

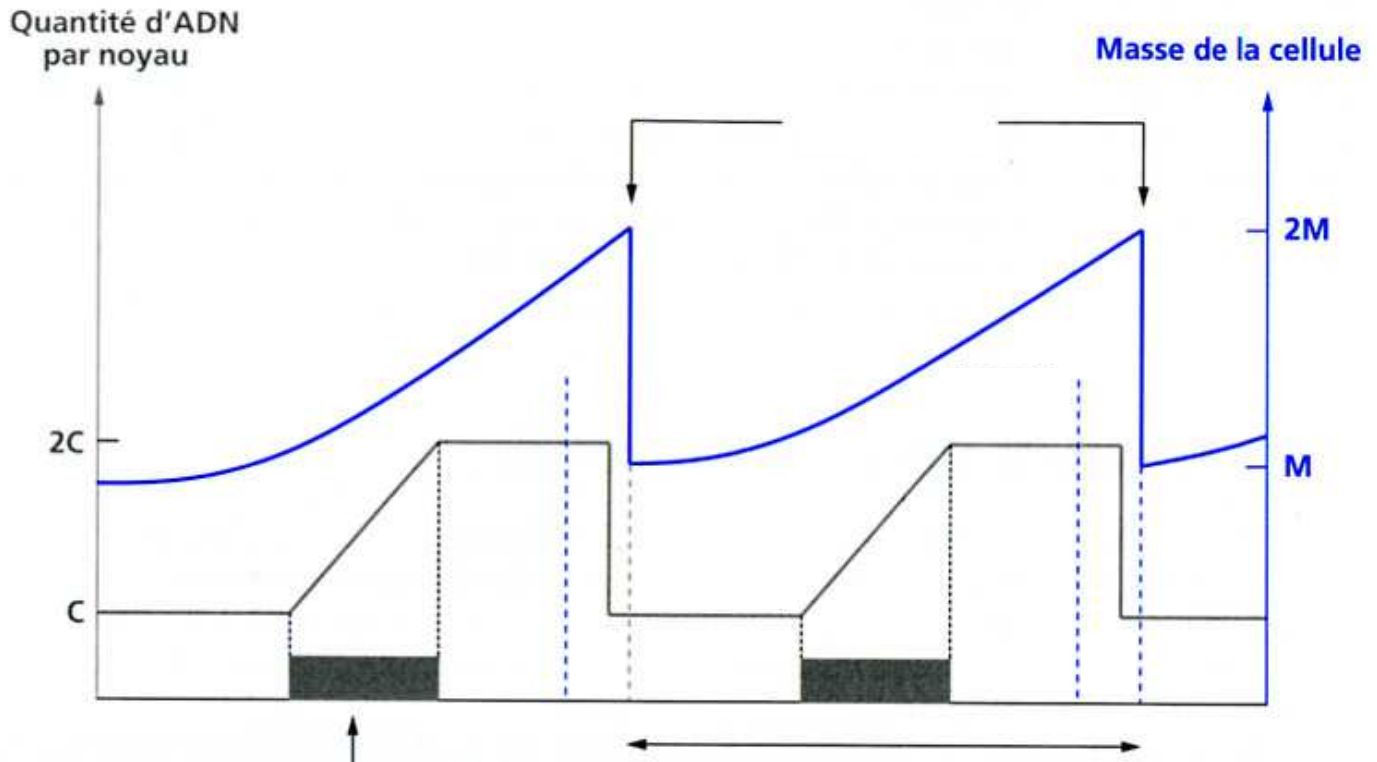
THÈME IV – TP: CHROMOSOMES ET MITOSE.

La **division cellulaire** désigne le mécanisme par lequel une cellule se reproduit. Elle comprend :

- la répartition de l'information génétique
- la répartition des constituants cellulaires

L'ensemble des étapes permettant de passer d'une génération de cellules à la suivante correspond au **cycle cellulaire**.

CYCLE CELLULAIRE D'UNE CELLULE EUCARYOTE



On s'intéresse dans un premier temps à la phase M de cellules eucaryotes, durant laquelle ADN et constituants cellulaires sont répartis dans les 2 cellules filles par les processus de **mitose** et **cytotéière**.

Rq : Au sens strict, la mitose désigne seulement les événements chromosomiques mais le terme mitose est parfois employé au sens large pour définir l'ensemble de la division cellulaire.

