TP 1A-4 : La réplication de l'ADN au cours de la phase S

Matériel:	*Compétences :*
- *Logiciel de visualisation de molécule (Rastop ou libmol) et sa Fiche technique* - *Fichier de molécule de l'ADN polymérase beta humaine liée à une petite portion d'ADN ouvert : dna_polymerase_betadna_complex_1BPX.pdb* - *Animation sur l'ADN polymérase*	○ *Mettre en œuvre une démarche expérimentale scientifique pour résoudre un problème* ○ *Utiliser les fonctionnalités d'un logiciel* ○ *Communiquer sous forme graphique*

On sait que la quantité d'ADN double pendant la phase S de l'interphase avant une division cellulaire (mitose ou méiose), ce qui permet d'avoir des chromosomes à 2 chromatides en phase G2. L'ADN est copié pendant cette étape. ***On cherche à comprendre le mécanisme de la copie (= réplication) de l'ADN lors de la phase S.***

A. Le mode de réplication de l'ADN

Voir la version numérique de cette partie du TP pour vous aider à répondre aux questions ci-dessous sur la page : https://svtlsw.blog.ac-lyon.fr/wordpress/2020/09/14/iii-la-replication-de-ladn-au-cours-de-linterphase/

Après la découverte de la structure de l'ADN en double hélice avec 2 brins complémentaires par Watson, Crick et Franklin en 1953, plusieurs hypothèses ont été émises sur le mode de réplication de l'ADN :

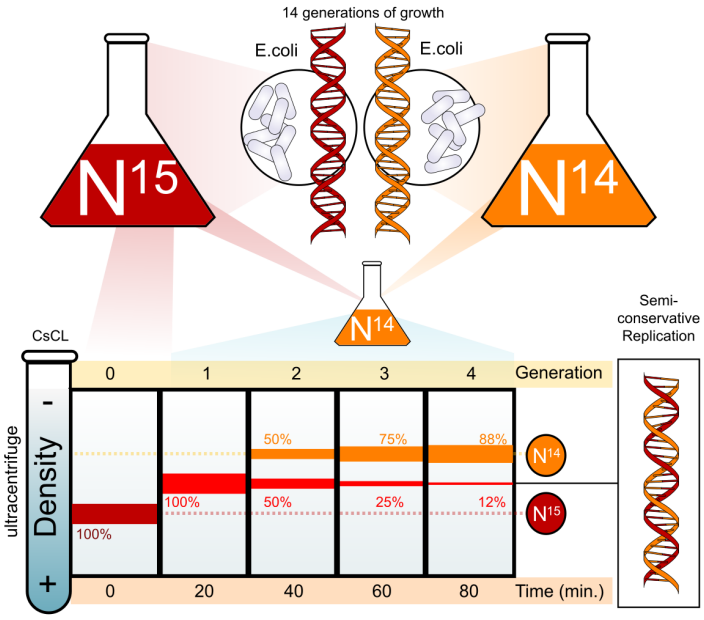
- la réplication **conservative** : les 2 brins parentaux de la double hélice d'ADN restent accolés et une double hélice d'ADN est synthétisée à côté
- la réplication **dispersive** : les 2 brins parentaux se disloquent et sont dispersés entre les 2 nouvelles molécules d'ADN, avec des morceaux d'ADN en double hélice néoformés pour compléter la molécule
- la réplication **semi-conservative** : les brins d'ADN parentaux et chaque brin parental sert de matrice pour synthétiser un nouveau brin, formant ainsi une molécule mixte composée à la fois d'ADN nouvellement synthétisé et d'ADN parental.

