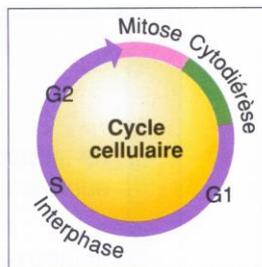


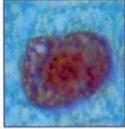
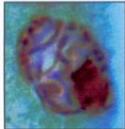
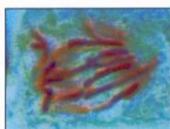
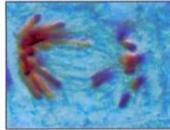
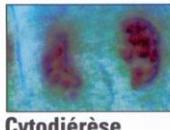
La réplication de l'ADN et la mitose

Rappel des différentes phases du cycle cellulaire et aspect des chromosomes

Le cycle cellulaire est constitué de trois étapes principales :

- l'interphase ;
- la mitose (prophase, métaphase, anaphase, télophase) ;
- la cytotédière, qui aboutit à la formation de deux cellules distinctes.



Échelle cellulaire	Échelle moléculaire	Quantité d'ADN cellulaire par cellule
Observation au microscope optique X 1 000 Cellule initiale $2n = 8$	observation au microscope électronique par transmission	
 Interphase G1 (5 h)	Fragment de chromatine (filament chromosomique)  X 100 000	1 UA (unité arbitraire)
 Interphase S (8 h)	Chromosome en duplication  X 100 000	Passage de 1 UA à 2 UA
 Prophase (2 h)	Chromosome à 2 chromatides  X 30 000	2 UA
 Métaphase (2 h)	Chromosome à 2 chromatides  X 20 000	2 UA
 Anaphase (1 h)	Chromosome à 1 chromatide  X 20 000	2 UA
 Téléphase (30 min)	Chromosome décondensé à 1 chromatide  X 30 000	2 UA
 Cytodiérèse	Cytodiérèse : obtention de deux cellules identiques ayant la même quantité de matériel génétique (ici, $2n = 8$) et la même quantité d'ADN. Chaque cellule retourne en interphase G ₁ .	1 UA

Évolution comparée des chromosomes (ici $2n = 8$) et de la quantité d'ADN d'une cellule de méristème d'apex racinaire au cours d'un cycle cellulaire (les durées sont indicatives).

Réalisation de préparations microscopiques de mitose

(d'après <http://www.didier-pol.net/3mitose.htm>)

La mitose ou division cellulaire est un mode de reproduction asexuée des cellules eucaryotes permettant leur multiplication. Elle conduit, à partir d'une cellule mère, à la formation de deux cellules filles identiques génétiquement, entre elles et avec la cellule mère, car au cours de ce processus, les chromosomes de la cellule mère sont dupliqués et répartis également entre les cellules filles. Chez les organismes pluricellulaires, c'est le principal facteur responsable de la croissance des tissus.

Pour observer aisément les différentes phases de la mitose et les chromosomes, il est préférable d'utiliser de jeunes organes en croissance dans lesquels les mitoses sont nombreuses. En outre, les cellules végétales étant généralement plus grosses que les cellules animales et donc plus faciles à observer au microscope et l'utilisation d'organes végétaux ne soulevant pas de problèmes éthiques, il est aussi préférable d'utiliser des organes végétaux. Un matériel biologique particulièrement adapté, facile à obtenir et peu coûteux est constitué par les jeunes racines obtenues à la base de bulbes de diverses plantes (ail, oignon, échalote, jacinthe).

Préparation

Pour obtenir le développement des racines en quelques jours (généralement 2 à 5 jours), il suffit de placer les bulbes quelques jours avant la manipulation sur un récipient rempli d'eau de façon à ce que le plateau du bulbe (sa base) baigne dans l'eau. Pour maintenir un niveau d'eau suffisant en dépit de l'évaporation, il suffit de rajouter chaque jour un peu d'eau dans les flacons. La croissance des racines est rapide, de l'ordre de quelques mm par jour. Elle résulte des mitoses qui se produisent dans le méristème racinaire, zone de croissance située dans la zone sub-apicale de la racine.

Le méristème forme une petite tâche visible à l'œil nu, proche de l'extrémité des racines. C'est la région qu'il convient de prélever pour réaliser la préparation.