Les premières descriptions cytologiques de la mitose datent de la fin du 19^{ème} siècle, par W Flemming.

I. Etude de la phase M.

Objectif : identifier les différentes phases de la mitose et décrire les principaux événements de la phase M.

A) Réalisation de préparations microscopiques : observation de figures de mitose végétale.

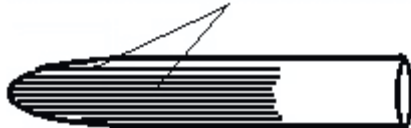
Pour observer aisément les différentes phases de la mitose et les chromosomes, il est préférable d'utiliser de **jeunes organes en croissance** dans lesquels les mitoses sont nombreuses. On travaille plutôt sur des **cellules végétales** car elles sont généralement **plus grosses** que les cellules animales et donc plus faciles à observer.

L'observation est réalisée à partir de cellules **d'apex racinaire** d'ail. Cet apex racinaire contient la zone méristématique (repérable à l'œil nu par une tache foncée) responsable de la croissance de la racine.

Protocole de coloration au **carmin acétique** : *IRRITANT POUR LES VOIES RESPIRATOIRES*

- Prélever délicatement l'extrémité (= 2-3 mm) de quelques racines d'ail ou d'oignon et les **dilacérer** dans la longueur à l'aide de 2 épingles.

Inscisions effectuées à la lame de rasoir



- Placer ces échantillons dans un creuset contenant du **carmin acétique** *SOUS HOTTE*. Faire **bouillir** au-dessus du bec électrique pendant 3 min en remuant le creuset (l'acide acétique fixe les cellules, le carmin colore les noyaux). *ATTENTION AUX PROJECTIONS – UTILISER DES LUNETTES*
- Verser le contenu du creuset dans un verre de montre puis transférer les pointes de racine dans une goutte de **carmin acétique froid** sur une lame de verre pendant 5 minutes.
- Monter entre lame et lamelle. Observer immédiatement.

Protocole de coloration au **bleu de toluidine** :

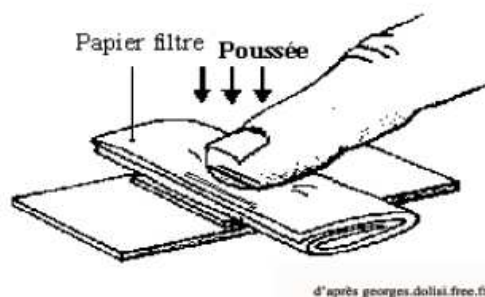
- Prélever délicatement l'extrémité (= 2-3 mm) de quelques racines d'ail ou d'oignon.
- Placer ces échantillons pendant **5 minutes** dans une cupule contenant **HCl** à 1 mol/L (l'acide hydrolyse le ciment pectique qui relie les parois cellulaires, facilitant ainsi la dissociation des cellules).
- **Rincer** l'échantillon à l'eau distillée.
- **Dilacérer** l'échantillon dans la longueur à l'aide de 2 épingles.
- Monter entre lame et lamelle dans une goutte de bleu de Toluidine et reposer la lamelle puis écraser **douxment** les échantillons. Rajouter du bleu de toluidine sous la lamelle si besoin. Observer immédiatement.

Protocole de coloration à l'**orcéine** :

- Prélever délicatement l'extrémité (= 2-3 mm) de quelques racines d'ail ou d'oignon.
- Placer ces échantillons pendant **5 minutes** dans une cupule contenant **HCl** à 1 mol/L (l'acide hydrolyse le ciment pectique qui relie les parois cellulaires, facilitant ainsi la dissociation des cellules).
- **Rincer** l'échantillon à l'eau distillée.
- **Dilacérer** l'échantillon dans la longueur à l'aide de 2 épingles.
- Recouvrir l'échantillon d'une solution **d'orcéine acétique** et laisser agir pendant **15 min** (l'orcéine colore principalement les chromosomes et facilite donc leur repérage).
- Eliminer le colorant avec un essuie-tout en faisant attention à ne pas entraîner l'échantillon.
- Recouvrir d'une goutte d'acide acétique à 45 % et poser une lamelle. Observer immédiatement.

