

Corrigé type du TD N°01 de Biologie Moléculaire

Exercice 1 :

Différents facteurs influencent le comportement d'une molécule d'ADN bicaténaire dans une solution de NaCl 0,25M. Prenant ça en considération, Expliquer les observations suivantes :

1. La T_m augmente avec la taille de la molécule :

Plus la taille de l'ADN augmente plus le nombre des liaisons Hydrogène augmente et plus la température nécessaire à dénaturer cet ADN augmente.

2. La T_m diminue avec la diminution de la concentration du NaCl

Les sels stabilisent la structure de l'ADN ; leurs charges positives (dans ce cas Na^+) s'associent avec les charges négatives de l'ADN (issues du groupement phosphate).

Si la concentration en sel diminue, la stabilité de l'ADN diminue par répulsion entre charges négatives de l'ADN. De ce fait, des températures plus faibles sont capables de dénaturer cet ADN.

3. Quand la concentration de l'ADN est grande sa renaturation est plus rapide

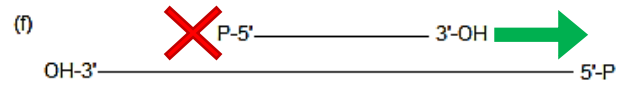
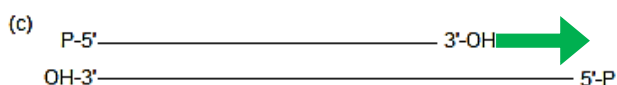
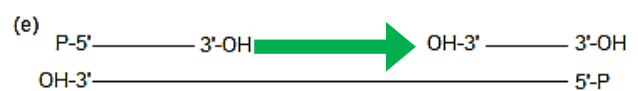
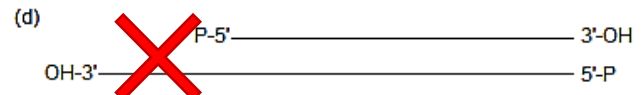
La grande concentration augmente la chance qu'un brin d'ADN rencontre son complémentaire et s'y hybride.

4. La valeur de T_m est réduite lorsque l'urée est ajoutée à la solution

L'urée est un agent chimique dénaturant l'ADN, elle rompt les liaisons hydrogène entre bases complémentaires. L'ajout de l'urée à l'ADN conduit à la diminution des liaisons hydrogènes entre les deux brins de l'ADN facilitant ainsi sa dénaturation, de ce fait, la T_m diminue.

Exercice 2 :

Soient les molécules d'ADN suivantes. Si chacune d'elles est mise en contact avec une ADN polymérase et les quatre désoxynucléosides triphosphates, dites si la synthèse se produit ou non dans chaque cas :



a) Pas de synthèse → absence d'une matrice d'ADN simple brin.

b) Pas de synthèse → absence d'une extrémité 3'-OH libre (amorce).

c) La synthèse se produit (dans le sens 5'→3' à partir de l'extrémité 3'-OH libre).

d) Pas de synthèse → absence d'une extrémité 3'-OH libre.

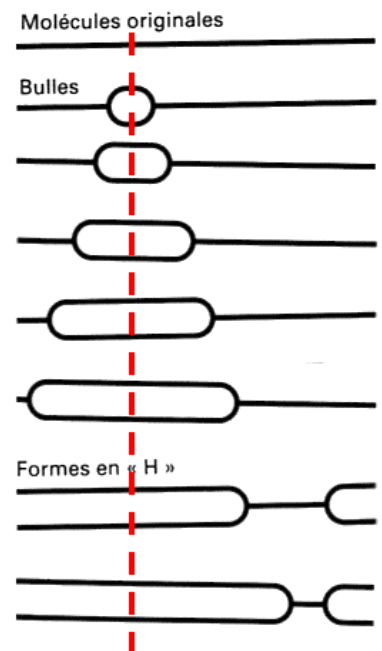
e) La synthèse se produit dans le sens 5'→3' à partir de l'extrémité 3'-OH de la gauche.

f) La synthèse se produit dans le sens 5'→3' seulement du côté droit à partir de l'extrémité 3'-OH libre.

