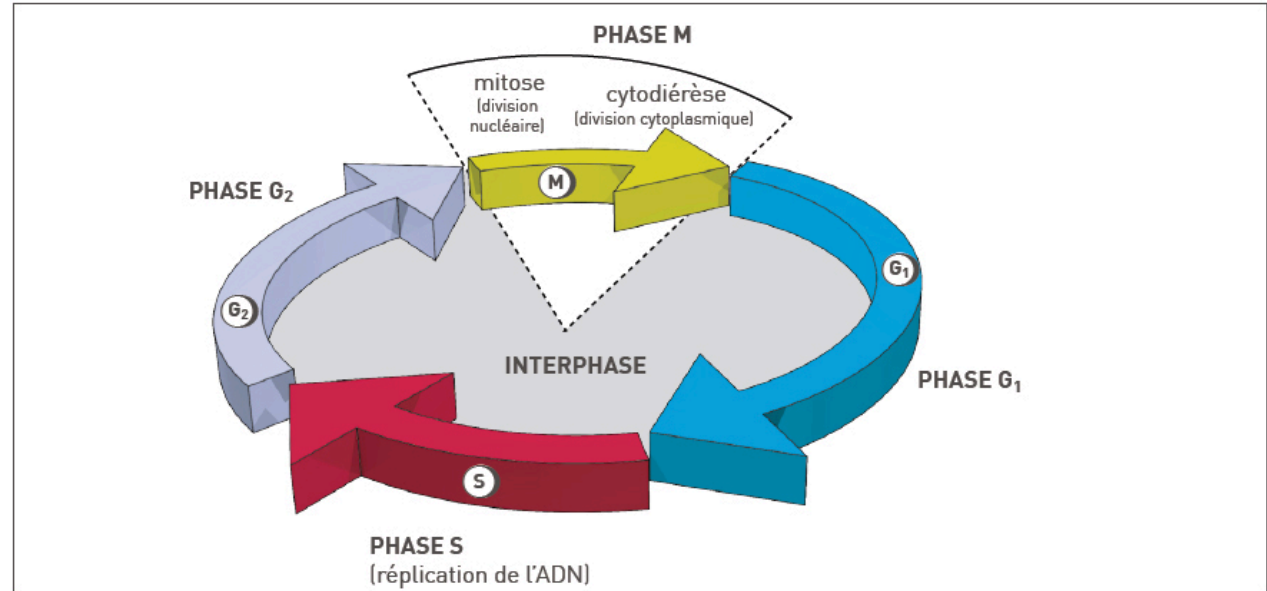


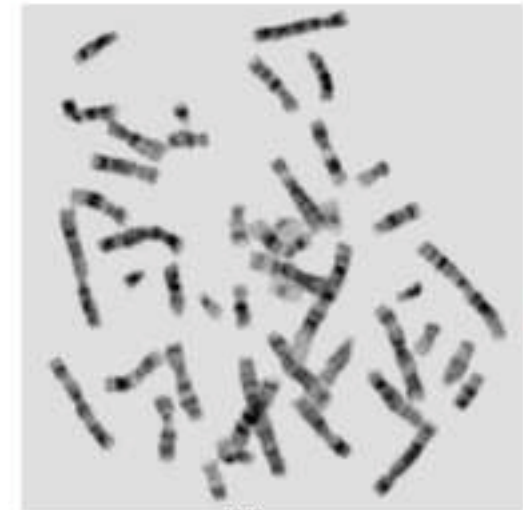
Activité 3 - La réplication de l'ADN



Meselson et Stahl. Photo prise en 1996 par F.L.Holmes.



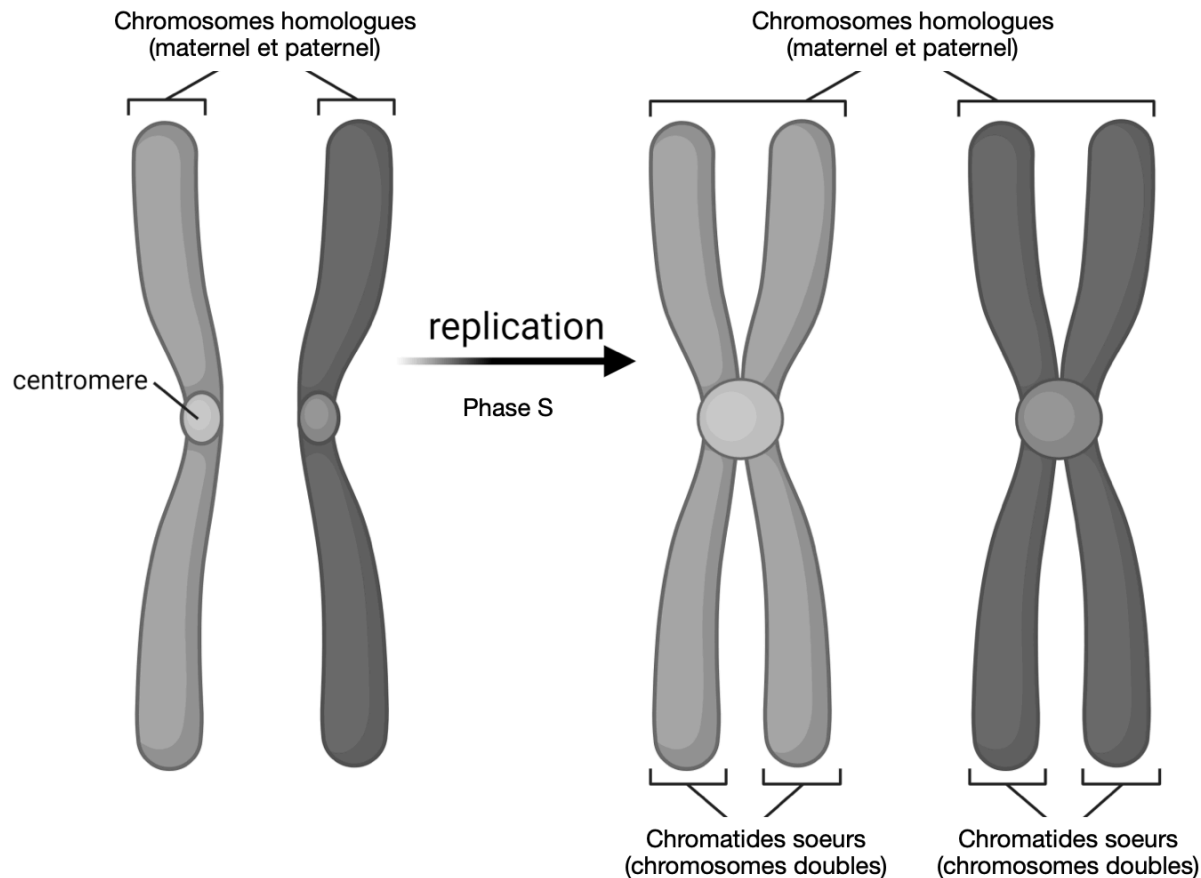
Phase S :
Réplication
←



Mise en situation - Recherche à mener

Les divisions cellulaires, mitose et méiose, sont précédées d'une phase S de synthèse d'ADN au cours de laquelle les chromosomes sont dupliqués : ils passent d'une à deux chromatides. Ce mécanisme repose sur la réplication de l'ADN.

