

TP 03. La réplication de la molécule d'ADN

Dès leur publication originale sur la structure de l'ADN, Watson et Crick ont proposé que la première étape de la réplication est la séparation des deux brins d'ADN. Chacun des deux brins forme une matrice qui détermine l'ordre des nucléotides des deux nouveaux brins complémentaires en voie de formation. L'extrême longueur d'une molécule d'ADN est connue également.

Partie 1 : On cherche à déterminer comment se réalise la réplication conforme de la molécule d'ADN.

Doc. 1 Le principe de l'expérience de Meselson et Stahl

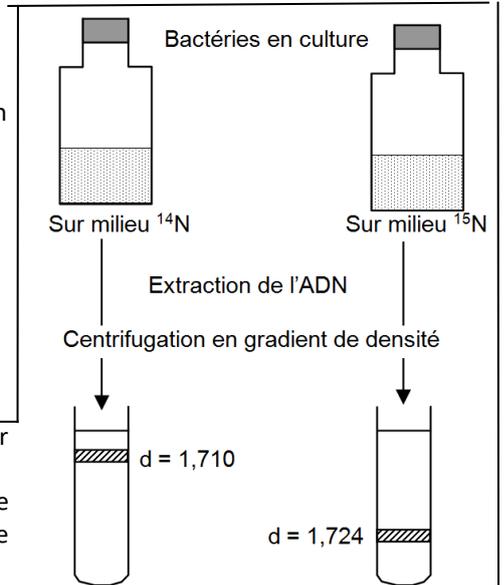
Pour tester les différents modèles de réplication de la molécule d'ADN, Meselson et Stahl mettent au point une expérience nécessitant la maîtrise de plusieurs éléments :

- ▶ la synchronisation de la multiplication bactérienne,
- ▶ d'un milieu de culture dans lequel les sources d'azote utilisées par les bactéries sont constituées d'azote ^{15}N (depuis assez longtemps pour posséder un ADN homogène lourd),
- ▶ d'une technique de centrifugation par gradient de densité permettant de séparer l'ADN constitué de ^{14}N de l'ADN constitué de ^{15}N (le léger migre moins que le lourd).

Pour former leurs nucléotides, les bactéries utilisent les sources d'azote à leur disposition.

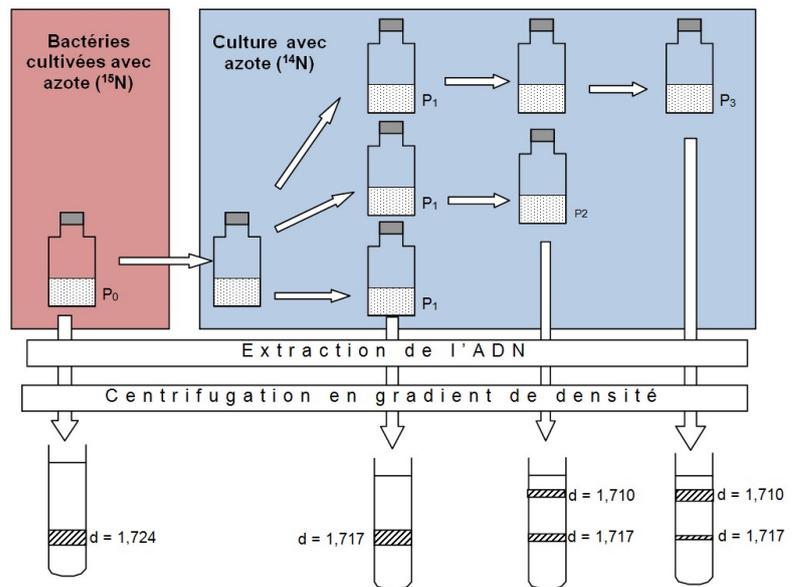
Des bactéries sont cultivées sur un milieu contenant une source d'azote « normal » (^{14}N). Après extraction de leur ADN, on pratique une centrifugation de ces molécules, dite en gradient de densité.

