

Fiche astuce : Vecteurs & Plasmides

1. Rappel de cours :

Le **génie génétique** a pour but de modifier l'ADN d'un hôte en supprimant, améliorant ou rajoutant une information génétique sous la forme d'un **ADN recombinant**, que l'on pourra ensuite intégrer dans un autre organisme par l'intermédiaire d'un vecteur. Il existe différents types de vecteurs. On parlera ici du principal vecteur qui vous intéresse : les plasmides.

Pour cela, on extrait, d'un **organisme donneur** (à partir d'un chromosome ou encore d'un plasmide), les éléments sélectionnés (promoteur + séquence codante + terminateur) pour obtenir une cassette d'expression, puis on l'insère dans un **vecteur** (souvent un **plasmide**), capable de se répliquer de manière autonome grâce à son origine de réplication ORI. En absence de la séquence ORI, le plasmide ne pourra pas se répliquer et sera perdu au fil des divisions cellulaires.

Organisme donneur + Vecteur → Insertion dans le vecteur → ADN recombinant



Cassette d'expression :

Promoteur : Portion d'ADN procaryote ou eucaryote qui permet la fixation de l'ARN polymérase dans le but d'initier la transcription.

Séquence codante : ADN codant (génomique ou ADNc) qui correspond à la séquence que l'on souhaite exprimer.

Terminateur : Portion d'ADN marquant la fin de la transcription. C'est le lieu de décrochage de l'ARN polymérase.

Plasmide (Vecteur d'expression) :

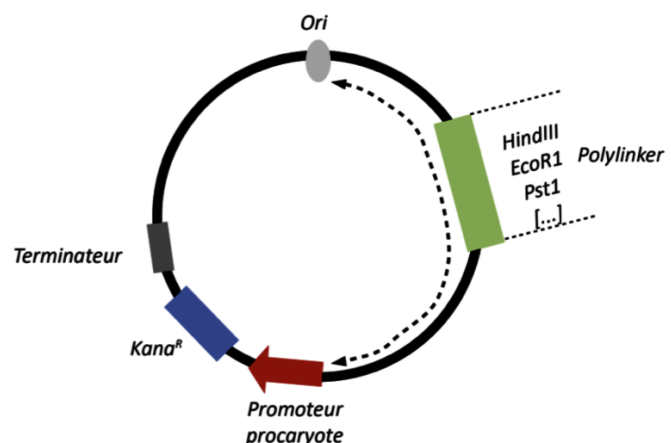
Ori : Origine de réplication procaryote.

Polylinker (ou MCS) : Site Multiple de Clonage contenant de nombreux sites de clivage pour des enzymes de restriction.

Kana^R : ADNc codant pour le gène de résistance à la kanamycine.

Clonage non orienté : Utilisation d'une seule et même enzyme de restriction (ou de deux enzymes de restriction complémentaires) pour digérer le plasmide contenant la séquence d'intérêt et pour ouvrir le plasmide vecteur. La séquence va alors s'orienter dans n'importe quel sens : soit le codon initiateur ATG est situé du même côté que le promoteur (la transcription et la traduction seront possibles), soit le codon STOP est situé du même côté que le promoteur (la transcription sera possible mais la **traduction sera impossible**).

Clonage orienté : Utilisation de 2 enzymes de restriction différentes et non complémentaires pour digérer le plasmide contenant la séquence d'intérêt et pour ouvrir le plasmide vecteur. La séquence va alors s'orienter dans un **unique sens** lors de l'intégration, puisque l'extrémité de la séquence clivée par l'enzyme 1 va s'intégrer dans le plasmide au niveau de la coupure effectuée par l'enzyme 1. Parallèlement,



l'extrémité de la séquence clivée par l'enzyme 2 va s'intégrer dans le plasmide au niveau de la coupure effectuée par l'enzyme.

Le séquençage selon Sanger :

But : connaître la séquence de nucléotides d'un brin d'ADN.

