Université Larbi Ben M’hidi – Oum El Bouaghi. Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie. Département des S.N.V.

**Corrigé type: Génie génétique App.à la biotech. microbienne:**Master 2 Microbiologie Appliquée.

1. Exonucléases : coupent au extrémités et libèrent par hydrolyse le nucléotide situé à l’extrémité 5’ ou 3’ ; Endonucléases: hydrolysent une liaison ester interne et libèrent différents fragments de taille variable……**2pts**
2. Le fragment de Klenow est dépourvu d'activité exonucléase 5'---3'……….**1pts**
3. Capables de réplication autonome (réplication épisomale) dans une cellule hôte donnée ; Possède un polylinker ou site multiple de clonage ; Petite taille: pour permettre l’insertion d’un fragment d’ADN plus ou moins grand, Présence de gènes de sélection: sélection des cellules hôtes qui ont intégré un vecteur ; Stabilité: maintient sans modification dans la cellule hôte, quel que soit le nombre de division……………..**2.5pts**
4. **Banques génomiques…………………….1.5pts**

L’ADN génomique total d’un organisme sera clivé en fragment dont les tailles et les extrémités seront compatibles avec celles du vecteur utilisé (enzymes de restriction).Les fragments sont insérés individuellement dans un ADN vectoriel, grâce à l’action d’une ligase, qui sera l’ADN recombiné à introduire dans une cellule hôte.

Une banque est complète si collectivement l’ensemble de ces inserts recouvre totalement le génome de l’organisme de départ.

1. Car l’étape de ligature et de transformation sont sévérement limitées, où on peut avoir des : Bactéries non-transformées ; Bactéries transformées avec un plasmide reconstitué ; et **Bactéries transformées avec un plasmide recombiné.**

**Le criblage immunologique** se fait sur le produit du gène (la protéine) si le gène recherché est exprimé dans la cellule recombinée……………………**1.5pts**

1. Si le produit du gène est toxique on utilisera une origine de réplication qui donne peu de copies, au contraire si le gène n’est pas toxique et s’il est bien régulé, on utilisera une origine de fort nombre de copies.

On peut **positionner** l’origine de réplication pour favoriser la production de protéines. Si on veut exprimer un gène non toxique pour la bactérie, l'expression sera simultanée à la croissance de la population bactérienne. Si on veut exprimer un gène toxique pour la bactérie, l'expression s'effectuera en phase stationnaire, lorsqu'il n'y a plus de réplication…………………..**2pts**

1. L’ARN polymérase T7 utilise la plupart des nucléotides triphosphate de la cellule ce qui inhibe la transcription des gènes de l'hôte. Elle est 5 fois plus rapide que les polymérases bactériennes.

L’ARN polymérase T7 est très spécifique, elle reconnait uniquement les promoteurs de T7 et inhibe la transcription de l'hôte (gènes de l'hôte reste silencieux).

L’ARN polymérase T7 est insensible aux inhibiteurs des ARN polymérases bactériennes (rifampicine). ………………………..**1.5pts**

1. SD : Rajouter la séquence en aval du gène à cloné

Codons : utiliser la mutagénèse. ……………………..**2pts**

1. Production à partir des peptides A et B ; Production à partir de la pro-insuline………..**1pts**
2. Afin d’avoir des fragments contenant uniquement les parties codantes sans les introns ; éviter l’insertion de la pré-pro-insuline…………………..**1pts**
3. La trypsine et la carboxypeptidase B : deux protéases qui servent à l'élimination du peptide de connexion (n'ayant aucun effet sur le produit final)……………... **1pts**
4. Les acides aminés impliqués dans la liaison aux récepteurs, donc dans l’activité biologique, doivent être ménagés ; les acides aminés intervenant dans la formation des dimères, puis de l’hexamère, mais situés hors de la zone de liaison des récepteurs, seront modifiés : Plus les hexamères et dimères sont stables, plus la résorption sera lente et par là, l’action biologique prolongée. Ce sont les analogues lents, et si l’insuline reste sous forme monomérique, la diffusion est immédiate. Ce sont les analogues rapides.

Exemples : **asparte** : La proline B28 a été remplacée par l’acide aspartique. Ce changement réduit spontanément l’auto-association en hexamères de l’insuline en solution neutre.

**glargine** : L’addition de 2 charges + (2 arg) sur le C -terminal de la chaîne B. Cette modification augmente le pHi à 6,7 ce qui rend la molécule plus soluble dans un milieu légèrement acide et moins soluble au pH physiologique…………………………….**3pts**

 **Dr Khennouchi N.C.H.**