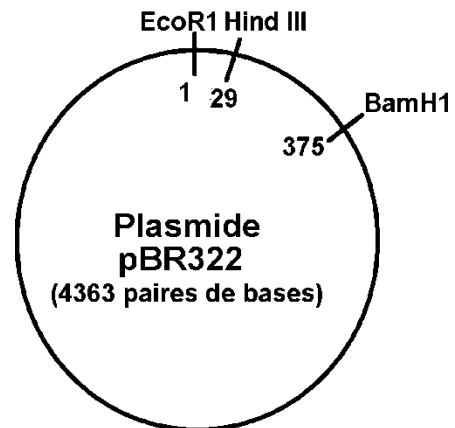


Exercice : Principe d'utilisation des plasmides bactériens de *E. Coli* comme vecteur d'ADN

Le gène *lys A* est impliqué dans la synthèse de la lysine (acide aminé) chez la bactérie *E. Coli*.

L'expérimentateur dispose d'un ADN circulaire (plasmide nommé pBR322) qui confère à cette bactérie une résistance à deux antibiotiques, l'ampicilline et la tétracycline. Ce plasmide servira de vecteur pour le gène *Lys A*. La première étape consistera donc à insérer de façon fiable *Lys A* dans le plasmide vecteur. La figure ci-contre donne la carte de restriction de ce plasmide.



1. Rappeler ce qu'est une endonucléase de restriction

L'expérimentateur ouvre l'ADN bactérien portant *Lys A* par l'endonucléase BamH1. Il procède de même avec son vecteur pBR322. L'ensemble gène *Lys A*/pBR322 est mis en présence d'une ligase.

2. Proposer les différents ADN circulaires possibles obtenus

Afin de vérifier que les plasmides ainsi obtenus contiennent à la fois pBR322 et le gène *Lys A* intégré, l'expérimentateur injecte les plasmides dans des bactéries et les fait se conjuguer avec des bactéries auxotrophes (incapables de se développer sans lysine) pour la lysine [*lys A*]. Les bactéries ainsi transformées sont étalées sur 7 milieux nutritifs afin de les sélectionner ; après incubation, on note la présence ou non de colonies et les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

Milieux	Milieu minimum auquel on ajoute (« + ») :			Lecture des cultures : « + » = colonie présente
	Tétracycline	Ampicilline	Lysine	
1	-	-	-	+
2	+	+	+	+
3	-	+	+	+
4	+	-	+	+
5	+	+	-	
6	-	+	-	+
7	+	-	-	

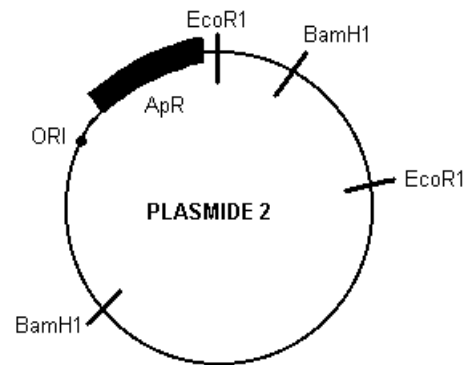
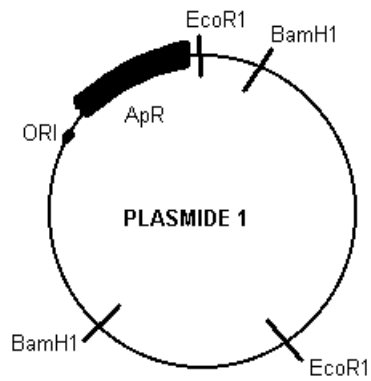
3. Rappeler à l'aide de schémas le principe de la conjugaison bactérienne. Quel est le type de plasmide contenu dans les bactéries sélectionnées par le milieu 2 ?

4. Seul le milieu 5 permettrait de sélectionner sans ambiguïté les bactéries possédant le plasmide recherché : pourquoi ?

5. Seul le milieu 6 semble convenir. Conclusion ? Que peut-on en conclure quant à la position du gène de résistance aux tétracyclines dans l'ADN vecteur ?

On obtient à partir de la sélection avec le milieu 6 le plasmide désiré, mais il y en a en fait deux différents (voir figure ci-dessous, où l'origine de la réplication (Ori) et le gène de la résistance à l'Ampicilline (Ap^R) ont été repérés)

6. Expliquez ces différences, puis, après avoir recopié ces schémas, épaissir avec un crayon de couleur la partie correspondant à l'insertion de l'ADN vecteur Pbr322 des questions précédentes. Avec une autre couleur, localiser le ou les fragments correspondant au gène de résistance à la tétracycline inactivé.



7. Proposez un protocole permettant de différencier ces deux plasmides