On agit de même avec des bactéries cultivées sur un milieu contenant une source d'azote « lourd » (^{15}N).



Doc. 2 Les résultats

Des bactéries cultivées depuis longtemps en présence de molécules azotées ^{15}N sont repiquées sur un milieu contenant des molécules azotées ^{14}N et permettant la synchronisation des divisions. Des fractions sont prélevées après différents temps correspondant à 1, 2, 3... divisions. L'ADN est extrait, placé dans la solution de chlorure de Césium et centrifugé 24h à 100.000 g. La position des ADN est repérée par une mesure de la densité optique. On obtient le résultat



P₀ : population initiale obtenue sur ^{15}N

P₁ : bactéries de 1^{ère} génération issues de P₀ et obtenues sur ^{14}N

P₂ : bactéries de 2^{ème} génération issues de P₁ et obtenues sur ^{14}N

P₃ : bactéries de 3^{ème} génération issues de P₂ et obtenues sur ^{14}N

suivant

Aide à la résolution :

- ✓ Réaliser un schéma de la structure de la molécule d'ADN.
- ✓ Identifier les contraintes qu'impliquent une réplication conforme.
- ✓ À l'aide du schéma précédent, identifier les différentes hypothèses permettant une réplication conforme de la molécule d'ADN puis en faire une représentation schématique sur 3 générations.
- ✓ Analyser les expériences de Meselson et Stahl afin de valider ou invalider vos différentes hypothèses.

Proposer une représentation adaptée exprimant vos hypothèses	conformité	La représentation choisie répond aux règles d'usage (titre, légendes, taille, lisibilité)	/3
	exactitude	La représentation prend en compte les contraintes connues (ADN bicatenaire, complémentarité, reproduction conforme)...	
	pertinence	La représentation choisie permet d'exprimer l'ensemble de la réponse et fait ressortir les faits importants. La forme utilisée fait apparaître tous les éléments utiles à la compréhension	
	complétude	La totalité de la réponse est présente	
	clarté	La représentation choisie est facilement lisible, les codes utilisés explicites	
Confronter le résultat au résultat attendu, mettre en relation, déduire, valider ou invalider (la conjecture), l'hypothèse.	conformité	Les résultats (attendus ou obtenus)/témoin sont comparés Les résultats décrits fournissent un argument en faveur de la réponse au problème L'hypothèse est validée si ce qui est obtenu/observé est conforme à ce qui était attendu, rejetée dans le cas contraire	/2
	exactitude	La réponse exprimée est exacte	
	pertinence	Seuls les résultats nécessaires à la démarche sont relevés Les résultats sont reliés au problème posé La justification est cohérente avec l'hypothèse testée	
	complétude	Tous les résultats utiles sont pris en compte	
	clarté	L'argumentation est clairement exprimée	

**Partie 2 : On cherche à reproduire ce phénomène in vitro afin d'obtenir un grand nombre d'un extrait d'ADN prélevé. On veut produire 10000 fois plus d'exemplaires que dans le milieu d'origine.(on estime la vitesse du phénomène constante).
 Construire un algorithme que l'on pourrait transformer en programme pour ARDUINO qui permet de répondre à notre demande. Vous y spécifierez le matériel à utiliser.**

Ressources :