Protocole

1. Prélever avec des ciseaux une jeune racine en croissance sur un bulbe. Couper le segment terminal à 5 mm de l'extrémité et le déposer sur une lame porte-objet. On doit observer près de l'extrémité le méristème qui forme une petite tache.
2. Recouvrir l'échantillon d'acide chlorhydrique à 1 mol.L⁻¹. Laisser agir 5 minutes pendant lesquelles l'acide hydrolyse le ciment pectique qui relie les parois cellulaires. Ceci facilitera ensuite la dissociation des cellules.
3. Enlever l'acide avec un essuie tout utilisé comme papier buvard en faisant attention de ne pas coller l'échantillon sur le papier.
4. Recouvrir l'échantillon d'une solution d'orcéine et laisser agir pendant 20 minutes.
5. Éliminer le colorant avec un essuie tout en faisant attention de ne pas entraîner l'échantillon.
6. Recouvrir d'une goutte d'acide acétique à 45 % et poser une lamelle couvre-objet.
7. Appuyer doucement sur la lamelle (attention, fragile !) pour aplatir l'échantillon de façon à former une couche monocellulaire en déplaçant légèrement la lamelle tout en appuyant pour provoquer la dissociation des cellules.

Résultats

L'identification des figures de mitose nécessite d'explorer soigneusement l'ensemble de la préparation car les cellules sont dissociées à la suite des traitements subis et le nombre de cellules en division par rapport au nombre total de cellules est faible.

Les clichés ci-dessous ont été réalisés avec un grossissement du microscope x 400 et un zoom numérique x 2.

Ils présentent dans l'ordre chronologique du déroulement les phases caractéristiques de la mitose, prophase, métaphase, anaphase, télophase. La plupart des clichés montrent aussi des cellules en interphase.



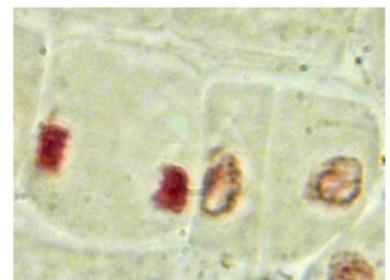
Interphase (en bas) et prophases



Interphase (à gauche) et métaphase



Anaphase (à gauche) et interphase



Télophase

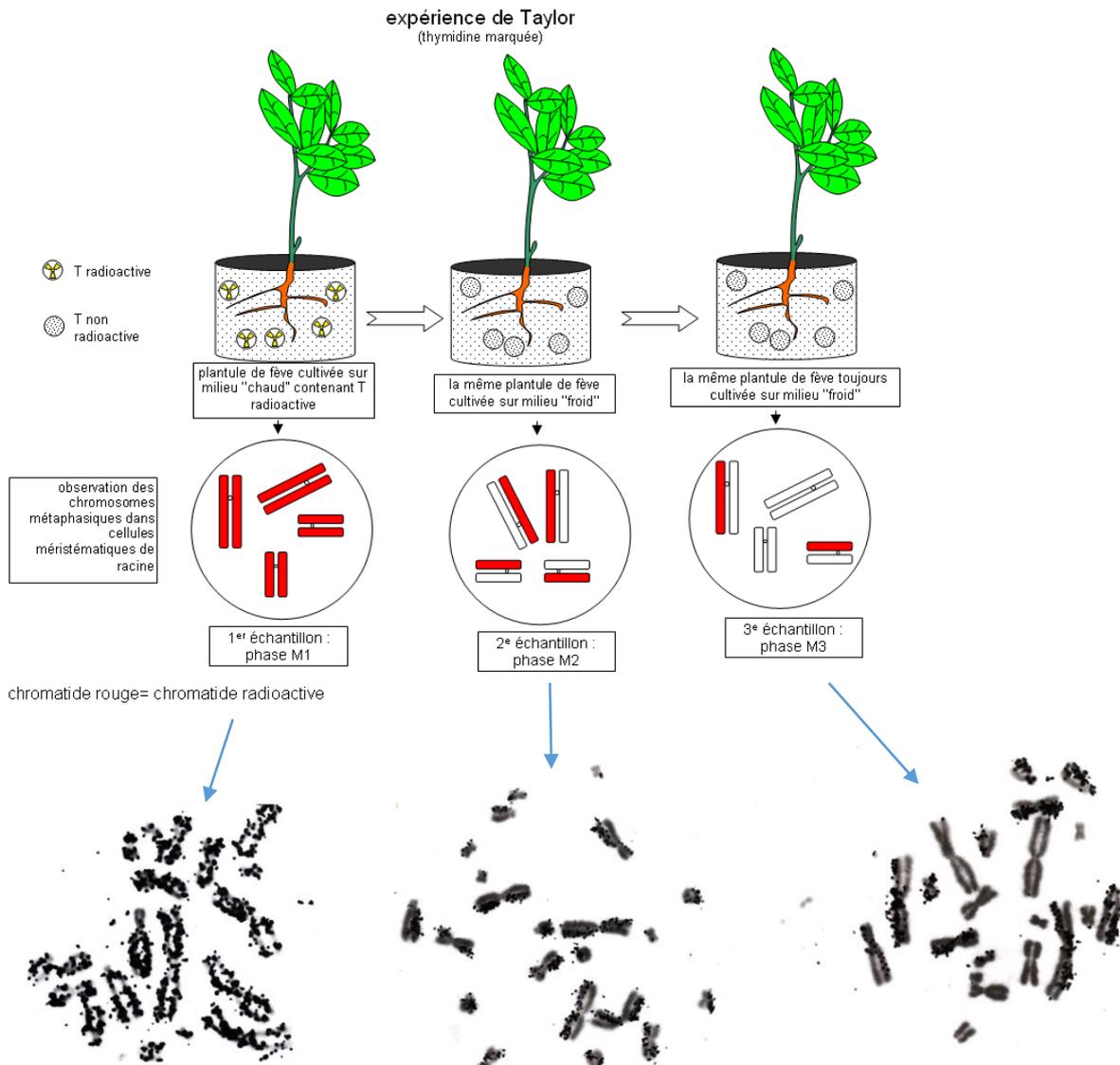
Protocole de l'expérience de Taylor (1957) :

