

AD n°1 : Découvrir le cycle cellulaire.

1. A partir des informations ci-dessous, construire un schéma représentant le cycle cellulaire.

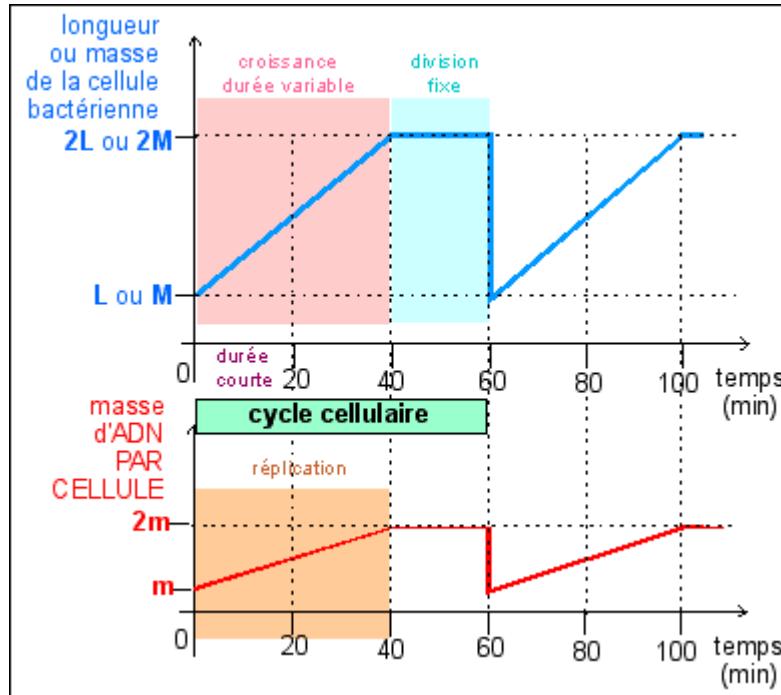
Document 1:

Le cycle cellulaire correspond à l'ensemble des états d'une cellule depuis sa formation (après division d'une cellule-mère) jusqu'à sa division en deux cellules-filles.

Le cycle cellulaire se déroule en deux temps :

- l'interphase au cours de laquelle la cellule va grandir et le matériel génétique être répliqué. Cette phase constitue la majeure partie de la vie de la cellule ;
 - la division cellulaire ou mitose (M), au cours de laquelle vont se former les deux cellules-filles, contenant chacune le même patrimoine génétique.
- L'interphase est elle-même divisée en trois phases distinctes :
- la phase G1 a lieu juste après la mitose et permet à la cellule de synthétiser les éléments indispensables à leur accroissement ;
 - la phase S correspond à la phase de synthèse d'une deuxième copie du matériel génétique ;
 - la phase G2, plus courte, permet de préparer la mitose qui va suivre.

Document 2:

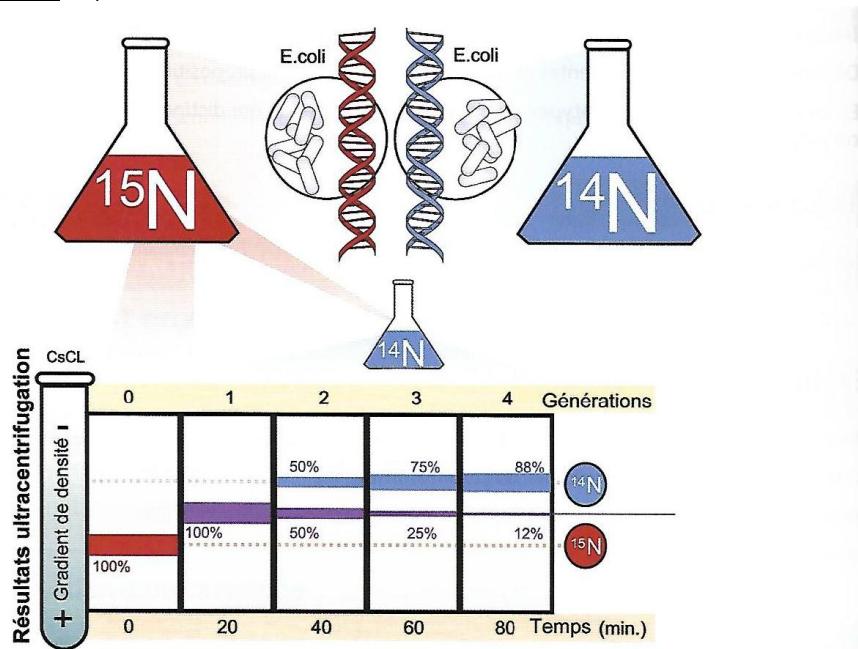


2. A l'aide du document 2, justifier la notion de cycle cellulaire.
3. Indiquer la durée du cycle cellulaire observé ici.