Exercice 3 :

Le laboratoire que vous rejoignez étudie le cycle de vie d'un virus animal dont le génome est un ADN bicaténaire circulaire. Votre projet est de définir la localisation de(s) origine(s) de répllication et de déterminer si la répllication s'effectue d'une manière uni ou bidirectionnelle. Pour atteindre votre objectif, vous isolez des molécules

en cours de réplication, vous les coupez à l'aide d'une nucléase de restriction qui coupe l'ADN en un site unique produisant une molécule linéaire, et vous examinez les molécules résultantes au microscope électronique. Certaines molécules que vous observez sont schématisées dans la figure suivante (notez qu'il est impossible de distinguer une extrémité de l'ADN de l'autre en microscopie électronique) :



- Quelles seront vos conclusions concernant la réplication de cet ADN ?

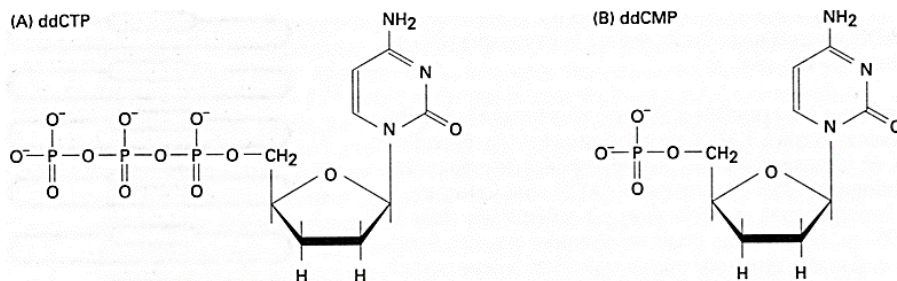
Si on réordonne les molécules d'ADN et on les réoriente (Voir schéma ci-contre) on constate que :

La réplication de cet ADN est bidirectionnelle, et il y a une seule origine de réplication

Il y a une seule bulle de réplication (une seule origine) et elle progresse dans les deux sens.

Exercice 4 :

Regardez attentivement les structures des molécules suivantes :



1. A votre avis, que se passerait-il si la didésoxycytidine triphosphate (ddCTP) était ajoutée à la réaction de réplication de l'ADN en large excès par rapport à la concentration de désoxycytidine triphosphate (dCTP) ?

Si la concentration du ddCTP est en large excès par rapport à la concentration du dCTP, la synthèse d'ADN s'arrête parce que les ddCTP seront utilisés presque exclusivement par l'ADN polymérase. Lorsqu'un didésoxynucléotide est incorporé dans la chaîne d'ADN en élongation la synthèse d'ADN s'arrête à cause de l'absence d'un OH en 3'.

2. Que se passerait-il si ddCTP était ajoutée à 10% de la concentration de CTP ?

Si la ddCTP est à 10%, la synthèse d'ADN se fera avec grand succès et l'interruption de la réplication ne se fait qu'à des taux faibles.

3. A votre avis, que se passerait-il si la didésoxycytidine monophosphate (ddCMP) était ajoutée à la réaction de réplication de l'ADN en large excès ou à 10% de la concentration de dCTP ?

Si la ddCMP est ajoutée (soit en faible quantités ou en large excès), il n'y aura aucun effet sur la synthèse d'ADN et toutes les molécules seront répliquées à 100%. Ceci est parce que l'ADN polymérase n'utilise comme substrats que les nucléotides triphosphate.

Exercice 5 :

1. Le chromosome d'*E. coli* contient 4,7 millions de paires de bases. Si la synthèse au niveau d'une fourche de réplication survient à une vitesse de 1000 paires de nucléotides par seconde, quel est le temps nécessaire pour répliquer le génome d'*E. coli* ?