On cherche à comprendre les modalités de cette réplication de l'ADN.



Ressource

Document 1 : Les hypothèses de Meselson & Stahl, racontées par les chercheurs

« Nous avons cherché à savoir si l'ADN se réplique de façon **semi-conservative**, de façon **dispersive** ou de façon **conservative**. Autrement dit, à chaque division :

- Est-ce que les deux brins se séparent, restent sous la forme d'un simple brin pendant un certain temps puis se retrouvent associés chacun à un brin nouvellement synthétisé ?
- Ou bien est-ce qu'ils se disloquent et sont ensuite dispersés pour en conserver aucun brin intact ? La copie se réalise par fragments dispersés dans l'ensemble de l'ADN.
- Ou bien est-ce que les deux brins restent indéfiniment accolés et permettent la synthèse, à côté d'eux, d'une molécule dont les deux brins sont nouvellement synthétisés ? »



Meselson et Stahl. Photo prise en 1996 par F.L.Holmes.

Etape 1 : Comprendre l'expérience et imaginer les différents résultats des 3 hypothèses

Une fois que le principe de l'expérience vous aura été présenté par votre professeur vous complèterez le tableau n°1. Attention de bien respecter le code couleur imposé pour la schématisation :

- En **bleu** pour les chaînes de nucléotides de l'ADN initial ;
- En **rouge** pour les chaînes de nucléotides de l'ADN nouvellement formé.

| Nom des hypothèses | ADN avant réplication (Génération 0) | ADN après réplication (Génération 1) |
|--------------------|---|---|
| | | |
| Proportion ADN | 100% ADN « bleu » | 50% ADN « bleu » + 50% ADN « rouge » |
| | | |
| Proportion ADN | 100% ADN « bleu » | 50% ADN « bleu » + 50% ADN « rouge » |
| | | |
| Proportion ADN | 100% ADN « bleu » | 50% ADN « bleu » + 50% ADN « rouge » |

Tableau n°1 des résultats hypothétiques avant l'expérience de Meselson et Stahl après une génération de réplication


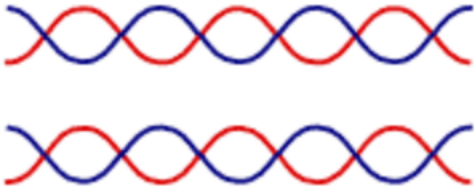

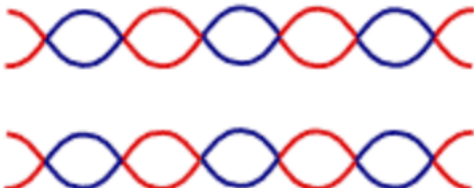

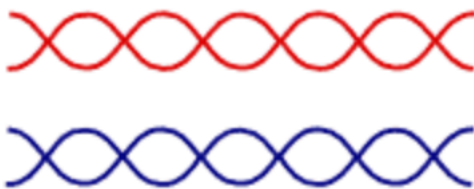
| Nom des hypothèses | ADN avant répllication (Génération 0) | ADN après répllication (Génération 1) |
|--------------------|--|---|
| Semi-conservatif |  |  |
| Proportion ADN | 100% ADN « bleu » | 50% ADN « bleu » + 50% ADN « rouge » |
| Dispersif |  |  |
| Proportion ADN | 100% ADN « bleu » | 50% ADN « bleu » + 50% ADN « rouge » |
| Conservatif |  |  |
| Proportion ADN | 100% ADN « bleu » | 50% ADN « bleu » + 50% ADN « rouge » |

Tableau n°1 des résultats hypothétiques avant l'expérience de Meselson et Stahl après une génération de répllication


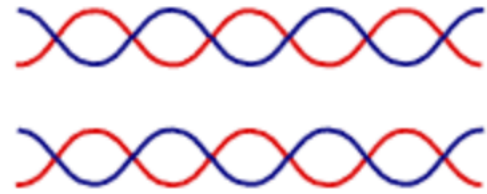
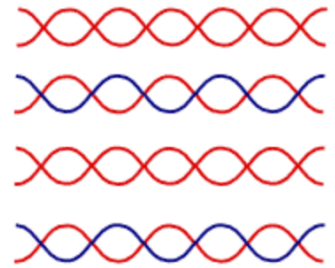

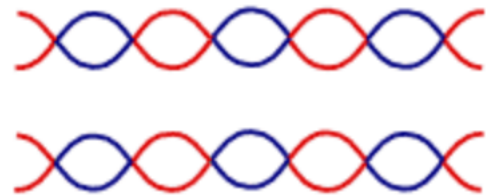
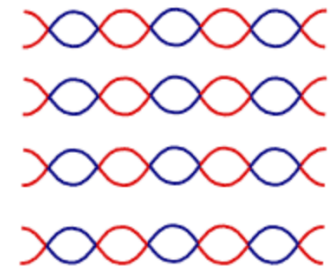

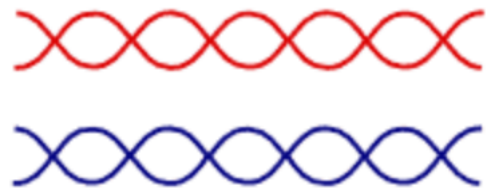
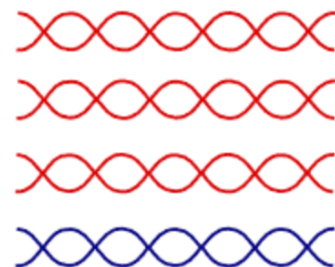
| Nom des hypothèses | ADN avant répllication (Génération 0) | ADN après répllication (Génération 1) | ADN après deux répllications (Génération 2) |
|--------------------|---|---|--|
| Semi-conservatif |  |  |  |
| Proportion ADN | 100% ADN « bleu » | 50% ADN « bleu » + 50% ADN « rouge » | 25% ADN « bleu » + 75% ADN « rouge » |
| Dispersif |  |  |  |
| Proportion ADN | 100% ADN « bleu » | 50% ADN « bleu » + 50% ADN « rouge » | 50% ADN « bleu » + 50% ADN « rouge » |
| Conservatif |  |  |  |
| Proportion ADN | 100% ADN « bleu » | 50% ADN « bleu » + 50% ADN « rouge » | 25% ADN « bleu » + 75% ADN « rouge » |

Tableau n°1 des résultats hypothétiques avant l'expérience de Meselson et Stahl après une et deux générations de répllication

Ressource

Document 1 : Les hypothèses de Meselson & Stahl, racontées par les chercheurs

« Nous avons cherché à savoir si l'ADN se réplique de façon **semi-conservative**, de façon **dispersive** ou de façon **conservative**. Autrement dit, à chaque division :

- Est-ce que les deux brins se séparent, restent sous la forme d'un simple brin pendant un certain temps puis se retrouvent associés chacun à un brin nouvellement synthétisé ?
- Ou bien est-ce qu'ils se disloquent et sont ensuite dispersés pour en conserver aucun brin intact ? La copie se réalise par fragments dispersés dans l'ensemble de l'ADN.
- Ou bien est-ce que les deux brins restent indéfiniment accolés et permettent la synthèse, à côté d'eux, d'une molécule dont les deux brins sont nouvellement synthétisés ? »