Les acteurs de la synthèse d'ADN :

- ADN à séquencer, on appelle brin matrice le brin qu'on séquence
- Une ADN polymérase, soit une enzyme qui synthétise le brin complémentaire au brin matrice en ajoutant des désoxyribonucléotides
- Des amorces
- Des dNTP
- Des **didésoxyribonucléotides (ddNTP)** : nucléotides qui inhibent définitivement la synthèse de l'ADN lorsqu'ils sont incorporés par l'ADN polymérase
- Sel et eau

On utilise 4 tubes différents, chacun possédant un seul type de ddNTP. L'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire et incorpore **aléatoirement soit un dNTP, soit un ddNTP**. Lorsqu'un ddNTP est incorporé, la synthèse s'interrompt prématurément. Statistiquement, on utilise assez de ddNTP pour obtenir des **fragments de toutes les tailles possibles**, donc pour arrêter la synthèse à chaque nucléotide.

Par exemple, si la synthèse d'un gène s'arrête par l'incorporation d'un ddCTP, cela signifie que l'ADN polymérase l'a ajouté par complémentarité à une guanine sur le brin matrice. En connaissant la taille du fragment libéré, on peut connaître la position de cette guanine sur notre ADN.

Pour connaître la taille de nos fragments, on fait une électrophorèse. On obtient 4 pistes (chacune correspondant à un tube et donc à un ddNTP) montrant la succession des nucléotides. On peut alors lire la **séquence du brin complémentaire**. Les plus petits fragments migrent le plus loin, donc la **lecture se fait de bas en haut** d'une électrophorèse.

Transgénèse par recombinaison :

But : induire une **mutation permanente et héréditaire** dans une séquence d'ADN.

On utilise souvent le **système CRISPR/Cas9** :

Cas9 est une **endonucléase** capable de **couper de l'ADN double brin** au niveau de CRISPR. Les **CRISPR** sont des **séquences d'ADN palindromiques répétées**. Grâce à un **ARN guide**, on choisit l'endroit où on coupe l'ADN. On peut donc induire des modifications du gène où on le souhaite, à la seule condition qu'une **séquence PAM** doit se trouver à proximité.

Suite à cette coupure par Cas9, la séquence d'ADN est réparée par la cellule. Puisque l'ADN a été coupé au niveau de ses 2 brins, la réparation ne sera pas fidèle à ce qui existait auparavant. On a donc une **réparation infidèle**, et une **invalidation du gène** au niveau de la séquence d'intérêt.

Grâce à cette technique, on peut créer des modèles KO pour un gène, soit des modèles où le gène ne s'exprime pas. Utile pour comprendre le rôle d'un gène !

2. Méthodologie QCMs :

Comment calculer la taille d'un plasmide recombinant ?

Etape 1 : Trouver la taille du plasmide receveur

Celle-ci est souvent donnée dans l'énoncé.

Etape 2 : Regarder la position des sites de restriction sur les plasmides receveur et donneur

On regarde où sont situés nos sites de restriction sur le plasmide receveur et sur le plasmide donneur puis on imagine qu'on coupe à ce niveau.

Etape 3 : Calculer la taille du / des fragment(s) libéré(s)

Pour calculer la "distance" en paire de bases entre 2 sites de restriction, on regarde la position des enzymes au niveau du plasmide, et on fait une soustraction (plus grande position - plus petite position).

Etape 4 : Insérer le fragment d'intérêt dans le plasmide receveur

- On ajoute notre fragment d'intérêt dans le plasmide receveur. Donc on additionne la taille de notre fragment à la taille initiale du plasmide receveur.
- Dans le cas d'un clonage orienté, on doit aussi très souvent enlever un fragment du plasmide receveur, qui est coupé par les enzymes de restriction.

Donc on soustrait la taille du fragment libéré par le plasmide receveur à la taille initiale du plasmide receveur.

Voici donc le calcul qu'on doit faire pour obtenir la taille d'un plasmide recombinant :

Taille du plasmide recombinant = Taille du plasmide receveur initial + Taille du fragment d'intérêt - Taille du fragment libéré par le plasmide receveur.