- **Le chromosome d'*E. coli* contient une seule origine de réplication**
- **La réplication chez *E. coli* est bidirectionnelle, donc il y a deux fourches de réplifications qui progressent dans deux sens opposés. Dans chaque fourche il y a une machinerie de réplication (réplisome)**

- La vitesse de réplication = 1000 nucléotides/sec par fourche de réplication => donc si on considère les deux fourches, la vitesse de réplication est doublée, soit 2000 nucléotides/sec pour la molécule d'ADN entière.

Donc : le temps nécessaire à la réplication de cet ADN :

$$t = \frac{4,7 \cdot 10^6 \text{ pb}}{2000 \text{ pb/sec}} = 2350 \text{ sec} = 39,17 \text{ min}$$

2. Dites ce qui se passerait si un chromosome eucaryote (150 Mpb de long) possédait l'une des caractéristiques suivantes :

- a) Une origine unique de réplication au milieu du chromosome. (La réplication de l'ADN dans une cellule animale se fait à une vitesse d'environ 150 pb par seconde par fourche de réplication).

La taille de ce chromosome est de 150 Méga pb (= $150 \cdot 10^3$ Kilo pb = $150 \cdot 10^6$ pb). S'il y a une seule origine de réplication située au centre du chromosome eucaryote linéaire (avec deux fourches car la réplication est bidirectionnelle chez les eucaryotes) et la vitesse de réplication est de (150pb/sec X 2) = 300pb/sec (car il y a deux fourches de réplication), le temps nécessaire à réplique ce chromosome est de :

$$t = \frac{150 \cdot 10^6 \text{ pb}}{300 \text{ pb/sec}} = 0,5 \cdot 10^6 \text{ sec} = 138,88 \text{ heures} = 5,78 \text{ jours}$$

Dans cet exercice, les données concernant les tailles des chromosomes et les vitesses de réplication chez *E. coli* et chez les eucaryotes sont réelles. Donc, pour répliquer son chromosome, même avec une seule origine de réplication, la bactérie prend moins d'une heure. Les chromosomes eucaryotes sont beaucoup plus longs et la vitesse de leur ADN polymérase est plus lente. Donc, si on suppose qu'un chromosome eucaryote possède une seule origine de réplication comme chez les bactéries, sa réplication durerait presque 6 jours ! C'est pour ça que, pour réduire le temps de réplication, les chromosomes eucaryotes contiennent plusieurs origines de réplication.

Chez l'homme, la division cellulaire dure 16 à 24 heures (selon le type cellulaire), et la phase S (durant laquelle les chromosomes se répliquent) dure 6 à 20 heures (toujours selon le type cellulaire).

- b) Un télomère à une seule des deux extrémités du chromosome.

Les télomères sont des séquences non codantes conservées répétées présentes dans les extrémités des chromosomes eucaryotes linéaires. Le rôle des télomères est de protéger le chromosome linéaire du raccourcissement qui touche les extrémités à la fin de chaque cycle de réplication (c'est un problème rencontré uniquement dans le cas de la réplication des chromosomes linéaires).

Si ce chromosome eucaryote possédait un télomère à une seule extrémité, après chaque cycle de réplication, une seule extrémité du chromosome sera protégée alors que l'autre extrémité sera raccourcie. Après plusieurs cycles de réplication (après plusieurs divisions) le raccourcissement toucherait des régions importantes du chromosome et la cellule va mourir.

- c) Pas de centromère.

Le centromère contient des séquences non codantes. Ces séquences sont reconnues par les protéines du kinétochore qui permettent l'attachement des microtubules pour la formation du fuseau achromatique lors de la métaphase et donc participe à la séparation des chromatides et leur distribution équitable entre les cellules filles.

Donc, si un chromosome ne contient pas de centromère (ce chromosome est dit Acentrique), il ne pourra pas joindre le fuseau achromatique et il sera donc distribué au hasard dans les cellules filles. Donc il y aura une grande chance que les cellules filles ne contiennent pas le même nombre de chromosomes (une aura un de plus et l'autre un de moins).