Pour faciliter l'observation de couches cellulaires fines :

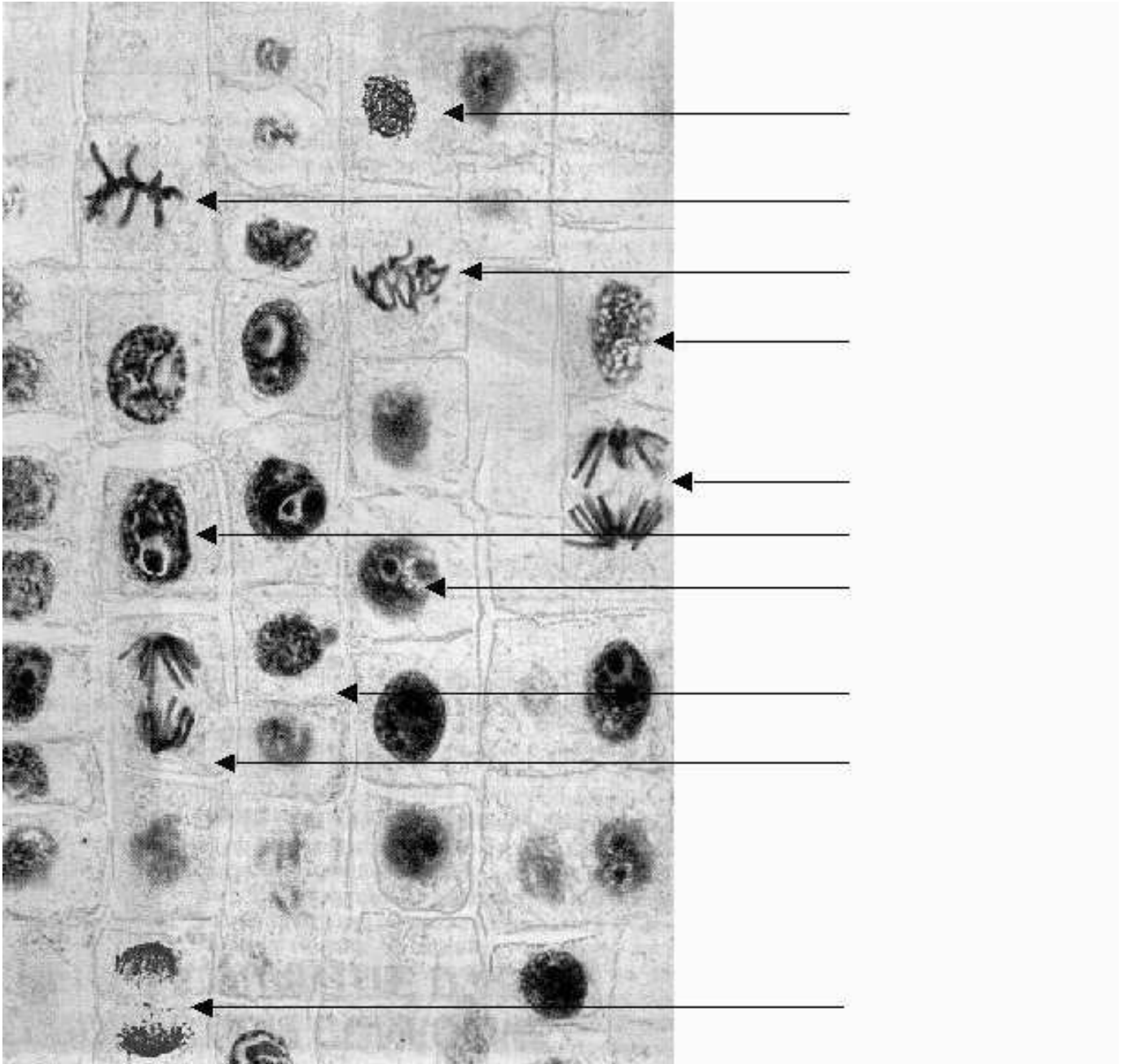
Appuyer **douxment** sur la lamelle pour aplatir l'échantillon de façon à former une couche monocellulaire. Puis déplacer légèrement la lamelle tout en appuyant pour dissocier les cellules.



Observations et interprétation :

- Repérer les phases de la mitose dans la préparation.
- Légender les clichés.
- Rajouter une échelle.

OBSERVATION D'UNE COUPE LONGITUDINALE D'APEX RACINAIRE D'AIL (MICROSCOPIE OPTIQUE)



B) Observation de figures de mitose animale.