1) **Schématiser la double hélice d'ADN avant et après la phase S pour ces différentes hypothèses en représentant les brins parentaux en bleu et les brins néoformés en rouge dans les 2 premières colonnes du doc C.** *Vérifier votre réponse avec le document 1 p.24 du livre. D'après vos connaissances sur l'ADN, quelle/s hypothèse/s vous semble/nt la/les plus probable/s ? Justifier en une phrase.*
2) Des expériences ont été réalisées pour tester la validité de ces hypothèses par Meselson et Stahl en 1958 pour déterminer l'hypothèse la plus probable (voir doc A). **Exploiter leurs résultats pour déterminer l'hypothèse retenue.** *Les résultats n'étant pas directement exploitables*, **présenter** :
   a. **le principe général de l'expérience** : quelle molécule l'azote marque-t-il ? Quel est le rôle de l'azote lourd ^{15}N au début de l'expérience ? et l'azote léger ^{14}N dans la suite de l'expérience ?
   b. **les résultats attendus** pour chaque hypothèse sur le document fourni (doc C), avec :
      - la molécule d'ADN d'une cellule à un chromosome avec les brins parentaux (bleu) et néoformés (rouge) ;
      - la position de l'ADN dans les tubes centrifugés sous forme de bandes horizontales. Indiquer la proportion d'ADN pour chaque bande en fonction du nombre de cellules portant les différents types d'ADN. *(Les tubes fonctionnent comme une « balance », et l'ADN se positionne donc selon son « poids », en fonction de la quantité d'ADN lourd et d'ADN léger dans la molécule).*
   c. **Analyser l'expérience** : comparer vos résultats attendus avec les résultats expérimentaux (observation) et conclure sur l'hypothèse validée (déduction).

B. La découverte de l'ADN polymérase

1) **A partir du document B fourni et de ce qui précède, proposer une hypothèse sur le mécanisme de la réplication de l'ADN.**
2) **Avec le logiciel Rastop ou Libmol, montrer comment l'ADN polymérase permet la synthèse d'ADN. Faire apparaître l'appariement des nucléotides entre les 3 brins d'ADN (2 parentaux et un néoformé) :** *Mettre en évidence l'ADN polymérase (Commandes > Protéine), puis les chaines de l'ADN (ADN/ARN > rubans > chaines), puis les nucléotides (résidus : passer la souris sur les nucléotides pour afficher la légende et trouver leur code couleur).*
3) **Présentez vos résultats sous forme numérique :** *touche "impr écran" puis coller sur un document type traitement de texte ou image. Ajouter les légendes et le titre.*
4) **Exploitez vos résultats pour valider ou non votre hypothèse. Expliquez le mécanisme de réplication de l'ADN à l'aide de l'animation ou de la vidéo et complétez le schéma de la réplication de l'ADN (Doc B) : comment les nucléotides sont-ils ajoutés au niveau du brin néoformé ? Quel est le rôle de l'ADN polymérase ?**

Animation de la réplication de l'ADN : http://mediatheque.accesmad.org/educmad/mod/page/view.php?id=35847



Meselson et Stahl ont réalisé une expérience pour déterminer comment l'ADN était répliqué. Ils ont cultivé des bactéries dans un milieu enrichi en azote lourd ^{15}N, (l'azote est un constituant des bases azotées des nucléotides de l'ADN). Ensuite, les bactéries sont prélevées et transférées dans un milieu enrichi en ^{14}N, et cultivées pendant 1, 2 ou 3 cycles cellulaires ; leur ADN est extrait et centrifugé, et l'ADN est détecté. Il apparait dans le tubeen bandes horizontales. La hauteur des bandes dans le tube indique la densité de l'ADN (lourd ou léger) et la largeur des bandes indique la proportion d'ADN ayant cette densité : l'ADN « lourd » migre en bas du tube, l'ADN léger en haut, et l'ADN mixte a une position intermédiaire : il est au milieu s'il est composé à 50% d'ADN lourd et 50% d'ADN léger.

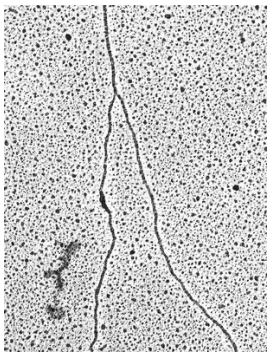
Doc A: L'expérience de Meselson et Stahl

Source de l'illustration : site Réplic'ADN *https://view.genial.ly/59d91f61f2aaf10cbc6a83c4/interactive-content-replicadn*

En 1958, Arthur Kornberg, médecin et biochimiste américain, met en évidence l'existence dans les cellules d'une enzyme (= *protéine capable d'accélérer une réaction biologique*) qui catalyse (= *accélère*) la synthèse de nouvelles molécules d'ADN à partir d'ADN préexistant, de nucléotides et d'énergie. Il l'appelle ***ADN polymérase*** **:** elle polymérise l'ADN, c'est-à-dire qu'elle ajoute des nucléotides (*des monomères**) à l'ADN (*un polymère**).

