNNNCTAA GNNNN</p>
<p><i>MspI</i></p> <p>NNNN <u>CCGG</u> NNNN NNNN <u>GGCC</u> NNNN</p>	<p>NNNNC CGGNNNN NNNNGGC CNNNN</p>
<p><i>EcoRV</i></p> <p>NNNN <u>GATATC</u> NNNN NNNN <u>CTATAG</u> NNNN</p>	<p>NNNNGAT ATCNNNN NNNNCTA TAGNNNN</p>
<p><i>KpnI</i></p> <p>NNNN <u>GGTACC</u> NNNN NNNN <u>CCATGG</u> NNNN</p>	<p>NNNNGGTAC CNNNN NNNNC CATGGNNNN</p>

Suivant le nombre de nucléotides reconnus, l'enzyme de restriction coupe l'ADN plus ou moins fréquemment. Par exemple, pour cette expérience nous utilisons deux enzymes différentes qui reconnaissent respectivement quatre et six nucléotides: *MspI* (CCGG) et *BamHI* (GGATCC). En moyenne ces deux enzymes coupent l'ADN toutes les 256 (4⁴) et 4096 (4⁶) paires de bases. Suivant l'enzyme de restriction, les extrémités des fragments obtenus peuvent être formées de deux brins d'égales longueurs, appelés "bouts francs" (blunt ends) ou présenter un brin plus long que l'autre. Dans ce cas l'extrémité est dénommée "bouts collants" (sticky ends).

L'EXPERIENCE:

L'ADN utilisé dans cette expérience est celui de plasmides que nous utilisons dans notre laboratoire. Les plasmides sont des ADN circulaires, relativement petits. Le plasmide pUC19 compte environ 2600 nucléotides. Il sert de "vecteur" pour cloner des gènes. Le plasmide pUC19-TIF1 contient en plus un fragment d'ADN de levure d'environ 5800 paires de bases. En comparaison, l'ADN du bactériophage λ (lambda) est plus grand (environ 50'000 paires de bases, 50kpb), le chromosome d'une bactérie (*Escherichia coli*) contient 3'500'000 paires de bases (3'500 kpb), le génome d'une levure (2 x 16 chromosomes) contient 2x 14'000'000 paires de bases (14'000 kbp) et les 2 x 23 chromosomes d'un être humain contiennent 2 x 3'000'000'000 bp (6'000'000 kbp). En longueur cela correspond à 1.4 mm pour le chromosome bactérien, 4.3 mm pour les chromosomes de la levure et 2 m pour les chromosomes d'un être humain.

Schéma de l'expérience

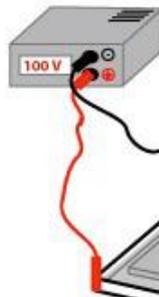
1 L'ADN est mélangé avec une enzyme de restriction. Les tubes sont alors incubés à 37°C pour permettre la coupure de l'ADN.



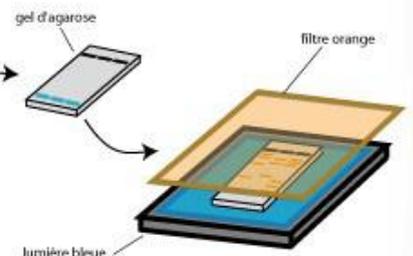
2 Les échantillons sont chargés sur un gel d'agarose



3 Un champ électrique permet de faire migrer et de séparer les fragments d'ADN.



4 A la fin de la migration le gel d'agarose est déposé sur la lumière bleue. Un filtre orange permet de visualiser les fragments d'ADN. Le gel peut ainsi être photographié.



Protocole :

Pour des raisons de difficulté de pipetage et de temps, nous conseillons que 4 groupes digèrent le plasmide pUC19 (tubes 1, 2, 3) et les 4 autres groupes digèrent le plasmide pUC19-TIF1 (tubes 4, 5, 6).

1) Digestion :

- Numéroté 6 tubes Eppendorf.
- Ajouter les éléments comme décrit dans le tableau ci-dessous (les volumes sont en μ l).

	H2O	pUC19	pUC19-tif1	Tampon de digestion 10x	BamHi	MspI
tube 1	12.5 µl	1 µl	-	1.5 µl	-	-
tube 2	11.5 µl	1 µl	-	1.5 µl	1 µl	-
tube 3	8.5 µl	4 µl	-	1.5 µl	-	1 µl
tube 4	12.5 µl	-	1 µl	1.5 µl	-	-
tube 5	11.5 µl	-	1 µl	1.5 µl	1 µl	-
tube 6	8.5 µl	-	4 µl	1.5 µl	-	1 µl

- Mélanger en pipetant plusieurs fois
- Incuber la réaction à 37°C de 30 à 60 minutes.