1. Observation en microscopie optique : lames commerciales d'œufs d'Ascaris.

L'Ascaris est un ver nématode parasite de l'intestin d'humain ou d'animaux carnivores. On observe des cellules œufs en phase de division (segmentation)

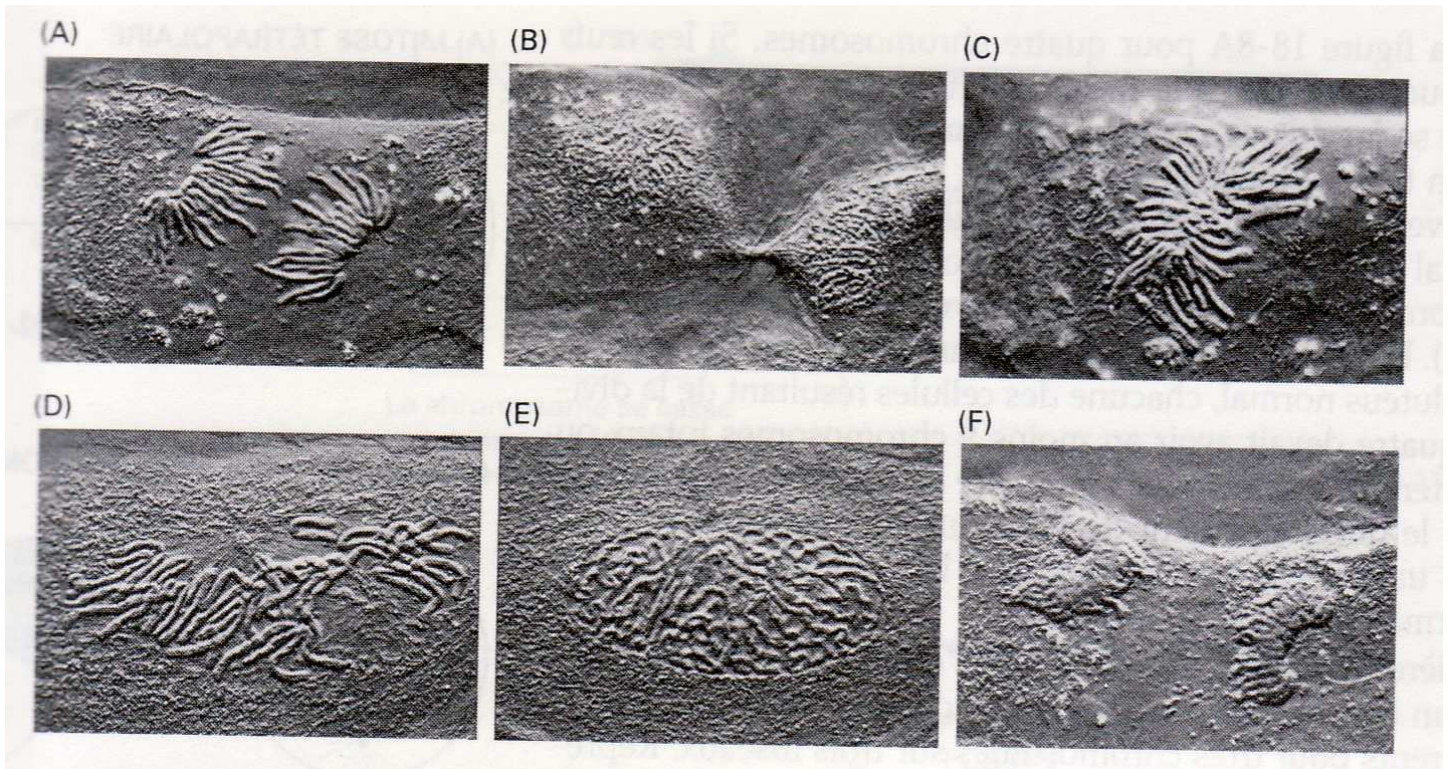
- Repérer les phases visibles de mitose sur les lames.