4. Décrire la variation de la masse cellulaire au cours du temps.
5. Décrire la variation de la quantité d'ADN au cours du temps.
6. A l'aide des descriptions précédentes et des données du document 1, délimiter et identifier sur les courbes les différentes phases du cycle cellulaire.
7. Etablir un récapitulatif des différentes phases observées au cours d'un cycle cellulaire et des événements « marquants » pour chacune de ces phases.

AD n°2: Les expériences de Meselson et Stahl.

Document 1: Expérience de Meselson et Stahl.

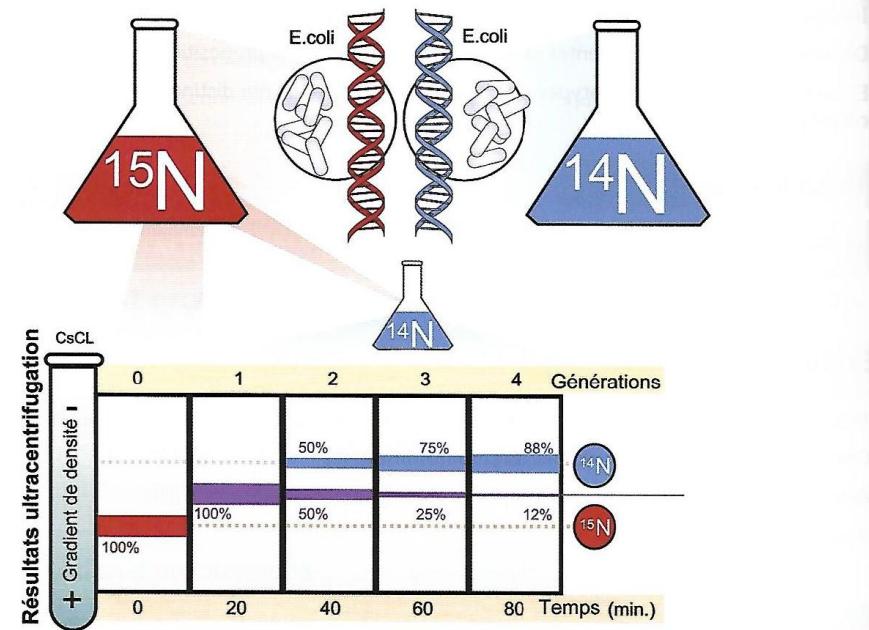


Les bactéries sont cultivées pendant de nombreuses générations dans un milieu enrichi en azote lourd ^{15}N . (Génération 0) puis transférées dans un milieu ne contenant que de l'azote léger ^{14}N . À chaque génération, l'ADN bactérien est extrait, placé dans un tube contenant de chlorure de césium centrifugé à haute vitesse. Ceci permet de séparer les molécules d'ADN selon leur densité.

- Expliquer le rôle du changement de milieu au cours de l'expérience décrite dans le document 1.
- Préciser quel type d'azote contiennent les molécules d'ADN correspondant à chacune des bandes observées après centrifugation.
- Expliquer à l'aide des documents le mode de réPLICATION de l'ADN.

AD n°2: Les expériences de Meselson et Stahl.

Document 1: Expérience de Meselson et Stahl.



Les bactéries sont cultivées pendant de nombreuses générations dans un milieu enrichi en azote lourd ^{15}N . (Génération 0) puis transférées dans un milieu ne contenant que de l'azote léger ^{14}N . À chaque génération, l'ADN bactérien est extrait, placé dans un tube contenant de chlorure de césium centrifugé à haute vitesse. Ceci permet de séparer les molécules d'ADN selon leur densité.