2) Préparation du gel d'agarose

Pendant la digestion préparer le gel d'agarose. Ce gel est une matrice permettant de séparer les molécules d'ADN selon leurs tailles dans un champ électrique. Les petits fragments migrent plus vite que les grands, la concentration d'agarose est choisie en fonction de la taille des fragments à séparer. Ici nous allons utiliser un gel à 1.5% d'agarose.

- Peser 1.05 g d'agarose et mettez-le dans un Erlenmeyer de 250 ml.
- Ajouter 70 ml de tampon d'électrophorèse (TBE 1x).
- Faire bouillir (four à micro-ondes, plaque chauffante ou bec bunsen).
- Laisser refroidir le liquide (à environ 60°C).
- Mettez des gants de protection
- Ajouter 7 µl de SYBR-safe (intercalant qui permettra de visualiser l'ADN) et mélanger en agitant l'Erlenmeyer.
- Verser l'agarose dans la cuve préparée avec un peigne pour former les puits (attention si l'agarose est trop chaud la cuve d'électrophorèse se déforme!). Vérifier qu'il n'y a pas de bulles dans le gel, les enlever le cas échéant.
- Lorsque le gel est refroidi et solidifié, découper une petite lamelle d'agarose en haut et en bas du gel pour libérer les électrodes et ajouter du tampon d'électrophorèse (TBE 1x) dans la cuve (environ 150ml, de manière à bien recouvrir le gel).
- Mettre des gants et enlever délicatement le peigne.

3) Migration des échantillons sur gel d'agarose

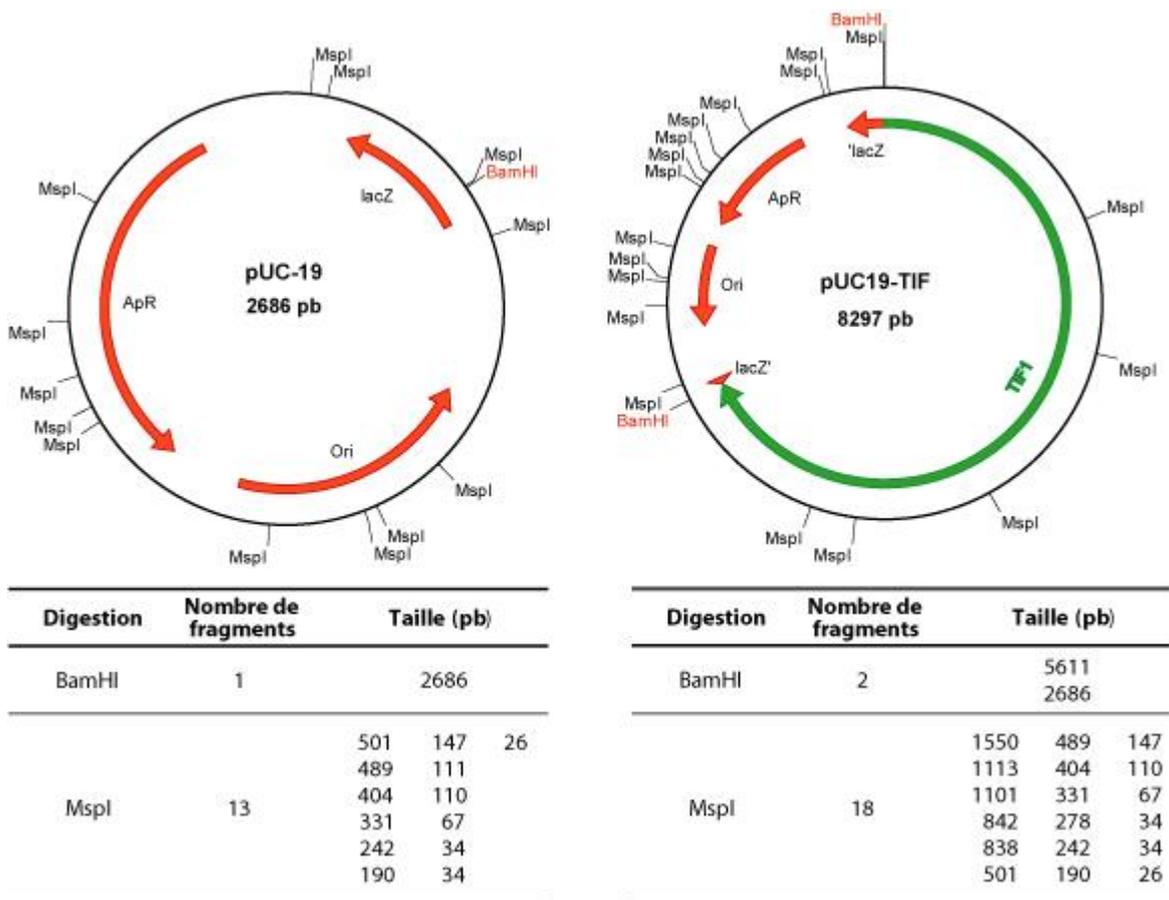
- Récupérer vos tubes Eppendorf
- Ajouter 3 µl de tampon de charge (bleu). Cette solution dense permet de bien déposer les échantillons dans les puits du gel d'agarose. Elle contient un colorant bleu afin de suivre la migration des échantillons pendant l'électrophorèse
- Charger le gel en mettant 5 µl de marqueur dans le premier puits et les 17 µl des digestions dans les puits suivants.
- Allumer le transformateur. Les molécules d'ADN sont chargées négativement par les groupements phosphate... (!! attention à la polarité: migration du **noir** vers le **rouge** !!)
- Faire migrer à 100V.
- Quand le bleu de migration arrive à environ 1 cm du bas du gel, arrêter le transformateur.
- Mettre des gants et prendre le gel. Déposez-le sur la lampe bleue et mettez le filtre orange dessus afin