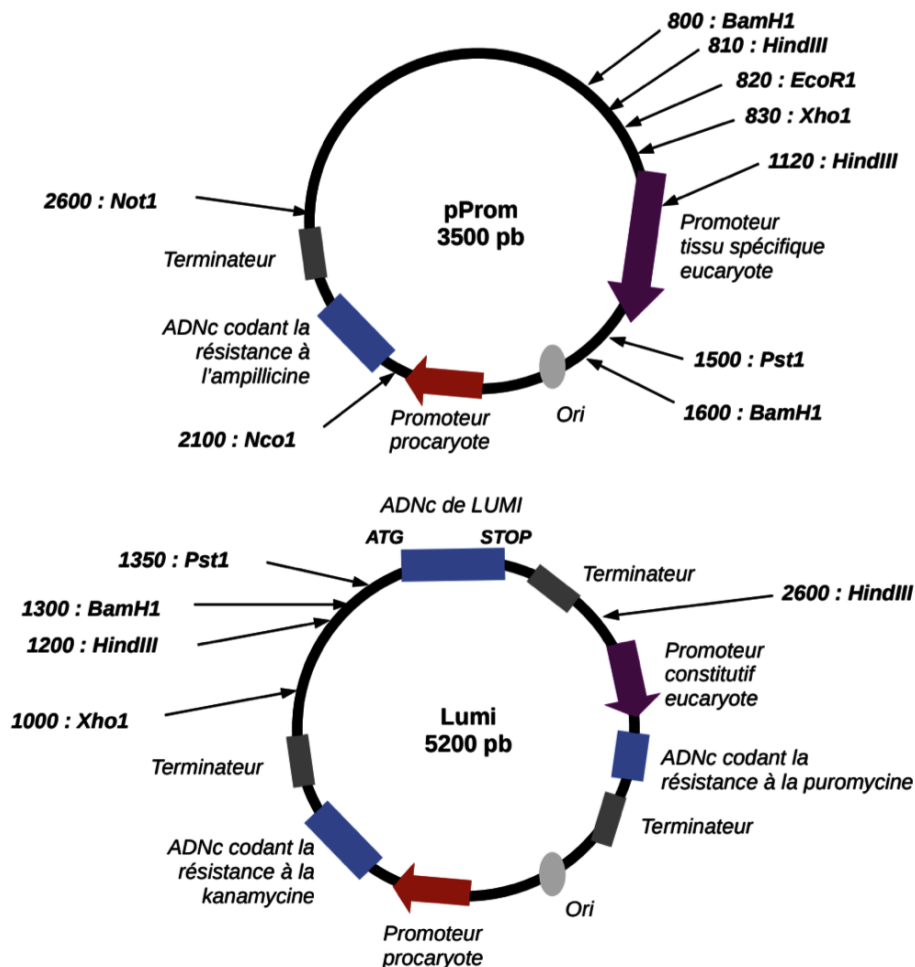
Explications pour résoudre un QCM type concours :

Voici 3 QCMs inédits, avec leur correction très détaillée, afin de vous préparer au mieux à la mécanique des QCMs type examen classant. Ils sont organisés de manière à ce que vous puissiez les faire sans la correction sous les yeux.

Les QCMs 1 à 3 sont liés.

QCM 1 - Afin de mieux repérer les moustiques dans le noir, la célèbre chercheuse Mme. SR veut modifier génétiquement les cellules de la peau de l'abdomen du moustique pour leur faire exprimer le gène LUMI sous la dépendance d'un promoteur spécifique des cellules progénitrices de la peau de l'abdomen. Ce gène permet aux cellules qui l'expriment de produire une protéine qui brille lorsqu'elle se retrouve dans l'obscurité.

Pour cela, elle a choisi de digérer le plasmide pProm, contenant le promoteur spécifique, avec l'enzyme BamH1. Elle ouvre ensuite le plasmide Lumi avec la même enzyme. Puis, elle utilise la ligase pour insérer le promoteur dans le vecteur Lumi.