- Expliquer le rôle du changement de milieu au cours de l'expérience décrite dans le document 1.
- Préciser quel type d'azote contiennent les molécules d'ADN correspondant à chacune des bandes observées après centrifugation.
- Expliquer à l'aide des documents le mode de réPLICATION de l'ADN.

AD n°3 : La PCR, technique d'amplification de l'ADN.

Document 1 : Composition partielle du contenu d'un tube de PCR.
Delagrave, Biotechnologies, Terminale STL, 2017, doc 1 p.249.

Deux amores oligonucléotidiques : elles sont choisies pour s'hybrider avec les séquences délimitant la portion d'ADN à amplifier (donc complémentaires de ces mêmes séquences).

Une ADN polymérase ADN dépendante thermostable (température optimale de 72 °C et résistante à 95 °C)

Bon à savoir : L'ADN polymérase thermorésistante est extraite d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*.

Un tampon apportant des ions magnésium Mg²⁺, cofacteur indispensable à l'activité de l'enzyme ADN polymérase.

Le tube PCR est ensuite introduit dans un appareil PCR, aussi appelé thermocycleur.

2. Proposer un nom pour chacune des étapes de la PCR.
3. Indiquer la température de l'étape 3. Argumenter la réponse.
4. Expliquer l'importance de travailler avec une ADN polymérase thermostable.
5. Schématiser les trois étapes de la PCR en représentant les brins matricés orientés, les amores orientées et le sens de la polymérisation.
6. Expliquer pourquoi une PCR permet l'amplification de la portion ciblée.
7. Indiquer le rôle de l'appareil PCR.
8. Expliquer si les tailles de l'ADN matrice et de l'amplicon sont identiques ou différentes.

1. Compléter la composition qualitative du contenu du tube PCR.

Document 2 : Les 3 étapes d'un cycle de PCR. Delagrave, Biotechnologies, Terminale STL, 2017, doc 2 p.249.

La procédure opératoire d'une PCR comprend plusieurs cycles, eux-mêmes composés des trois étapes suivantes :

Étape	Rôle	Temps et température
Étape 1	Séparation des deux brins de l'ADN matrice bicaténaire	30 s à 1 min à 95 °C
Étape 2	Appariement des amores par hybridation spécifique aux nucléotides complémentaires des brins d'ADN matrice	30 s à 45 °C – 60 °C
Étape 3	Synthèse des brins d'ADN complémentaires des brins matrice par incorporation des désoxyribonucléotides à partir de l'extrémité 3' des amores	30 s à 2 min à ... °C

À l'issue de l'étape 3, chaque brin d'ADN matrice monocaténaire est dupliqué, donnant deux molécules d'ADN bicaténaires. Les deux molécules d'ADN qui viennent d'être synthétisées servent à leur tour de matrice. Les trois étapes sont de nouveau répétées, permettant pour chaque ADN copie de donner deux nouvelles copies d'ADN. À l'issue de chaque cycle, il y a doublement des copies d'ADN.
Une PCR comprend 20 à 30 cycles. La portion d'ADN ainsi amplifiée est appelée « amplicon ».

AD n°4 : Le clonage moléculaire.

1. Proposer une définition pour le clonage.
2. Rappeler en quoi consiste une restriction.
3. Expliquer le ou les rôle(s) des restrictions dans le cadre d'un clonage moléculaire.
4. Repérer le rôle de la ligation.
5. Nommer la molécule d'ADN obtenue après la ligation.
6. Citer les outils moléculaires et cellulaires nécessaires à la réalisation d'un clonage moléculaire.
7. Lister les étapes *in vitro* d'un clonage moléculaire.
8. Expliquer pourquoi l'amplification par clonage moléculaire est dite *in vivo*.