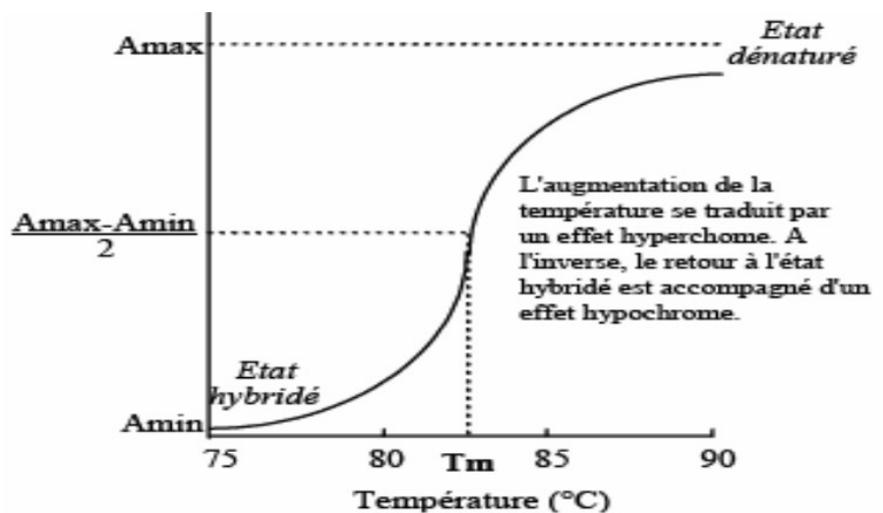
Doc 1 : En 1988, on utilise pour la première fois in vitro une ADN polymérase thermostable, provenant de *Thermus aquaticus*, on la surnomme Taq polymérase. En général, elle a une activité catalytique maximale à de 75 à 80 °C (on choisit en général 72°C comme température du milieu) et des activités substantiellement réduites à de plus basses températures. A 37°C, la polymérase Taq n'est qu'à 10% de son activité maximale.

Il faut à cette polymérase des amorces ADN pour débiter la réplication et elle n'agit que si l'ADN est non hybridé c'est à dire que les brins complémentaires sont séparés. Le temps de réplication dépend de la taille des morceaux d'ADN à copier mais 2mn suffisent en général à copier les morceaux d'ADN que l'on veut amplifier.

Doc 2 : Absorbance de la lumière à $\lambda=260\text{nm}$ d'une solution contenant de l'ADN en fonction de la température.

L'état hybridé correspond à un état ADN double brins et dénaturé à un état ADN simple brin, les liaisons hydrogène ont été rompues.

T_m est appelée température de fusion de l'ADN. Seul l'ADN simple brin peut être hybridé avec une amorce et être lu par une polymérase.



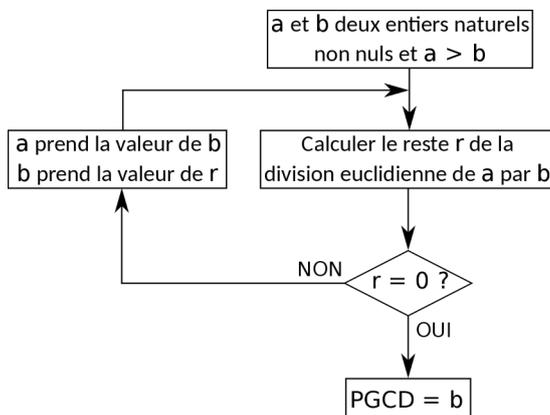
Doc3 : Les amorces ADN sont des morceaux d'ADN simple brin complémentaires aux extrémités 3'(une par brin) de l'ADN à copier, on estime qu'à 53°C, leur hybridation avec l'ADN à copier sera plus rapide que celle d'un brin complémentaire. Cette hybridation prend 30 secondes à condition de mettre une grande concentration d'amorces dans le milieu.

Doc4 : Pour créer un brin d'ADN, il faut des « briques », ce sont les désoxyribonucléotides triphosphate :

- dATP
- dCTP
- dGTP
- dTTP

Ces éléments sont des « consommables » tout comme les amorces, il faut donc s'assurer que leur concentration dans le milieu soit toujours élevée pour optimiser la polymérisation de l'ADN.

← Doc5 : un exemple d'algorithme.



Doc6 : L'Arduino est une espèce de mini ordinateur qui peut exécuter des programmes de commande de matériel sur lequel il est branché. On peut aussi y brancher des capteurs variés, il pourra donc intégrer des valeurs rapportées par les capteurs dans ses programmes. En outre, il peut mesurer le temps.