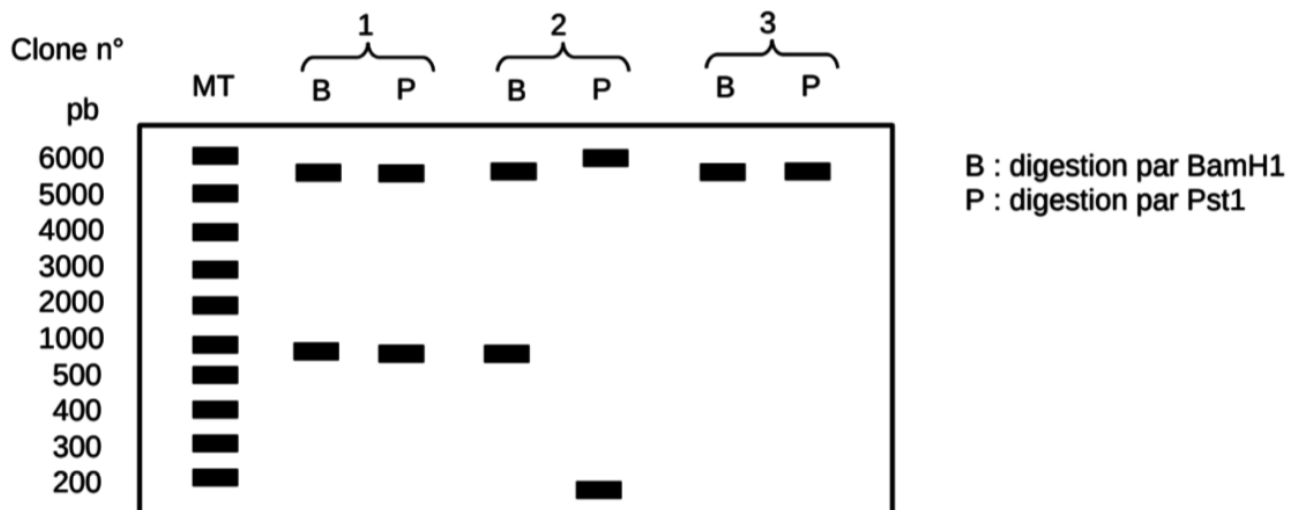


- A. La chercheuse a réalisé un clonage non orienté.
- B. La chercheuse aurait pu utiliser les enzymes EcoR1 et Pst1 pour réaliser le clonage.
- C. Le plasmide recombinant obtenu coupé par Pst1 libère un unique fragment de 6000 paires de bases (pb).
- D. Le plasmide recombinant obtenu coupé par HindIII libère 4 fragments de taille 110, 310, 980 et 4600 paires de bases (pb).
- E. Le plasmide recombinant obtenu confère une résistance à l'ampicilline aux bactéries transformées.

QCM 2 - A propos de cette expérience de clonage :

- A. Quel que soit le sens d'insertion du promoteur dans le plasmide pLumi, il peut y avoir transcription de l'ADNc de LUMI.
- B. L'utilisation de HindIII permet d'évaluer le sens d'insertion du promoteur tissu spécifique eucaryote dans le plasmide pLumi.
- C. L'utilisation de la puromycine permet de garder uniquement les bactéries transformées par le plasmide pLumi.
- D. L'utilisation de Not1 permet d'évaluer la taille du plasmide.
- E. L'utilisation de BamH1 permet d'identifier les plasmides contenant le promoteur tissu spécifique eucaryote.

QCM 3 - Mme. SR obtient des clones bactériens après transformation et sélection. Afin de vérifier si les clones correspondent bien à des bactéries transformées, la chercheuse demande à son équipe d'extraire l'ADN plasmidique des bactéries. Cet ADN est digéré par différentes enzymes de restriction. On analyse ensuite les fragments obtenus sur un gel d'électrophorèse (*cf ci-dessous*) comprenant une piste avec un marqueur de taille (MT). Après analyse du gel, l'équipe identifie le plasmide recombinant contenant le promoteur tissu spécifique eucaryote bien intégré. On reprend le clone correspondant afin d'amplifier le plasmide recombinant, que l'on va ensuite purifier. On transfecte ensuite ce plasmide dans plusieurs moustiques.



- A. Le plasmide extrait du clone 2 contient le promoteur tissu spécifique eucaryote intégré dans le bon sens.
- B. Le plasmide extrait du clone 1 contient le promoteur tissu spécifique eucaryote intégré dans le bon sens.
- C. Si un groupe de moustiques est en contact avec de la puromycine, seuls les moustiques transfectés avec le plasmide pLumi survivraient.
- D. La totalité du corps des moustiques transfectés brille dans l'obscurité.
- E. Les moustiques transfectés seront résistants à la kanamycine.