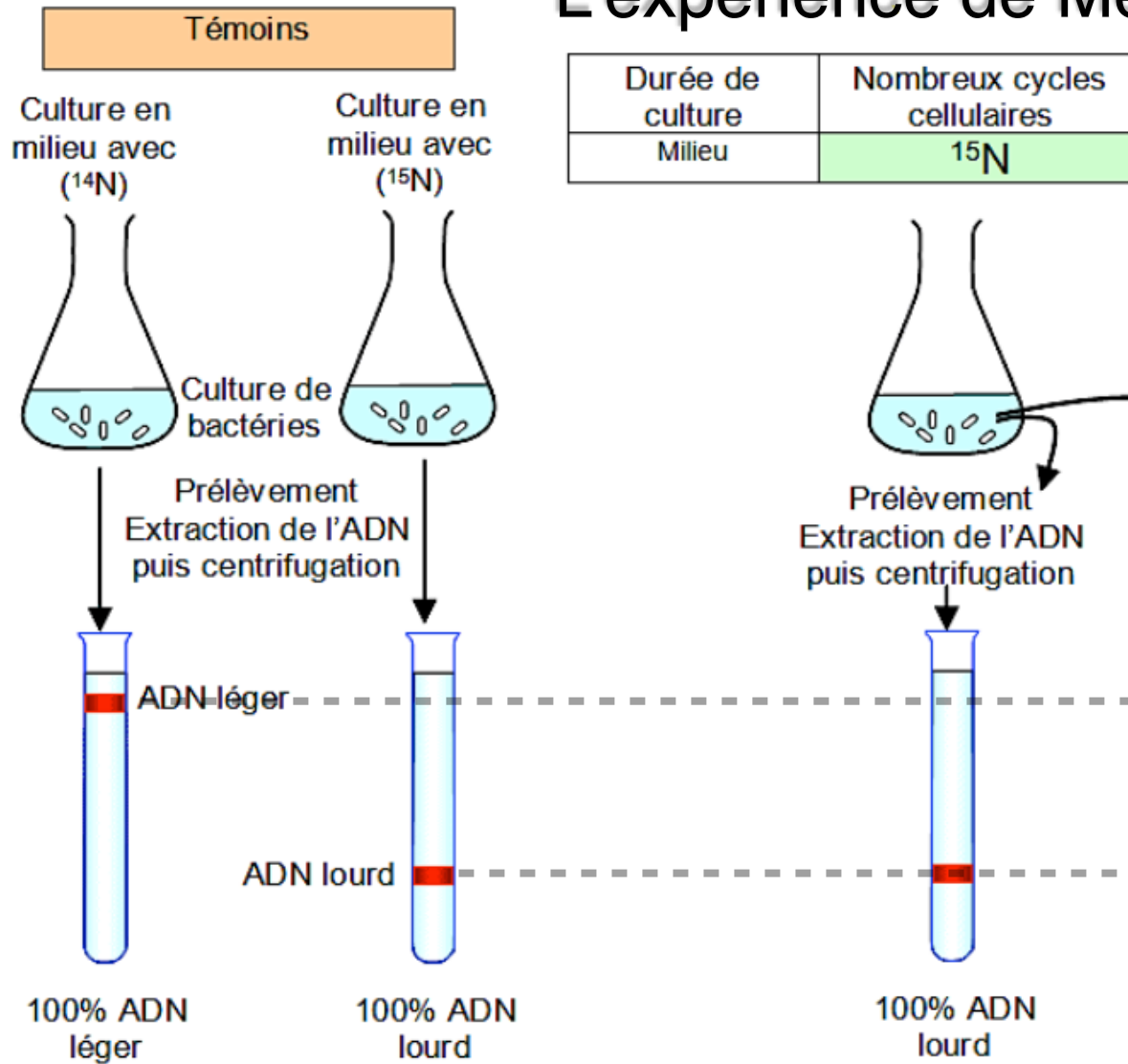
Meselson et Stahl. Photo prise en 1996 par F.L.Holmes.

Etape 1 : Comprendre l'expérience et imaginer les différents résultats des 3 hypothèses

Une fois que le principe de l'expérience vous aura été présenté par votre professeur vous complèterez le tableau n°1. Attention de bien respecter le code couleur imposé pour la schématisation :

- En **bleu** pour les chaînes de nucléotides de l'ADN initial ;
- En **rouge** pour les chaînes de nucléotides de l'ADN nouvellement formé.

L'expérience de Meselson et Stahl



| Durée de culture | Nombreux cycles cellulaires | 1 cycle cellulaire | 2 cycles cellulaires | 3 cycles cellulaires |
|------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| Milieu | ^{15}N | | | |



Etape 2 : Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables

Identifier le mode de réplication de l'ADN

Matériel

- 3 tubes à essai
- 1 porte tubes
- Bécher de solution de saccharose à 65%
- Bécher de solution de saccharose à 45%
- Bécher de solution de saccharose à 25%
- Bécher de solution de saccharose à 0% (eau distillée)
- Tube Eppendorf de solution bleue « ADN ¹⁵N »
- Tube Eppendorf de solution rouge « ADN ¹⁴N »
- Tube Eppendorf de solution jaune « ADN 1R » = résultat après un cycle sur milieu avec ADN ¹⁴N
- 7 Pipettes
- 1 marqueur



A. Créer un gradient de saccharose :

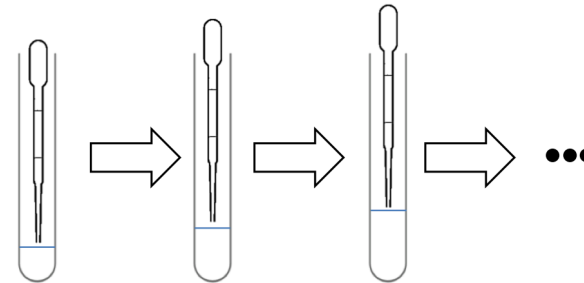
1. **Numéroter** les tubes de 1 à 3.
2. **Verser** 2 mL de solution de saccharose à 65 % dans chacun des 3 tubes. Pour cela, **tenir le tube à 45°** et faire couler doucement le liquide contre la paroi en verre.
3. **Verser** délicatement 2mL de solution de saccharose à 45 % dans chacun des 3 tubes. Pour cela, **tenir le tube à 45°** et faire couler doucement le liquide contre la paroi en verre. Cette solution doit rester au-dessus de la précédente. Il ne faut surtout pas les mélanger
4. **Verser** délicatement 2mL de solution de saccharose à 25 % dans chacun des 3 tubes. Pour cela, **tenir le tube à 45°** et faire couler doucement le liquide contre la paroi en verre. Cette solution doit rester au-dessus de la précédente. Il ne faut surtout pas les mélanger.
5. **Verser** délicatement 2mL de solution de saccharose à 0 % dans chacun des 3 tubes. Pour cela, **tenir le tube à 45°** et faire couler doucement le liquide contre la paroi en verre

B. Déposer les échantillons sur le gradient de saccharose

1. **Ajouter** délicatement dans le tube n°1, 0,5mL de solution bleue = tube témoin « ADN ¹⁵N ».
2. **Ajouter** délicatement dans le tube n°2, 0,5mL de solution rouge = tube témoin « ADN ¹⁴N ».
3. **Ajouter** délicatement dans le tube n°3, 0,5mL de solution jaune = tube « ADN 1R ».