2. Observation en microscopie à contraste de phase.

Une cellule vivante d'épithélium pulmonaire de triton est montrée à différentes étapes de la phase M dans les figures ci-dessous. Ces clichés ont été obtenus en **microscopie à contraste de phase** : lorsque la lumière traverse des structures cellulaires denses (noyau, chromosome), elle est retardée par rapport à la lumière qui traverse les structures moins denses (cytosol). Le contraste entre ces deux flux de lumière donne une image de la cellule. Cette technique permet ainsi d'observer des cellules vivantes sans coloration.

- Ordonner ces micrographies photoniques selon la chronologie correcte et identifier chacune des étapes.

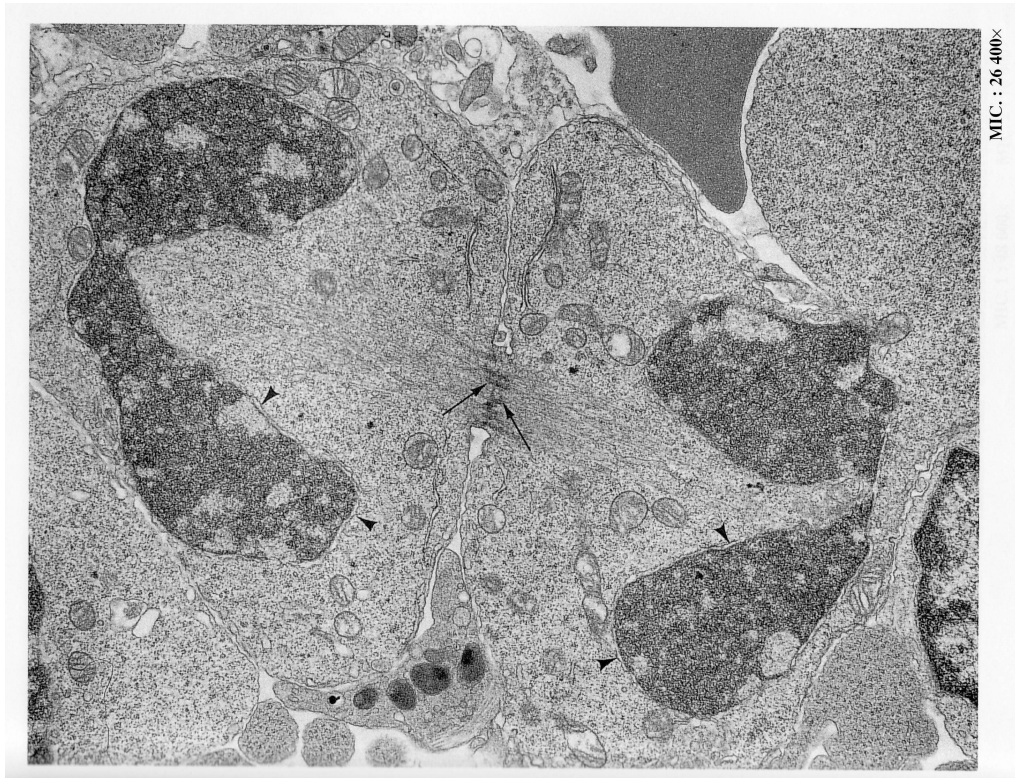
OBSERVATION DE CELLULES EPITHELIALES EN DIVISION PAR MICROSCOPIE A CONTRASTE DE PHASE