CORRECTION :

QCM 1 - A

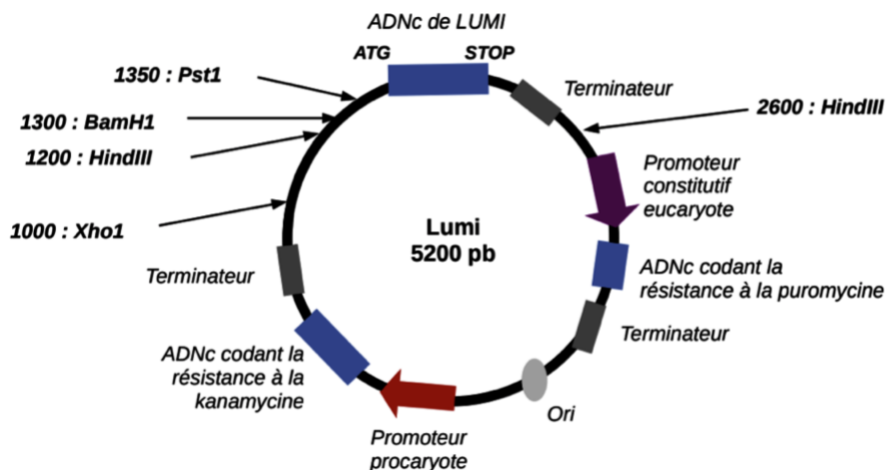
A. La chercheuse a réalisé un clonage non orienté. VRAI

Mme SR utilise uniquement l'enzyme BamH1, donc lors de l'intégration du promoteur, celui-ci va pouvoir s'orienter dans n'importe quel sens. C'est un clonage non orienté.

Suite au clivage de pProm par BamH1, on obtient un fragment contenant le promoteur d'intérêt de 800 pb ($1600 - 800 = 800$). Le plasmide Lumi faisant à l'origine 5200 pb, suite à l'intégration du promoteur, on obtient un plasmide recombinant qui aura une taille de 6000 pb ($5200 + 800$).

Voici les différents plasmides recombinants que l'on peut obtenir suite à ce clonage :

-> Promoteur non intégré



→ Promoteur intégré dans le bon sens

<https://zupimages.net/viewer.php?id=23/03/hjq8.jpeg> = pLUMI(1)

→ Promoteur intégré dans le mauvais sens

<https://zupimages.net/viewer.php?id=23/03/hjq8.jpeg> = pLUMI(2)

B. La chercheuse aurait pu utiliser les enzymes EcoR1 et Pst1 pour réaliser le clonage. FAUX

Elle n'aurait pas pu utiliser EcoR1, car il n'y a pas de site de clivage pour EcoR1 dans le plasmide pLumi. Cependant, elle aurait pu effectuer un clonage orienté en utilisant les enzymes Xho1 et Pst1, qui possèdent des sites de clivage encadrant le promoteur dans le plasmide pProm, et ils possèdent également des sites de clivage dans le plasmide Lumi. Dans ce cas-là, on obtiendrait un promoteur forcément bien orienté et un plasmide pLumi de 5520 pb ($5200 - 350 + 670$).

C. Le plasmide recombinant obtenu coupé par Pst1 libère un unique fragment de 6000 paires de bases (pb). FAUX

Si le promoteur n'est pas intégré, on obtiendra 1 fragment de 5200 pb.

Si le promoteur est intégré dans le bon sens, on obtiendra 2 fragments de 150 et 5850 pb.

Si le promoteur est intégré dans le mauvais sens, on obtiendra 2 fragments de 750 et 5250 pb.

Correction un peu plus détaillée :

Alors déjà dans un premier temps je te conseille de dessiner le (ou les) plasmide(s) recombinant(s) que tu obtiens à la fin. Ici on coupe les vecteurs (étape de digestion) par une seule enzyme de restriction qui est BamH1. On réalise donc un clonage non orienté.

Voici les deux plasmides qu'on obtient après insertion de la séquence de pPROM dans pLUMI :

<https://zupimages.net/viewer.php?id=23/03/hjq8.jpeg>

Maintenant on va faire différents calculs avant de répondre à la question posée :

Taille de l'insert = distance entre BamH1 et BamH1 = $1600 - 800 = 800$ pb

Taille du plasmide recombinant = $5200 + 800 = 6000$ pb

Maintenant on calcule la nouvelle position des différents sites de restriction pour les enzymes de restriction dans pLUMI (1) :