ATTENTION :

- Cette manipulation exige beaucoup de **délicatesse**.
- Tenir le **tube droit** et déposer les solutions **goutte à goutte**
- A chaque dépôt, placer l'extrémité de la pipette juste au-dessus de la surface
- Les solutions doivent être **froides** pour que les colorants forment une bande nette.



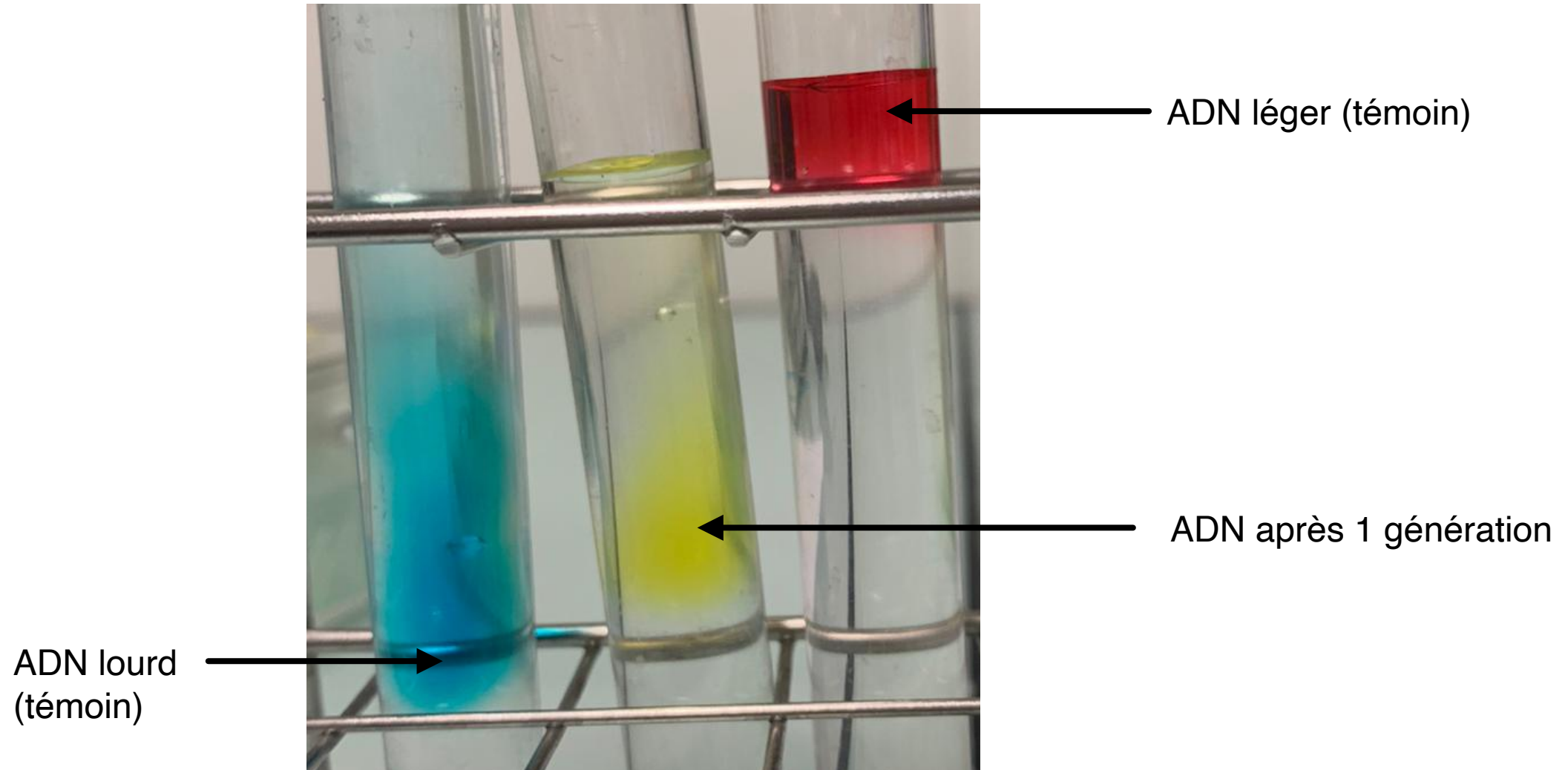
📞 Appelez le professeur pour vérification

C. Identifier le mode de réplication de l'ADN

4. A partir du résultat, déterminer si **une ou plusieurs hypothèses** peuvent être validées ou invalidées.
5. A partir du résultat au bureau du professeur, déterminer si **une ou plusieurs hypothèses** peuvent être validées ou invalidées.

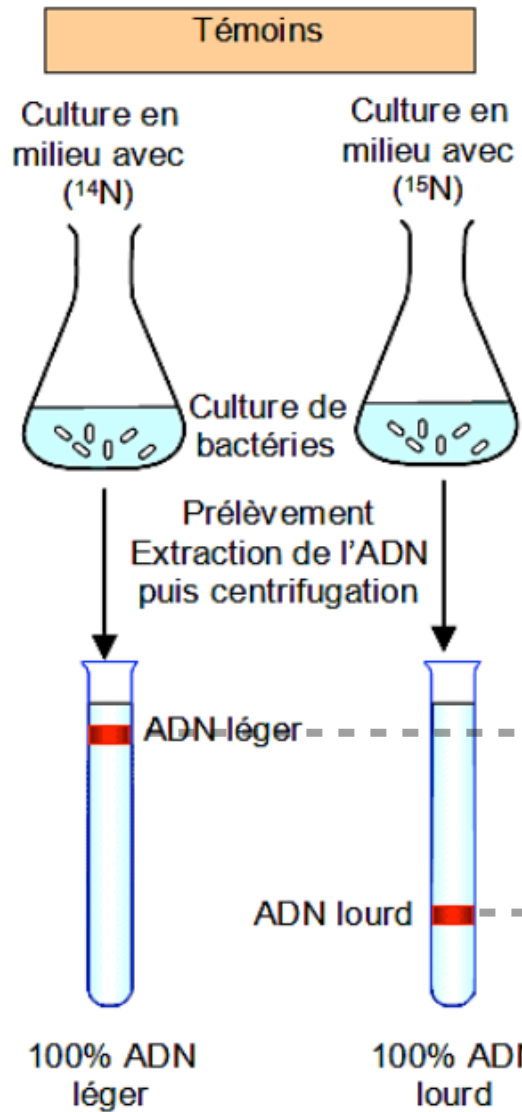
📞 Appelez le professeur pour vérification