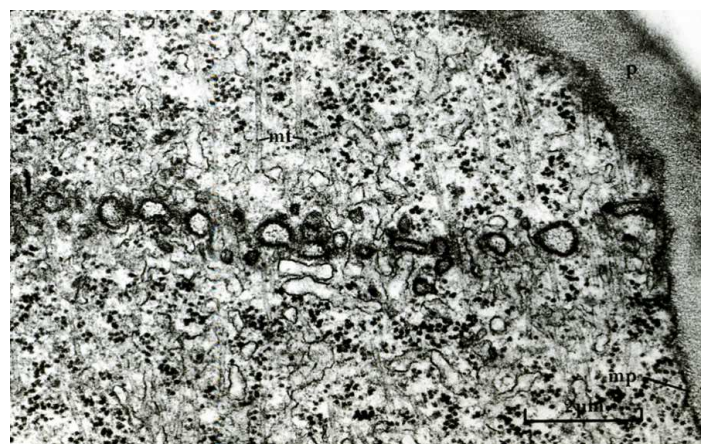
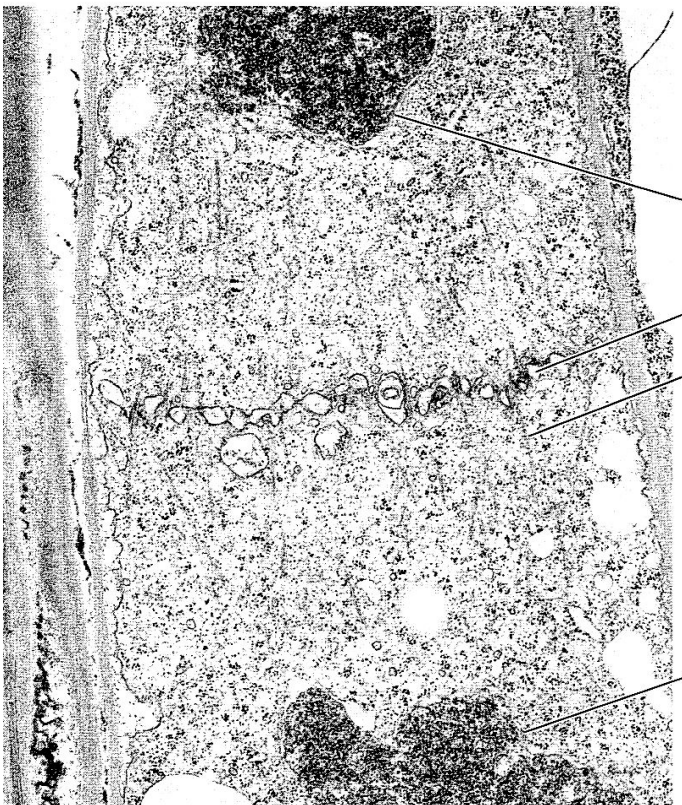
C) La cytotdiérèse : répartition des constituants cellulaires.

A l'aide des différentes observations vidéos et des clichés ci-dessous (à légender), décrire les particularités de la cytotdiérèse animale et végétale.

CLICHE DE MET DE CELLULE ANIMALE EN COURS DE CYTOCINESE



CLICHES DE MET DE CELLULE VEGETALE EN COURS DE CYTOCINESE (GAUCHE : VUE D'ENSEMBLE ; DROITE : DETAIL)



II. Caractéristiques cellulaires de la mitose.

A) Organisation du chromosome métaphasique.

A l'aide des documents ci-dessous, proposer un modèle d'organisation du chromosome métaphasique sous forme de schéma.

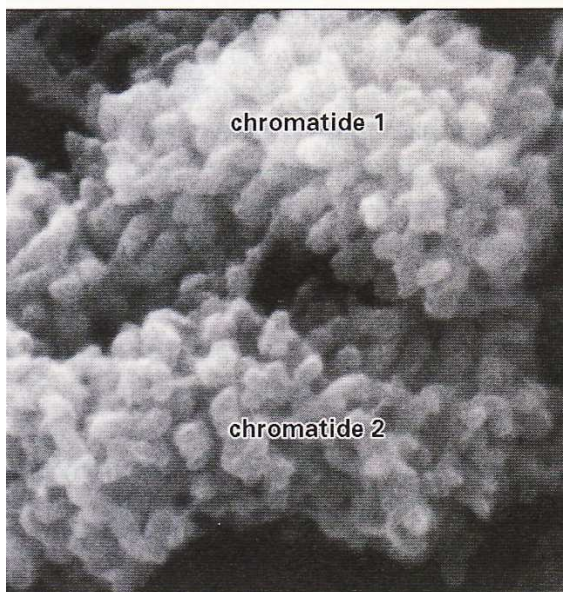
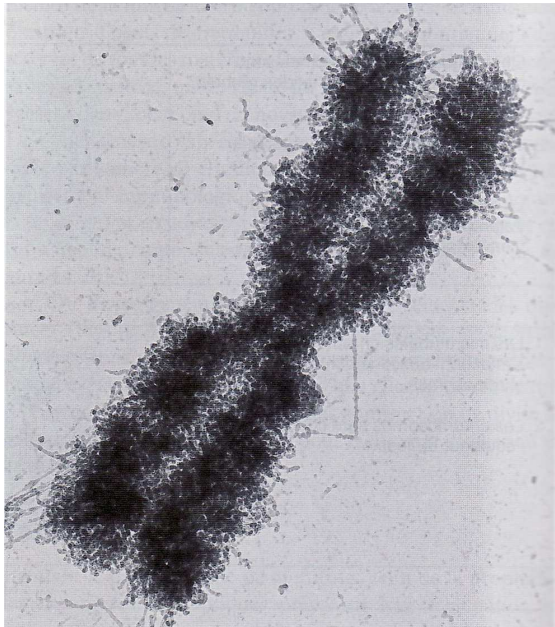
DOC 1. OBSERVATION DU CHROMOSOME METAPHASIQUE.