- Distance entre **HindIII et BamH1 (1)** dans pPROM = $810 - 800 = 10$ pb

=> on ajoutera + 10 pb à la position de BamH1 (1) dans pLUMI recombinant

- Distance entre **EcoR1 et BamH1 (1)** dans pPROM = $820 - 800 = 20$ pb

=> on ajoutera + 20 pb à la position de BamH1 (1) dans pLUMI recombinant

- Distance entre **Xho1 et BamH1 (1)** dans pPROM = $830 - 800 = 30$ pb

=> on ajoutera + 30 pb à la position de BamH1 (1) dans pLUMI recombinant

- Distance entre **HindIII et BamH1 (1)** dans pPROM = $1120 - 800 = 320$ pb

=> on ajoutera + 320 pb à la position de BamH1 (1) dans pLUMI recombinant

- Distance entre **Pst1 et BamH1 (1)** dans pPROM = $1500 - 800 = 700$ pb

=> on ajoutera + 700 pb à la position de BamH1 (1) dans pLUMI recombinant

- Distance entre **BamH1 (2) et BamH1 (1)** dans pPROM = taille de l'insert = **800 pb**

Ceci étant fait, on calcule donc les nouvelles positions : BamH1 est situé à 1300 pb dans pLUMI donc :

Nouvelle position de **HindIII** = $1300 + 10 = 1310$ pb

Nouvelle position de **EcoR1** = $1300 + 20 = 1320$ pb

Nouvelle position de **Xho** = $1300 + 30 = 1330$ pb

Nouvelle position de **HindIII** = $1300 + 320 = 1620$ pb

Nouvelle position de **Pst1** = $1300 + 700 = 2000$ pb

Nouvelle position de **BamH1 (2)** = $1300 + 800 = 2100$ pb

Maintenant on fait pareil pour les autres sites de restriction qui étaient déjà présents sur pLUMI non recombinant

- Distance entre **Pst1 et BamH1 (2)** dans pLUMI = $1350 - 1300 = 50$ pb

=> on ajoutera + 50 pb à la position de BamH1 (2) dans pLUMI recombinant pour avoir la nouvelle position de Pst1.

- Distance entre **HindIII et BamH1 (2)** dans pLUMI = $2600 - 1300 = 1300$ pb

=> on ajoutera + 1300 pb à la position de BamH1 (2) dans pLUMI recombinant pour avoir la nouvelle position de HindIII.

Donc on obtient :

Nouvelle position de **Pst1** = $2100 + 50 = 2150$ pb

Nouvelle position de **HindIII** = $2100 + 1300 = 3400$ pb

Maintenant qu'on a toutes les positions des sites de restriction sur le plasmide recombinant (la position de HindIII à 1200 pb et de Xho1 à 1000 pb ne changeant pas puisque l'insert se fait après), on va pouvoir calculer les tailles des fragments qu'on obtient après digestion par Pst1 comme on te le demande dans l'item C

1er fragment : Distance entre Pst1 (1) et Pst1 (2) = $2150 - 2000 = 150$ pb

2e fragment : Distance entre Pst1 (2) et Pst1 (1) dans l'autre sens = $6000 - 150 = 5850$ pb

Maintenant on calcule la nouvelle position des différents sites de restriction pour les enzymes de restriction dans pLUMI (2):

- Distance entre **HindIII et BamH1 (2)** dans pPROM = $1600 - 810 = 790 \text{ pb}$
=> on ajoutera + 10 pb à la position de BamH1 (2) dans pLUMI recombinant
- Distance entre **EcoR1 et BamH1 (2)** dans pPROM = $1600 - 820 = 780 \text{ pb}$
=> on ajoutera + 20 pb à la position de BamH1 (2) dans pLUMI recombinant
- Distance entre **Xho1 et BamH1 (2)** dans pPROM = $1600 - 830 = 770 \text{ pb}$
=> on ajoutera + 30 pb à la position de BamH1 (2) dans pLUMI recombinant
- Distance entre **HindIII et BamH1 (2)** dans pPROM = $1600 - 1120 = 480 \text{ pb}$
=> on ajoutera + 480 pb à la position de BamH1 (2) dans pLUMI recombinant
- Distance entre **Pst1 et BamH1 (2)** dans pPROM = $1600 - 1500 = 100 \text{ pb}$
=> on ajoutera + 100 pb à la position de BamH1 (2) dans pLUMI recombinant
- Distance entre **BamH1 (2) et BamH1 (1)** dans pPROM = taille de l'insert = **800 pb**
(en gros c'est exactement les mêmes calculs que dans la partie précédente mais à l'envers)

Ceci étant fait, on calcule donc les nouvelles positions : BamH1 (2) est situé à 1300 pb dans pLUMI donc :