Etape 2 : Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables

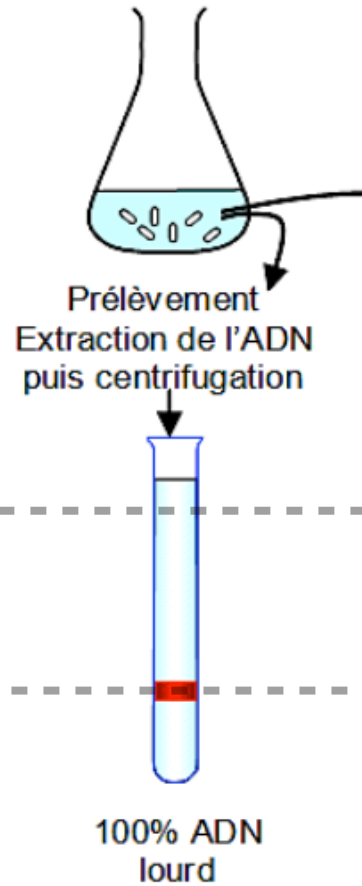


Photographie des résultats obtenus après une génération

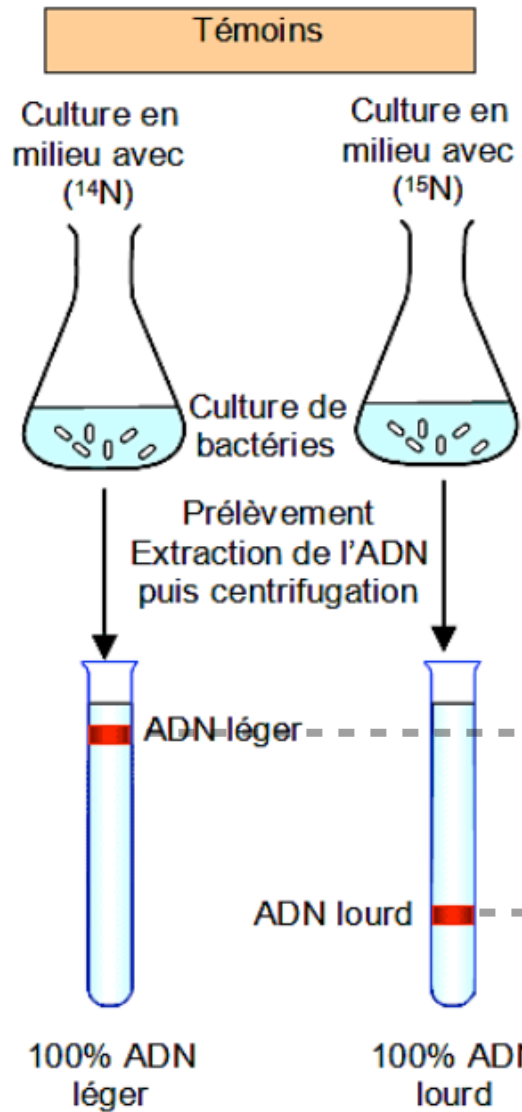
L'expérience de Meselson et Stahl



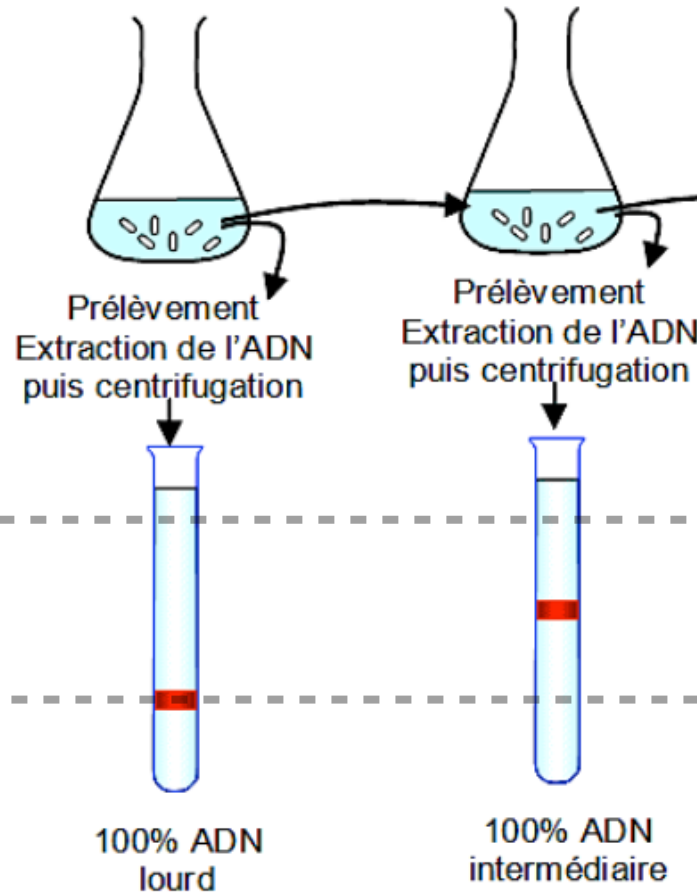
| Durée de culture | Nombreux cycles cellulaires | 1 cycle cellulaire | 2 cycles cellulaires | 3 cycles cellulaires |
|------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| Milieu | ^{15}N | | | |