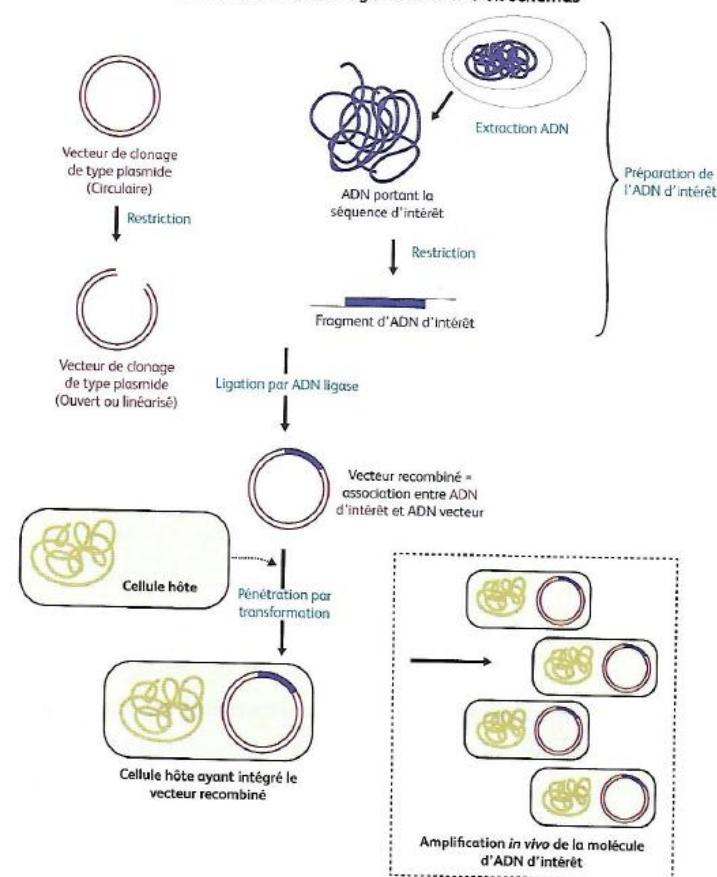
Document 1 : Principe d'un clonage moléculaire. Delagrave, Biotechnologies, Terminale STL, 2017, doc 1 p.252.

Le fragment d'ADN à amplifier est introduit dans une cellule hôte. Pour que le fragment d'ADN se réplique dans la cellule hôte, il est associé à une molécule d'ADN vecteur pouvant se répliquer de manière autonome dans la cellule hôte grâce à une origine de réplication.

Il s'agit d'un clonage moléculaire, car le fragment d'ADN à amplifier est répliqué à l'identique dans toutes les cellules hôtes après multiplication cellulaire.

Le fragment d'ADN à amplifier ou à cloner est aussi appelé « ADN d'intérêt ». *In vitro*, il est associé à une molécule d'ADN vecteur grâce à des outils moléculaires comme des enzymes. L'ADN résultant de l'association entre l'ADN d'intérêt et l'ADN vecteur est appelé ADN recombinant. L'ADN recombinant est introduit dans la cellule hôte par une technique dite de « transformation ».

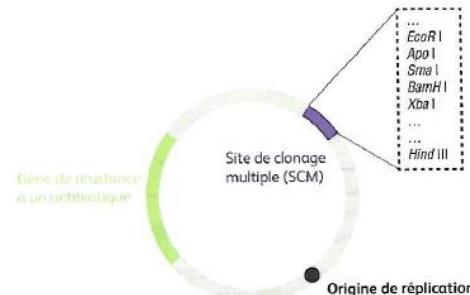
Les étapes d'un clonage moléculaire en schémas



Document 2 : Définition et caractéristiques d'un vecteur de clonage.
Delagrave, Biotechnologies, Terminale STL, 2017, doc 2 p.253.

Les vecteurs de clonage sont des outils moléculaires qui permettent de véhiculer et d'amplifier un fragment d'ADN *in vivo*. Ils sont fabriqués à partir de molécules d'ADN naturelles (plasmide bactérien, ADN phagique, etc.) et modifiées pour permettre l'intégration du fragment d'intérêt et son amplification dans une cellule hôte. Pour véhiculer l'ADN d'intérêt, le vecteur de clonage doit pouvoir l'intégrer. Il possède en conséquence de nombreux sites de restriction.

Caractéristiques d'un vecteur de clonage de type « plasmidique »



Un vecteur de clonage possède :

- de nombreux sites de restriction uniques, souvent regroupés au niveau d'une courte séquence d'ADN appelée « site de clonage multiple » ou SCM (Multiple Cloning Site, MCS) ;
- une origine de réplication bactérienne ;
- un gène permettant de sélectionner les cellules hôtes après transformation par le vecteur recombiné. Il s'agit le plus souvent d'un gène de résistance à un antibiotique, comme le gène bla (gène de résistance à l'ampicilline).

