

## Correction du DM n° 8 – Techniques de clonage

<b>1/</b>	AB	<b>2/</b>	AD	<b>3/</b>	BC	<b>4/</b>	ABC	<b>5/</b>	BC
<b>6/</b>	ABCD	<b>7/</b>	ABD	<b>8/</b>	AC	<b>9/</b>	ABCD	<b>10/</b>	AD

### QCM 1 : AB

- A) VRAI : les **mêmes enzymes de restriction** doivent digérer le vecteur et l'insert. L'idée est d'avoir une **correspondance** entre les extrémités de l'insert et du vecteur pour **faciliter l'insertion** !
- B) VRAI : les **vecteurs plasmidiques** peuvent contenir un insert de **maximum 20 kb** (kilo bases), mais si on veut insérer des fragments d'ADN **plus grands** on devra plutôt utiliser des vecteurs isolés à partir de levures.
- C) FAUX : il y a une étape de ligation entre l'insert et le vecteur, c'est-à-dire la formation de liaisons de type **phosphoester** entre les deux par la T4 DNA ligase
- D) FAUX : on parle d'**ADN recombinant**, un ADN complémentaire (noté **ADNc**) correspond à un ADN simple brin issu de la transcription inverse d'un ARNm et n'a donc rien à voir !
- E) FAUX.

### QCM 2 : AD

- A) VRAI : la présence de l'insert au niveau du site polylinker **inactive** le gène codant la **bêta-galactosidase**. Les bactéries ne **peuvent plus hydrolyser le X-Gal** qui reste **incolore** et **les colonies restent blanches** !
- B) FAUX.
- C) FAUX.
- D) VRAI : l'absence de l'insert au niveau du site polylinker **n'inactive pas** le gène codant la **bêta-galactosidase**. Les bactéries **hydrolysent le X-Gal** qui prend une **coloration bleue** et **les colonies deviennent bleues** !
- E) FAUX.

### QCM 3 : BC

- A) FAUX : les vecteurs de clonage contrairement aux vecteurs d'expression ne sont introduits que dans les cellules procaryotes, il nous faut donc un gène de sélection **procaryote**. Si on avait parlé dans l'énoncé de vecteur d'expression les réponses justes auraient été A, B, C et D.
- B) VRAI.
- C) VRAI.
- D) FAUX : il ne faut un **promoteur eucaryote** que pour les **vecteurs d'expression** !
- E) FAUX.

### QCM 4 : ABC

- A) VRAI.
- B) VRAI.
- C) VRAI.
- D) FAUX : lorsqu'on a des extrémités **franches**, le vecteur aura tendance à se refermer sur lui-même avant d'avoir intégré l'insert !
- E) FAUX.

### QCM 5 : BC

- A) FAUX : la nucléase utilisée lors de cette étape comme la nucléase S1 possède une activité **5'-3' exonucléasique** lui permettant de grignoter les **extrémités 5'** simple brin sortantes : l'enzyme s'arrête de grignoter les nucléotides dès qu'elle rencontre de l'ADN double brin !
- B) VRAI : cf. B)
- C) VRAI : La polymérase utilisée comme l'enzyme klenow possède une activité **5'-3' polymérase** qui lui permet de combler l'ADN simple brin en synthétisant les brins complémentaires aux **extrémités 5' sortantes en présence de dNTP** !
- D) FAUX : cf. C)
- E) FAUX.

### QCM 6 : ABCD

- A) VRAI : la multiplication se fait d'abord dans une **bactérie** (mais l'expression se fera dans une cellule eucaryote), d'où la nécessité d'avoir des **éléments procaryotes** sur un **vecteur d'expression** !
- B) VRAI.
- C) VRAI.
- D) VRAI.
- E) FAUX.

### QCM 7 : ABD

- A) VRAI : cet exemple du cours est important à connaître ! L'ADN est mélangé avec une **solution de chlorure de calcium**, puis on ajoute un **tampon phosphate** goutte à goutte pour former un **précipité** de phosphate de calcium autour de l'ADN formant des « cristaux ». Ces cristaux de phosphate de calcium contenant l'ADN vont ensuite pénétrer dans les cellules en culture par **endocytose** ou **phagocytose**.
- B) VRAI : une autre **méthode physique de transfection** est la **micro-injection** dans une cellule.
- C) FAUX : on peut effectivement utiliser des liposomes mais c'est une méthode de transfection **chimique** comme le **phosphate de calcium** ou le **DEAE Dextran**.
- D) VRAI.
- E) FAUX.

### QCM 8 : AC

- A) VRAI : on parle d'ailleurs de **transfection**.
- B) FAUX : les cellules sont **fixées** et **perméabilisées**, elles sont donc **mortes** !
- C) FAUX : cette méthode de visualisation est **directe** et non pas indirecte comme l'immunofluorescence, car la **protéine** est rendue **directement fluorescence grâce au peptide** ! Dans le cas de l'immunofluorescence c'est un anticorps dirigé contre la protéine qui est fluorescent et non pas la protéine en elle-même, d'où le fait que cette méthode de visualisation soit dite indirecte.
- D) VRAI.
- E) FAUX.

### QCM 9 : ABCD

- A) VRAI : on synthétise la protéine d'intérêt directement avec à son extrémité **N-term** ou **C-term** un **petit peptide** ou une **protéine fluorescente**. Grâce à ces étiquettes on va pouvoir voir si le variant a un **impact** sur la protéine et surtout sa **localisation** intracellulaire !
- B) VRAI.
- C) VRAI.
- D) VRAI.
- E) FAUX.

### QCM 10 : AD

- A) VRAI : il faut **enlever le codon Stop** de l'ARNm pour que la traduction puisse se faire jusqu'au **codon Stop de l'étiquette**.
- B) FAUX : il faut **enlever le codon Start** au niveau de l'ARNm (codon pour la **méthionine**) pour que la traduction démarre au niveau du **codon Start de l'étiquette**.
- C) FAUX.
- D) VRAI.
- E) FAUX.