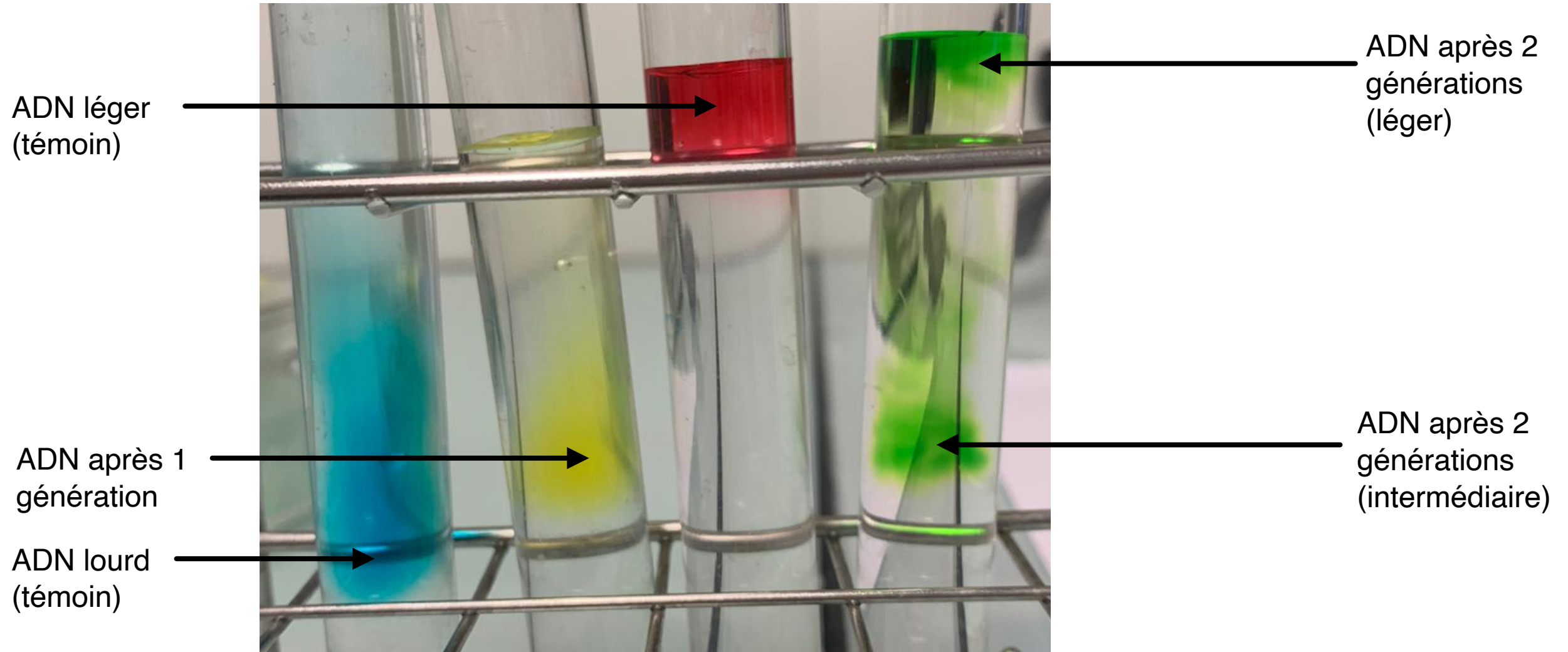
L'expérience de Meselson et Stahl



| Durée de culture | Nombreux cycles cellulaires | 1 cycle cellulaire | 2 cycles cellulaires | 3 cycles cellulaires |
|------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| Milieu | ^{15}N | ^{14}N | | |