Nouvelle position de **HindIII** = $1300 + 790 = 2090 \text{ pb}$
 Nouvelle position de **EcoR1** = $1300 + 780 = 2080 \text{ pb}$
 Nouvelle position de **Xho** = $1300 + 770 = 2070 \text{ pb}$
 Nouvelle position de **HindIII** = $1300 + 480 = 1780 \text{ pb}$
 Nouvelle position de **Pst1** = $1300 + 100 = 1400 \text{ pb}$
 Nouvelle position de **BamH1 (1)** = $1300 + 800 = 2100 \text{ pb}$

Maintenant on fait pareil pour les autres sites de restriction qui étaient déjà présents sur pLUMI non recombinant

- Distance entre **Pst1 et BamH1 (2)** dans pLUMI = $1350 - 1300 = 50 \text{ pb}$
=> on ajoutera + 50 pb à la position de BamH1 (2) dans pLUMI recombinant pour avoir la nouvelle position de Pst1.
- Distance entre **HindIII et BamH1 (2)** dans pLUMI = $2600 - 1300 = 1300 \text{ pb}$
=> on ajoutera + 1300 pb à la position de BamH1 (2) dans pLUMI recombinant pour avoir la nouvelle position de HindIII.

Donc on obtient :

Nouvelle position de **Pst1** = $2100 + 50 = 2150 \text{ pb}$
 Nouvelle position de **HindIII** = $2100 + 1300 = 3400 \text{ pb}$
 (donc ça c'est exactement les mêmes calculs que pour la première partie)

Maintenant qu'on a toutes les positions des sites de restriction sur le plasmide recombinant (la position de HindIII à 1200 pb et de Xho1 à 1000 pb ne changeant pas puisque l'insert se fait après), on va pouvoir calculer les tailles des fragments qu'on obtient après digestion par Pst1 comme on te le demande dans l'item C

1er fragment : Distance entre Pst1 (1) et Pst1 (2) = $2150 - 1400 = 750 \text{ pb}$

2e fragment : Distance entre Pst1 (2) et Pst1 (1) dans l'autre sens = $6000 - 750 = 5250 \text{ pb}$

Donc peu importe qu'on parle du pLUMI (1) ou du pLUMI (2), on aura 2 fragments et non pas un seul -> item C faux

D. Le plasmide recombinant obtenu coupé par HindIII libère 4 fragments de taille 110, 310, 980 et 4600 pb. FAUX

Suite de la C correction plus détaillée :

On a à présent fait le plus gros du travail en trouvant la position des sites de restriction pour toutes les enzymes. Donc pour l'item D on va aller beaucoup plus vite

Si on coupe pLUMI (1) par HindIII :

1er fragment : Distance entre HindIII (1) et HindIII (2) = $1310 - 1200 = 110$ pb

2e fragment : Distance entre HindIII (2) et HindIII (3) = $1620 - 1310 = 310$ pb

3e fragment : Distance entre HindIII (3) et HindIII (4) = $3400 - 1620 = 1780$ pb

4e fragment : Distance entre HindIII (4) et HindIII (1) = $6000 - (1er + 2e + 3e \text{ fragment}) = 6000 - (110 + 310 + 1780) = 6000 - 2200 = 3800$ pb

Si on coupe pLUMI (2) par HindIII :

1er fragment : Distance entre HindIII (1) et HindIII (2) = $1780 - 1200 = 580$ pb

2e fragment : Distance entre HindIII (2) et HindIII (3) = $2090 - 1780 = 310$ pb

3e fragment : Distance entre HindIII (3) et HindIII (4) = $3400 - 2090 = 1310$ pb

4e fragment : Distance entre HindIII (4) et HindIII (1) = $6000 - (1er + 2e + 3e \text{ fragment}) = 6000 - (580 + 310 + 1310) = 6000 - 2200 = 3800$ pb

→ Du coup l'item D est également faux

E. Le plasmide recombinant obtenu confère une résistance à l'ampicilline aux bactéries transformées. FAUX

Le plasmide Lumi contient 2 ADNc codants des gènes de résistance à des antibiotiques, respectivement pour la kanamycine et la puromycine. De plus, l'ADNc codant la résistance à la puromycine est dépendant d'un promoteur eucaryote, donc le plasmide recombinant confèrera seulement une résistance à la kanamycine aux bactéries transformées.

QCM 2 : BE

A. Quelque soit le sens d'insertion du promoteur dans le plasmide Lumi, il peut y avoir transcription de l'ADNc de LUMI. FAUX

Si le promoteur est intégré dans le mauvais sens, alors la transcription va débuter et se diriger vers le Terminateur situé après l'ADNc codant la résistance à la kanamycine.