En 1963, John Cairns, biologiste anglais, observe que les deux brins de l'ADN de la bactérie *E. coli* se séparent au moment de la réplication, formant des *yeux de réplication*, avec une *fourche de réplication* de chaque côté. Quelques années plus tard, les mêmes observations sont faites chez les eucaryotes (*voir image ci-contre*).

**Un polymère est une molécule formée de nombreuses sous-unités répétitives, appelées monomères.*



Photographie d'une fourche de réplication de l'ADN au microscope électronique à transmission (MET x 100 000) dans une cellule humaine

Doc B : La découverte de l'ADN polymérase *(source : SVT 1e Hachette)*

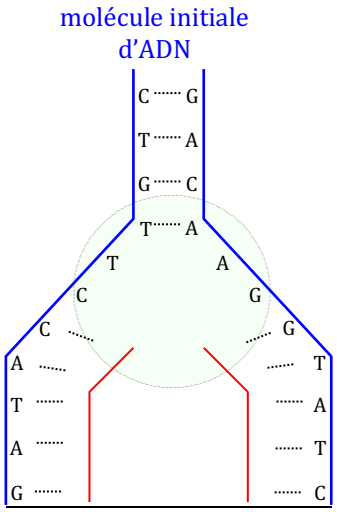
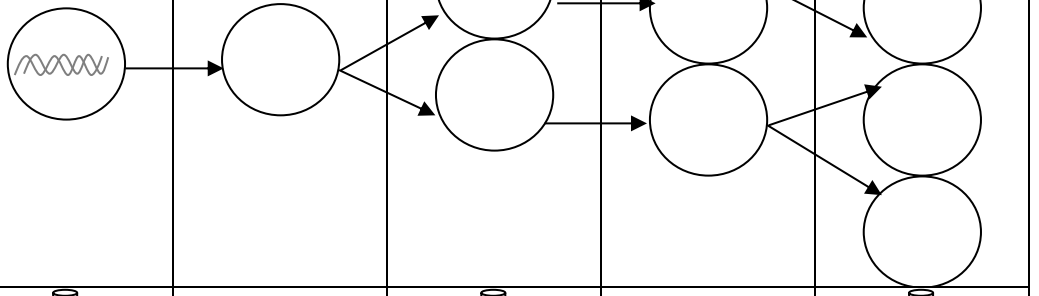
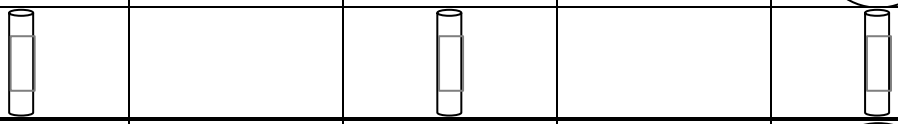
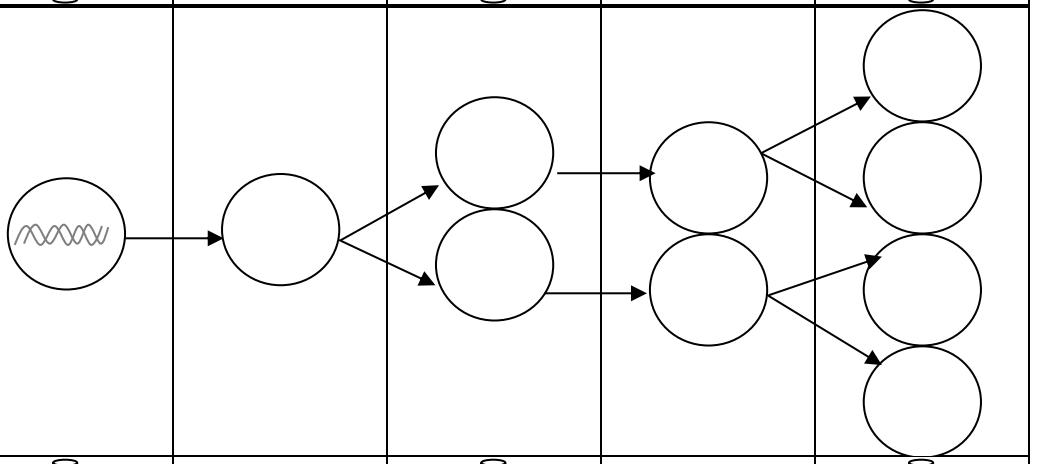
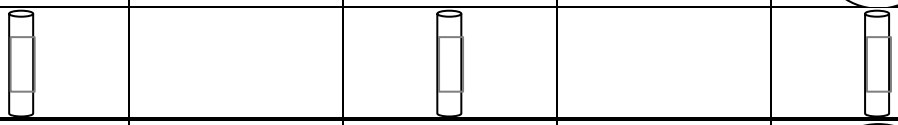