de visualiser les fragments d'ADN.

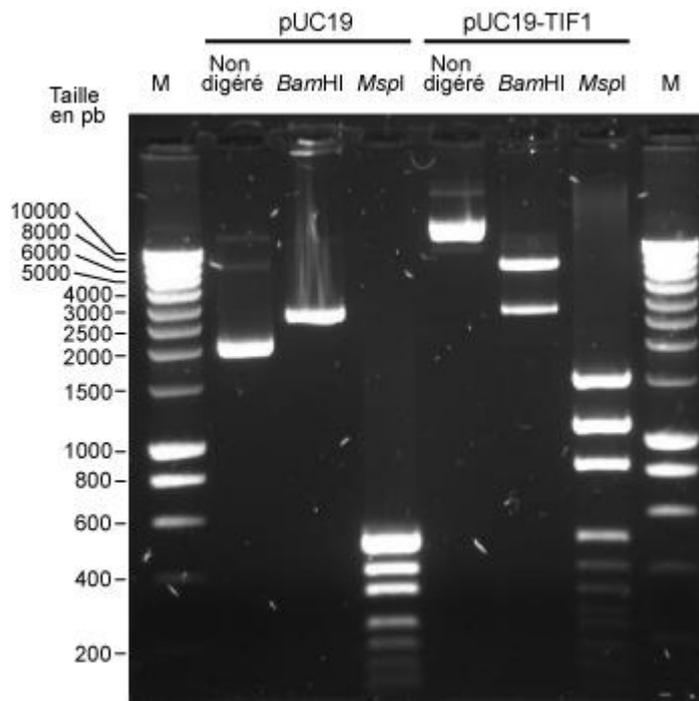
- Prendre une photo.

4) Analyse des résultats

- Observer les cartes de restriction.
- Observer les fragments que vous avez obtenus. Repérez-les sur la carte de restriction. Certains ont des tailles trop proches pour être séparés sur gel d'agarose. Les fragments trop petits ne sont pas visibles sur ce gel à 1.5% d'agarose.
- Les plasmides non digérés ont des formes particulières qui ne migrent pas à la taille de l'ADN linéaire.



Cartes de restriction des plasmides pUC19 et pUC19-TIF1 (pour les sites *MspI* et *BamHI*). Le nombre et la taille des fragments obtenus après digestions avec ces enzymes de restrictions sont indiqués dans les tableaux. Dans le plasmide pUC19-TIF1, un fragment *BamHI* contenant le gène TIF1 de levure a été inséré dans le site *BamHI* du plasmide pUC19. (ApR : gène de résistance à l'antibiotique ampicilline; Ori: origine de réplcation du plasmide; lacZ : partie alpha du gène bactérien *lacZ*, codant pour la β -galactosidase. La fonction du gène lacZ est expliquée dans l'expérience 3; Dans le plasmide pUC19-TIF, le fragment de levure (TIF) est inséré dans le gène de lacZ, c'est pourquoi ce dernier est séparé en deux parties (lacZ' et 'lacZ). Ce gène n'est donc plus fonctionnel dans le plasmide pUC19-TIF1.



Exemple de résultat obtenu: M : marqueur de taille. Les plasmides pUC19 et pUC19- TIF1, digérés ou non avec les enzymes de restrictions *Bam*HI ou *Msp*I ont été séparé sur gel d'agarose. Noter que les plasmides non digérés ont des formes particulières qui ne migrent pas à la taille de l'ADN linéaire.