La Jacinthe romaine (*Bellevalia romana*) est une plante dont les cellules se divisent à intervalles réguliers. De jeunes racines en croissance sont cultivées sur un milieu contenant de la thymine radioactive pendant tout l'intervalle de temps qui sépare deux mitoses successives (interphase). Les racines sont alors lavées puis placées dans un milieu contenant de la thymine non radioactive et enfin traitées à la colchicine (qui bloque les mitoses en métaphase) après 1, 2 ou 3 cycles cellulaires. Dans chaque cas on réalise une autoradiographie où la thymine radioactive est localisable par des points noirs.

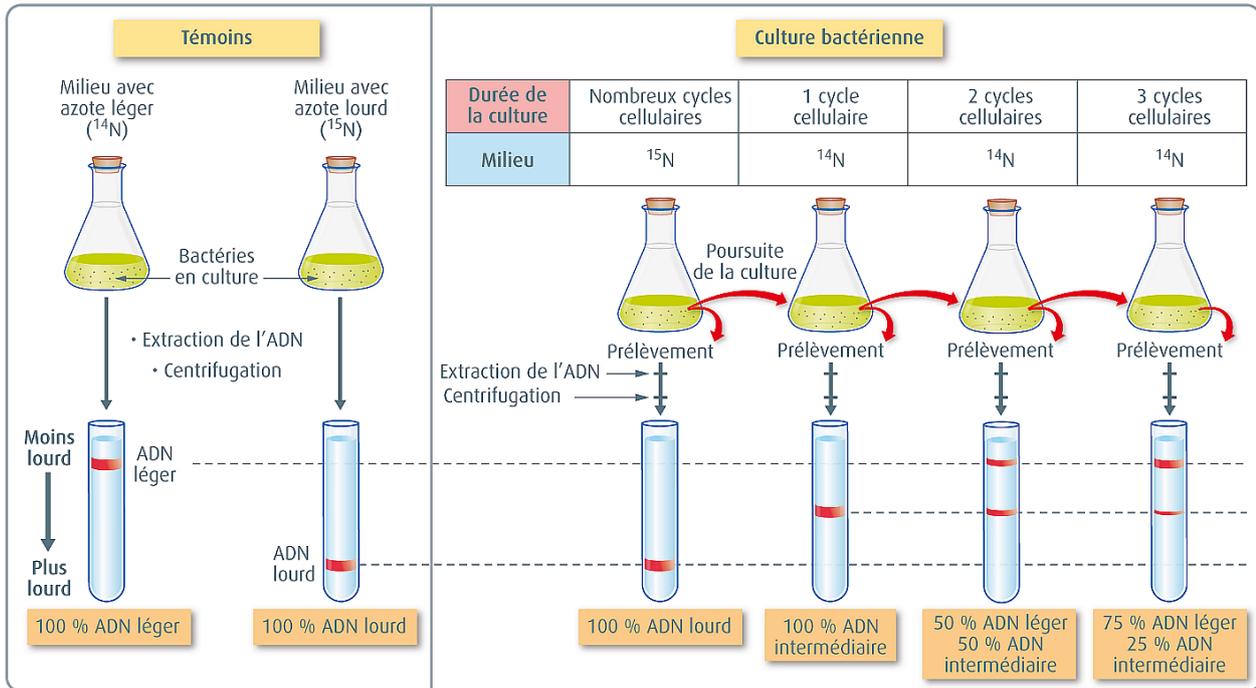
L'autoradiographie est une technique de laboratoire permettant de localiser des molécules sur une préparation microscopique. Les cellules sont ici cultivées en présence d'un nucléotide (par exemple la thymine) où des atomes d'hydrogène sont radioactifs. Les cellules incorporent ce substrat à leurs propres molécules d'ADN qui deviennent alors radioactives, on dit qu'elles sont marquées.

Avant chacun des clichés 1, 2 et 3, les cellules sont lavées de manière à éliminer toute trace de nucléotide radioactif non incorporé à une molécule d'ADN.