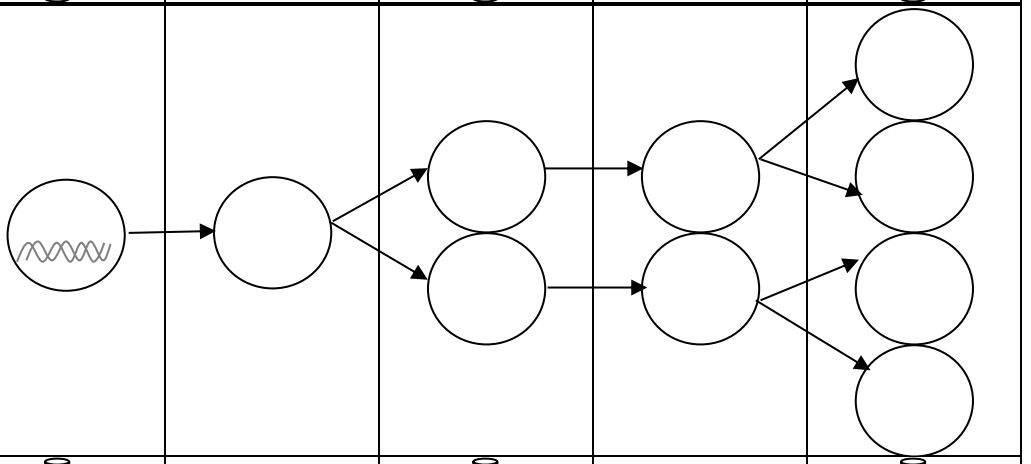
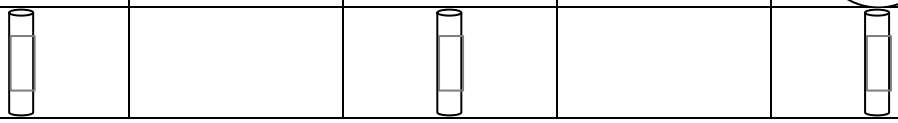


Schéma : La réplication de l'ADN

		Début d'expérience : phase G1	1e cycle cellulaire		2e cycle cellulaire	
			Phase G2	Fin de mitose	Phase G2	Fin de mitose
Modèle conservatif	Cellule					
	Positions de l'ADN dans le tube					
Modèle semi-conservatif	Cellule					
	Positions de l'ADN dans le tube					
Modèle dispersif	Cellule					
	Positions de l'ADN dans le tube					

<u>Rappel</u> : chaque chromatide d'un chromosome est constituée d'une double hélice d'ADN.

<u>Légende</u> : *double hélice d'ADN = un chromosome à une chromatide* *Brin parental (bleu)* *brin néoformé (rouge)*

2 doubles hélices d'ADN reliées entre elles par un centromère = 1 chromosome à 2 chromatides

<u>Doc C : Schéma des résultats attendus de l'expérience de Meselson et Stahl pour une cellule à un chromosome</u>