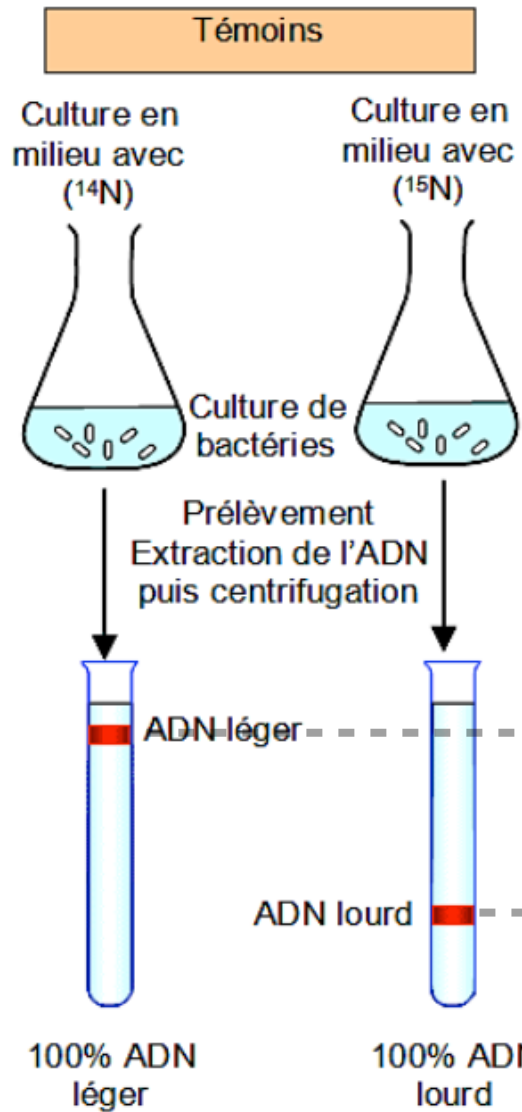


Etape 2 : Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables

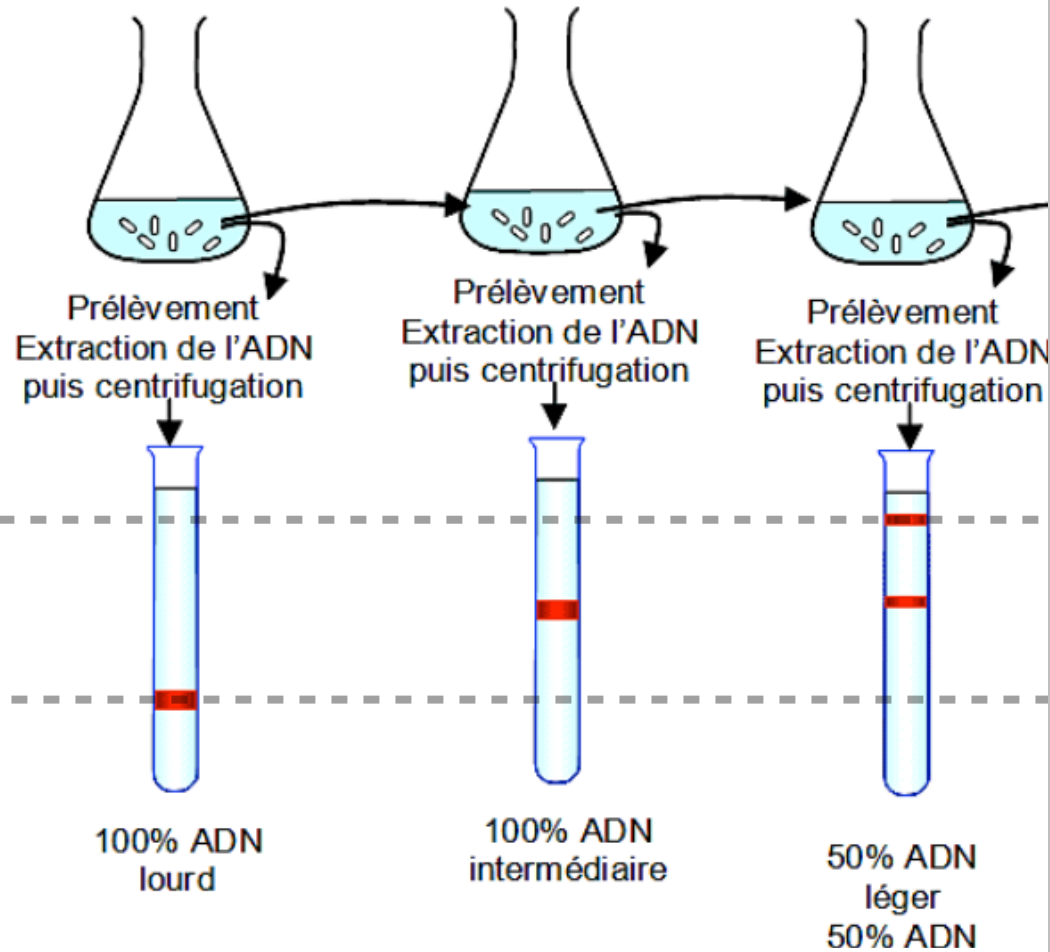


Photographie des résultats obtenus après deux générations

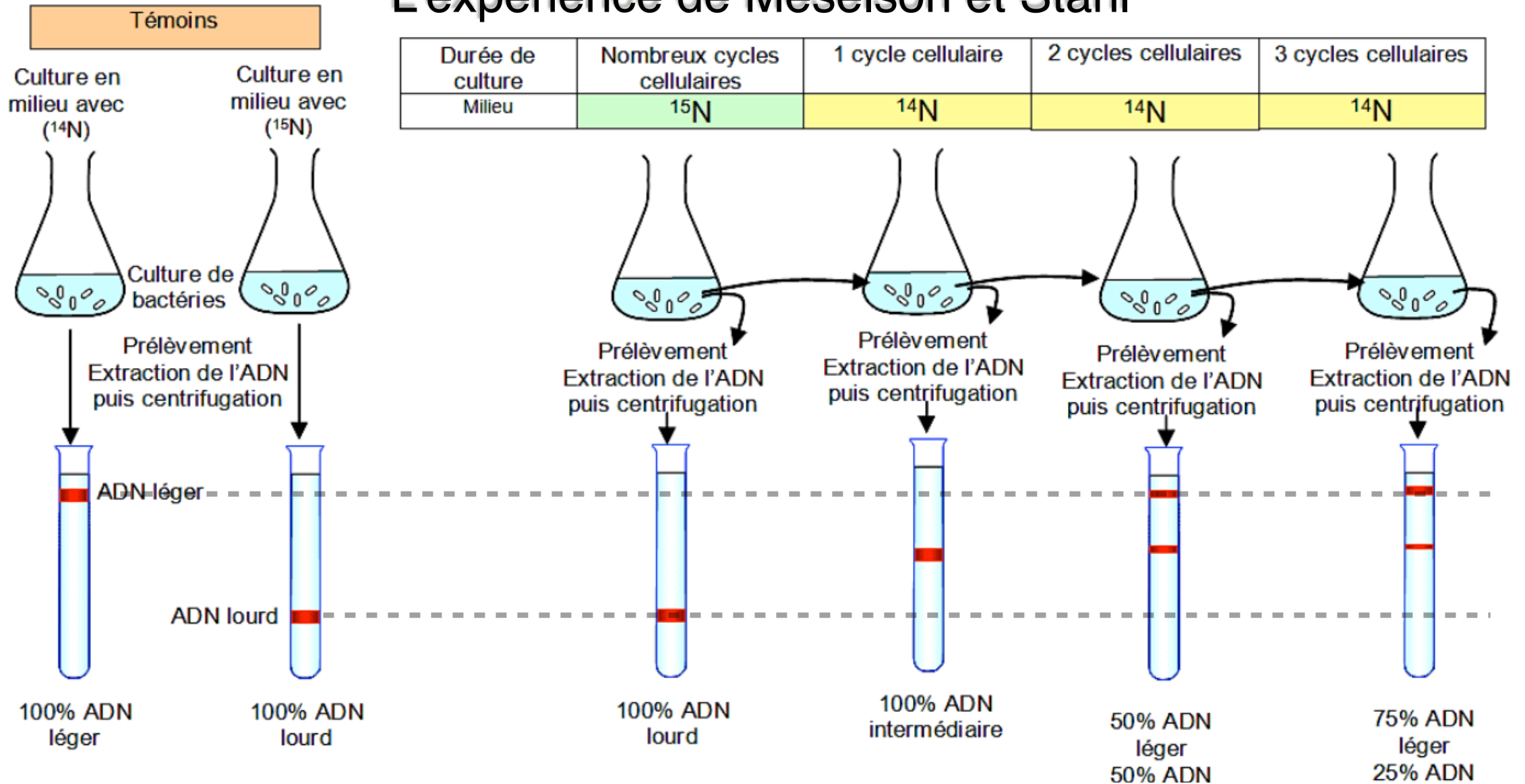
L'expérience de Meselson et Stahl



| Durée de culture | Nombreux cycles cellulaires | 1 cycle cellulaire | 2 cycles cellulaires | 3 cycles cellulaires |
|------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| Milieu | ^{15}N | ^{14}N | ^{14}N | |



L'expérience de Meselson et Stahl



Etape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer

Compléter le tableau n°2 :

- Schématisation des résultats attendus pour chaque hypothèse (**avec le code couleur imposé lors de l'étape 1**)
- Identification des proportions d'ADN lourd et d'ADN léger pour chaque étape et chaque hypothèse
- Validation ou réfutation des hypothèses grâce aux résultats des expériences obtenus + Celles du professeur

Etape 3 : Présenter des résultats pour les communiquer

Principe de l'expérience de Meselson et Stahl : Des bactéries sont cultivées sur un milieu ne contenant que de l'azote lourd (^{15}N , sachant que l'azote « naturel » est léger : ^{14}N). Leur ADN est donc composé avec des atomes d'azote lourd. Ces bactéries sont ensuite placées sur un milieu ne contenant que de l'azote léger ^{14}N . L'ADN maintenant synthétisé sera donc constitué d'azote ^{14}N , le seul présent dans le milieu. Les divisions des bactéries sont synchronisées.

NB : Dans les dessins que vous ferez dans le tableau, l'ADN lourd sera représenté en bleu tandis que l'ADN léger sera représenté en rouge

| Nom des hypothèses | ADN extrait de bactéries cultivées dans l'azote lourd | Transfert des bactéries dans un milieu contenant de l'azote léger | On extrait l'ADN des bactéries après les 1 ^{ère} et 2 ^{nde} réplifications : Schématisez les tubes des résultats attendus pour chaque hypothèse | | | Hypothèse validée ou réfutée |
|--------------------|---|---|---|--|--------------|------------------------------|
| | Génération 0 | | Génération 1 | | Génération 2 | |
| | | 1 ^{ère} réplication dans l'azote léger | | 2 ^{nde} réplication dans l'azote léger | | |
| Proportions | 100% d'ADN lourd | | | | | |
| | | | | | | |
| Proportions | 100% d'ADN lourd | | | | | |
| | | | | | | |
| Proportions | 100% d'ADN lourd | | | | | |

Tableau n°2 des résultats réels de l'expérience de Meselson et Stahl après deux générations de réplification

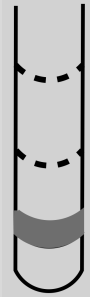
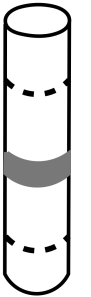
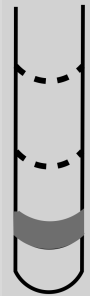
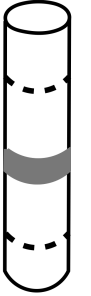
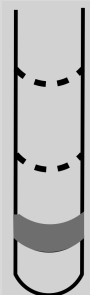
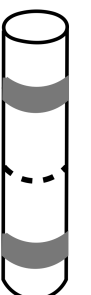
| Nom des hypothèses | ADN extrait de bactéries cultivées dans l'azote lourd | Transfert des bactéries dans un milieu contenant de l'azote léger | On extrait l'ADN des bactéries après les 1 ^{ère} et 2 ^{de} réplifications : Schématisez les tubes des résultats attendus pour chaque hypothèse | | | Hypothèse validée ou réfutée |
|--------------------|--|--|--|--|---------------------------------------|------------------------------|
| | Génération 0 | | Génération 1 | | Génération 2 | |
| Semi conservatif |  | 1 ^{ère} réplification dans l'azote léger |  | 2 ^{de} réplification dans l'azote léger | | |
| Proportions | 100% d'ADN lourd | | 100% ADN intermédiaire | | 50% ADN intermédiaire + 50% ADN léger | |
| Dispersif |  | |  | | | |
| Proportions | 100% d'ADN lourd | | 100% ADN intermédiaire | | 100% ADN intermédiaire | |
| Conservatif |  |  | | | | |
| Proportions | 100% d'ADN lourd | 50% ADN lourd + 50% ADN léger | 75% ADN lourd + 25% ADN léger | | | |