A. Clichés de ME de chromosome métaphasique.

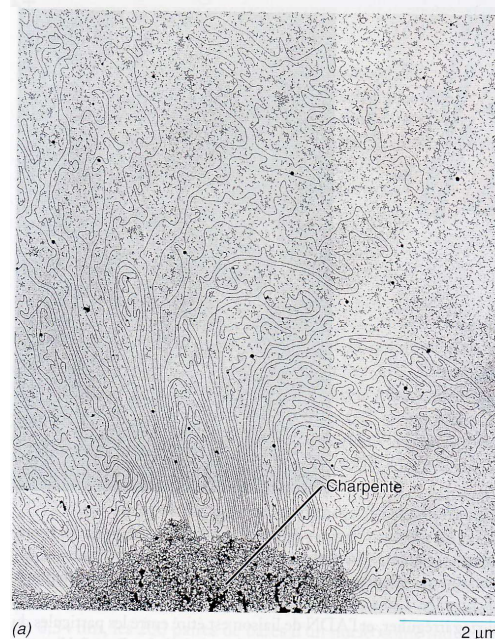
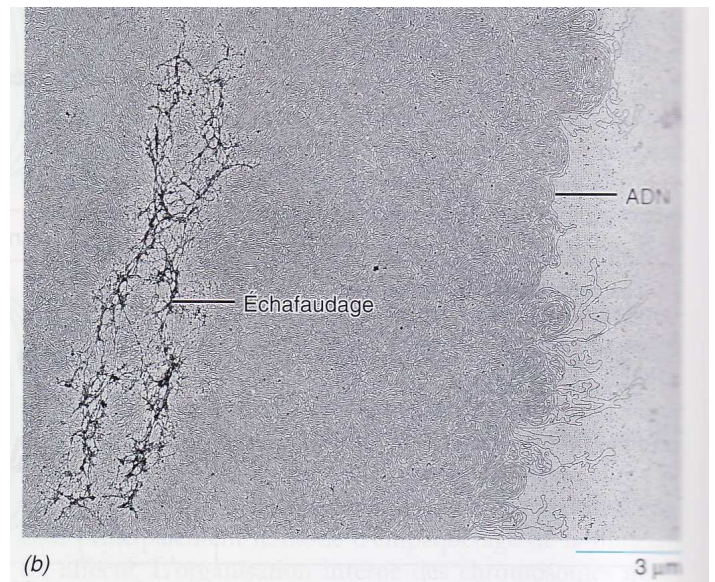
Haut : chromosome métaphasique entier. Les fibres rayonnant depuis l'axe de la chromatide ont un diamètre de 30nm, semblable au diamètre des boucles radiales trouvées dans les chromosomes interphasiques. *Karp*

Bas : détail d'une région proche d'un télomère. Chaque protubérance ou microconvule, correspond à une boucle distincte. *Alberts*

B. Aspect d'un chromosome métaphasique après l'élimination des histones et de la plupart des protéines non histones. Les protéines résiduelles forment un échafaudage dont on voit émerger des boucles d'ADN. Haut : vue d'ensemble. Bas : détail. *Karp*