On réalise enfin une préparation microscopique que l'on dispose sur un film photographique argentique. Celui-ci est impressionné par le rayonnement radioactif. Après développement du film on observe des points noirs sur les clichés aux endroits où se trouvent les thymines marquées sur les molécules d'ADN.



Expérience de Meselson et Stahl (1958)

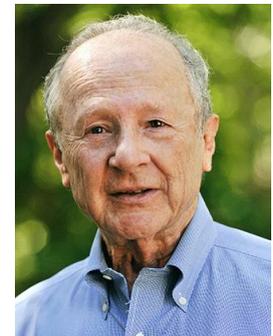


Principe et résultats de l'expérience. Les bactéries sont cultivées pendant de nombreux cycles dans un milieu enrichi en azote lourd (^{15}N) puis transférées dans un milieu enrichi en azote léger (^{14}N). À chaque réplication, l'azote, qu'il soit lourd ou léger, s'incorpore à l'ADN bactérien. Un échantillon de chaque culture est prélevé, puis l'ADN bactérien est extrait, placé dans un tube et centrifugé. Cela permet d'évaluer la proportion d'ADN « lourd » (avec ^{15}N), « léger » (avec ^{14}N) ou « mixte » (avec ^{14}N et ^{15}N): sous l'effet de la centrifugation, l'ADN forme une bande qui est localisée d'autant plus près du fond du tube que la molécule est lourde.

MESELSON MATTHEW (1930-)

Biologiste américain né le 24 mai 1930 à Denver (Colorado). Après avoir obtenu en 1957 son doctorat ès sciences au California Institute of Technology, il est nommé en 1960 professeur de biologie à Harvard. En 1968, il est élu à l'Académie des sciences des États-Unis.

Matthew Meselson est surtout connu pour les expériences qu'il effectue avec Franklin W. Stahl à partir de 1958. Dès 1964, Meselson et Stahl s'attachent à vérifier les prédictions du modèle élaboré par Watson et Crick en 1953 pour rendre compte du mécanisme de réplication de l'acide désoxyribonucléique (ADN). À l'époque, une question majeure se posait : comment les deux brins complémentaires de l'ADN sont-ils distribués dans les bactéries filles ?



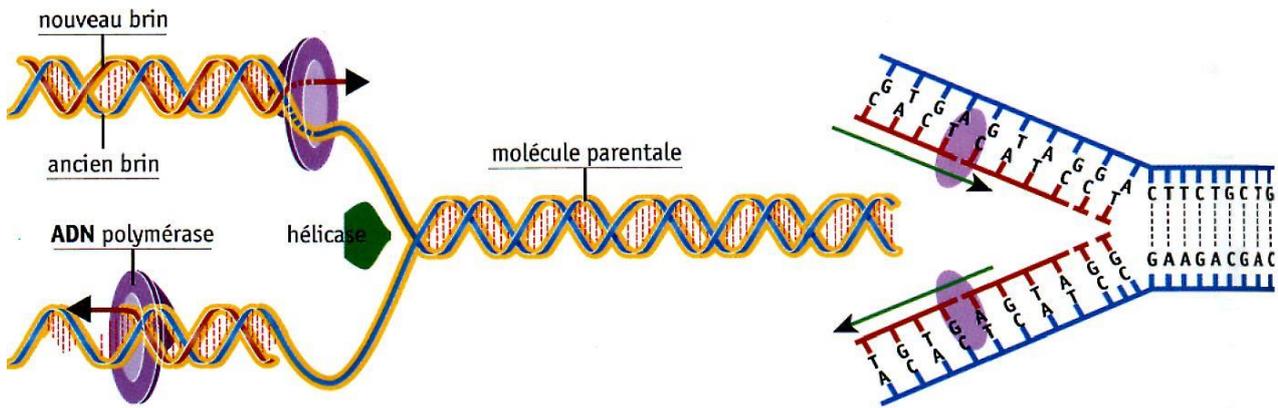
FRANKLIN WILLIAM STAHL (1929-)

En 1951, il reçut son bachelors à Harvard University. Par la suite, Stahl part entreprendre d'autres études à l'université de Rochester pour obtenir son diplôme. À peine après avoir fini son doctorat, Stahl poursuit un cours de Biologie Moléculaire à Woods Hole. C'est là que Stahl et Meselson se rencontrèrent.

En 1957, nos deux fervents scientifiques élaborèrent la technique de centrifugation. En effet, c'est grâce à cette technique qu'ils ont pu prouver le mode de réplication bien défini de l'ADN. C'est un an après, en 1958, que l'article de Meselson et Stahl parut.



La réplication de la molécule d'ADN



Photographie d'un œil de réplication (MET). Les flèches indiquent des "fourches" de réplication, autrement dit la position des complexes enzymatiques nommés "ADN polymérase".