B. L'utilisation de HindIII permet d'évaluer le sens d'insertion du promoteur tissu spécifique eucaryote dans le plasmide Lumi. VRAI

On a vu dans le QCM 1, dans l'item D, que lorsqu'on utilise HindIII, on obtient des fragments de taille différente selon le sens d'insertion du promoteur.

C. L'utilisation de la puromycine permet de garder uniquement les bactéries transformées par le plasmide Lumi. FAUX

L'ADNc codant la résistance à la puromycine dépend d'un promoteur constitutif **eucaryote**, il ne sera donc pas exprimé chez les bactéries (qui sont procaryotes). Donc, les bactéries transformées ne seront pas résistantes à la puromycine. (Attention il ne faut pas confondre les bactéries transformées (= celles qui ont intégré un plasmide : elles sont transformées par rapport à ce qu'elles avaient au départ) et les bactéries recombinantes (= celles qui ont intégré le plasmide recombinant). Ainsi, les bactéries recombinantes sont nécessairement des bactéries transformées.

D. L'utilisation de Not1 permet d'évaluer la taille du plasmide recombinant. FAUX

Le plasmide recombinant Lumi ne possède pas de site de clivage pour Not1, donc en présence de Not1, aucun fragment (linéaire) ne sera libéré et la taille ne pourra pas être évaluée.

Rappel : il faut être en présence d'un fragment linéaire pour évaluer sa taille, en fonction d'un marqueur de taille, sur un gel d'électrophorèse.

E. L'utilisation de BamH1 permet d'identifier les plasmides contenant le promoteur tissu spécifique eucaryote. VRAI

Si on utilise BamH1 :

- Libération d'un unique fragment de 5200pb, si non intégration du promoteur
- Libération de 2 fragments (800 et 5200 pb) si intégration du promoteur, peu importe son sens d'insertion.

Le nombre de fragments différant s'il y a intégration ou non du promoteur, alors on peut affirmer que l'utilisation de BamH1 permet d'identifier les plasmides qui contiennent le promoteur tissu spécifique eucaryote.

QCM 3 : AC

A. Le plasmide extrait du clone n°2 contient le promoteur tissu spécifique eucaryote intégré dans le bon sens. VRAI

Si intégration du promoteur tissu spécifique eucaryote dans le bon sens :

→ **BamH1** : libération de 2 fragments (800 et 5200 pb)

→ **Pst1** : libération de 2 fragments (150 et 5850 pb)

Si intégration du promoteur tissu spécifique eucaryote dans le mauvais sens :

→ **BamH1** : libération de 2 fragments (800 et 5200 pb)

→ **Pst1** : libération de 2 fragments (750 et 5250 pb)

Si non intégration du promoteur tissu spécifique eucaryote :

→ **BamH1** : libération de 1 fragment (5200 pb)

→ **Pst1** : libération de 1 fragment (5200 pb)

Donc : Clone n°1 = intégration de l'insert avec le promoteur dans le mauvais sens

Clone n°2 = intégration de l'insert avec le promoteur dans le bon sens

Clone n°3 = non intégration de l'insert

B. Le plasmide extrait du clone n°1 contient le promoteur tissu spécifique eucaryote intégré dans le bon sens. FAUX

Cf item A

C. Si un groupe de moustiques entre en contact avec de la puromycine, seuls les moustiques transfectés avec le plasmide Lumi survivrait. VRAI

L'ADNc codant la résistance à la puromycine dépend d'un promoteur constitutif **eucaryote**, donc il sera exprimé chez les moustiques transfectés, donc ils seront résistants à la puromycine. Au contraire, l'ADNc codant la résistance à la kanamycine dépend d'un promoteur **procaryote**, donc il ne sera PAS exprimé chez les moustiques transfectés, donc ils seront sensibles à la kanamycine.

D. La totalité du corps des moustiques transfectés brille dans l'obscurité. FAUX

Le promoteur choisi est un promoteur **tissu spécifique** eucaryote, plus précisément spécifique des cellules progénitrices de la peau de l'abdomen. Donc, seul l'abdomen brillera dans l'obscurité.

E. Les moustiques transfectés seront résistants à la kanamycine. FAUX

Cf item C