Tableau n°2 des résultats réels de l'expérience de Meselson et Stahl après deux générations de réplification

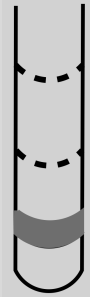
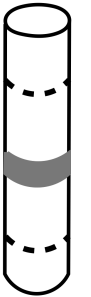
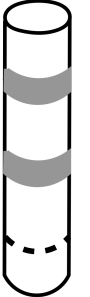
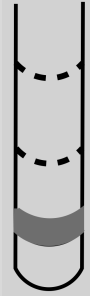
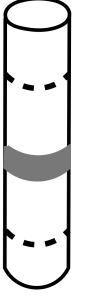

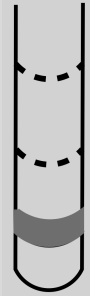
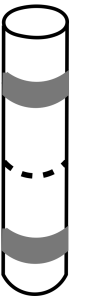
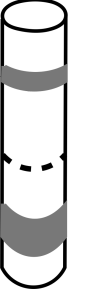
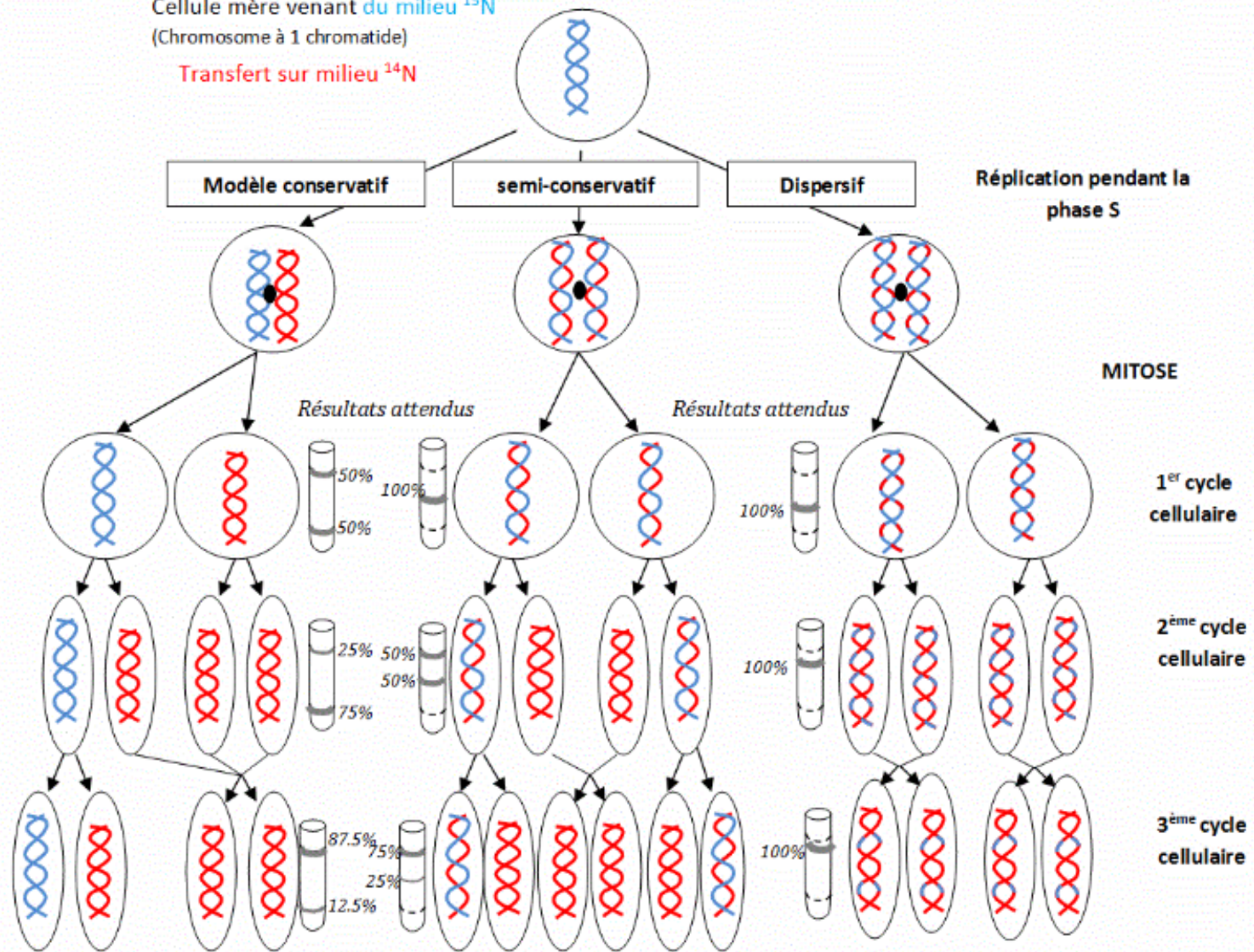
| Nom des hypothèses | ADN extrait de bactéries cultivées dans l'azote lourd | Transfert des bactéries dans un milieu contenant de l'azote léger | On extrait l'ADN des bactéries après les 1 ^{ère} et 2 ^{de} réplifications : Schématisez les tubes des résultats attendus pour chaque hypothèse | | | Hypothèse validée ou réfutée |
|--------------------|--|--|--|--|---|------------------------------|
| | Génération 0 | | Génération 1 | | Génération 2 | |
| Semi conservatif |  | 1 ^{ère} réplification dans l'azote léger |  | 2 ^{de} réplification dans l'azote léger |  | Validée |
| Proportions | 100% d'ADN lourd | | 100% ADN intermédiaire | | 50% ADN intermédiaire + 50% ADN léger | |
| Dispersif |  | |  | |  | Réfutée |
| Proportions | 100% d'ADN lourd | | 100% ADN intermédiaire | | 100% ADN intermédiaire | |
| Conservatif |  |  |  | Réfutée | | |
| Proportions | 100% d'ADN lourd | 50% ADN lourd + 50% ADN léger | 75% ADN lourd + 25% ADN léger | | | |

Tableau n°2 des résultats réels de l'expérience de Meselson et Stahl après deux générations de réplification

Cellule mère venant du milieu ^{15}N
(Chromosome à 1 chromatide)
Transfert sur milieu ^{14}N



Etape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème

Exploiter les résultats obtenus pour expliquer sous la forme d'un texte comment se déroule la réplication de l'ADN.

Texte :

Je vois que

Je sais que

J'en déduis que

Etape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème

Exploiter les résultats obtenus pour expliquer sous la forme d'un texte comment se déroule la réplication de l'ADN.

Je vois que dans le tube correspondant à la génération 1, il y a une seule bande d'ADN intermédiaire, et dans le tube correspondant à la génération 2, il y a deux bandes : une intermédiaire et une légère.

Je sais que d'après le tableau n°2, seul le modèle de réplication semi-conservatif prévoit ces résultats, tandis que les modèles conservatif et dispersif sont réfutés.

J'en déduis que la réplication de l'ADN est semi-conservative, c'est-à-dire que chaque molécule d'ADN formée conserve un brin parental et synthétise un nouveau brin.



Fin