Bon à savoir

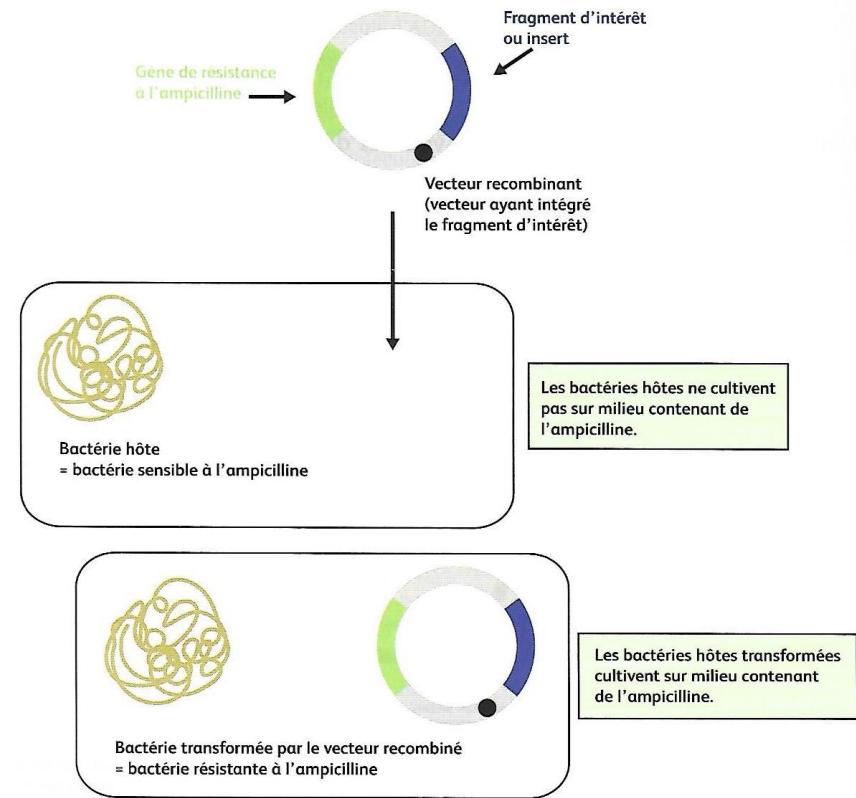
Les plasmides naturels possèdent déjà deux caractéristiques des vecteurs de clonage : gène de résistance à un antibiotique et origine de réplication. Ils sont modifiés pour posséder un SCM.

Document 3 : Définition et caractéristiques d'un vecteur de clonage.
Delagrave, Biotechnologies, Terminale STL, 2017, doc 3 p.254.

Toutes les bactéries subissant la transformation par le vecteur recombinant ne sont pas transformées. Les bactéries non transformées n'étant pas utiles sont inhibées et les bactéries transformées par le vecteur recombinant sont sélectionnées après étalement sur un milieu sélectif.

Dans l'exemple schématisé :

- le gène de résistance apporté par le vecteur est le gène bla, codant pour l'enzyme β-lactamase catalysant la réaction de dégradation de l'ampicilline ;
- les bactéries hôtes sont sensibles à l'ampicilline.



9. Rappeler la définition d'un plasmide en indiquant les cellules dans lequel il peut être présent.
10. Expliquer le rôle des sites de restriction d'un vecteur de clonage. En déduire le double intérêt de la présence de nombreux sites de restriction et de la présence de chacun des sites en un seul exemplaire.
11. Rappeler en quoi consiste la réplication et en déduire le rôle de l'origine de réplication.
12. Utiliser le document 1 pour indiquer les étapes enzymatiques permettant l'intégration d'un ADN d'intérêt dans un vecteur de clonage et indiquer le rôle de la transformation d'une cellule hôte par le vecteur recombinant.
13. Indiquer dans quel type de cellule est introduit le vecteur recombinant. Argumenter la réponse.
14. Indiquer l'agent sélectif utilisé dans le milieu de culture pour sélectionner les bactéries transformées par le vecteur et inhiber celles non transformées.
15. Expliquer si la bactérie utilisée doit posséder dans son génome le gène bla.
16. Proposer la mise en œuvre et le résultat d'un témoin validant que la souche utilisée est bien sensible à l'ampicilline.