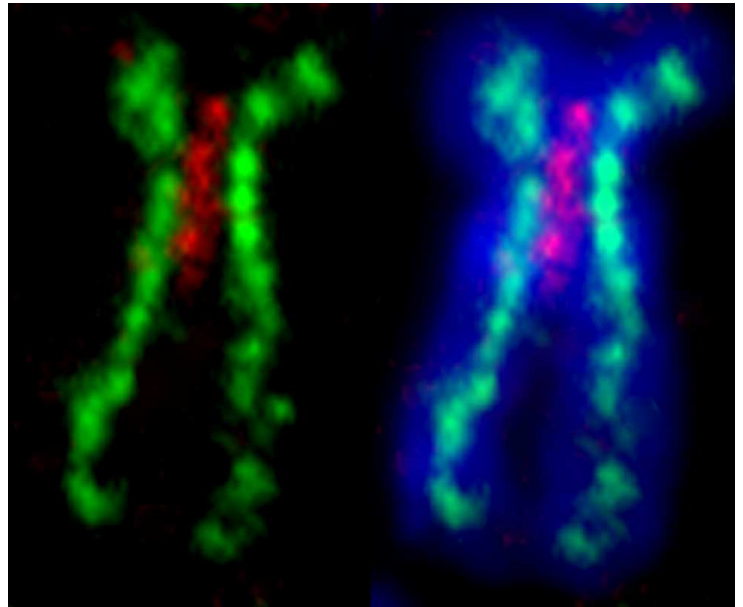
A



B

DOC 2. IMMUNOMARQUAGE D'UN CHROMOSOME METAPHASIQUE.

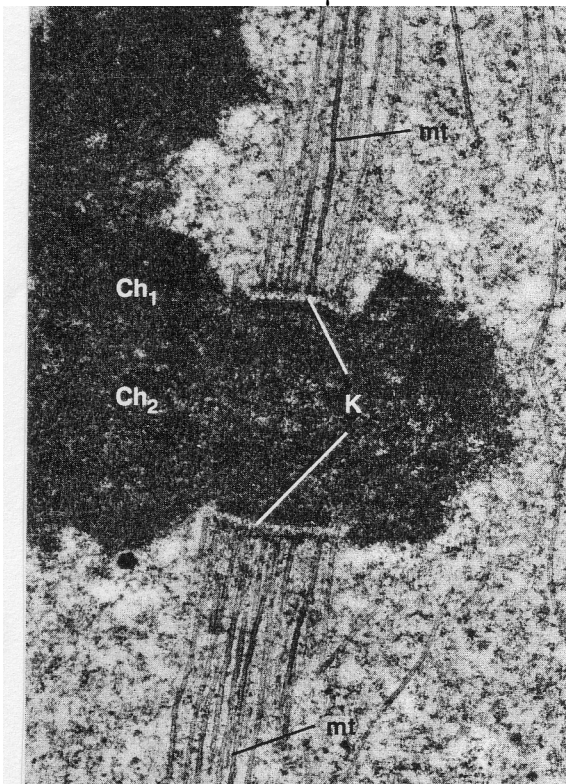
Immunomarquage à l'aide d'anticorps anti-cohésine en rouge et anti-condensine en vert. Sur le cliché de droite, on a superposé aux immunomarquages une coloration de l'ADN en bleu par le DAPI.



DOC 3. OBSERVATION DU CENTROMERE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

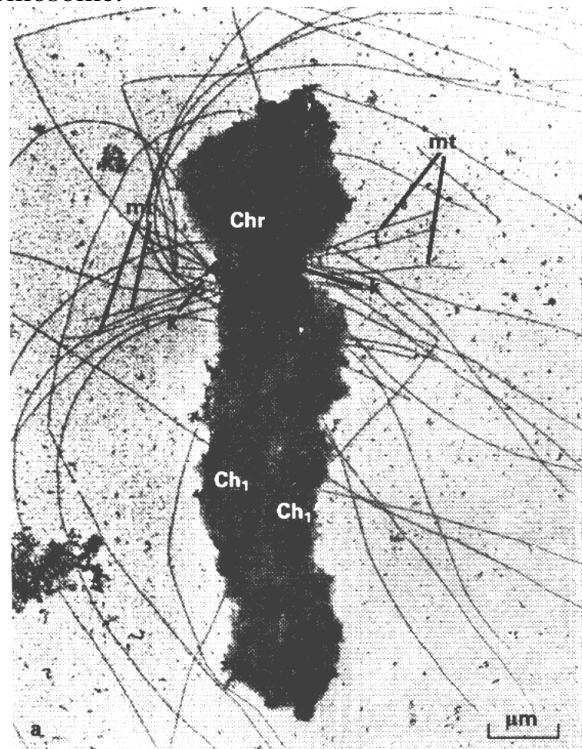
Observation en détail du centromère en MET.

1 µm



Chromosome métaphasique isolé puis incubé dans un milieu contenant des molécules de tubuline.

Ch1 = chromatides, mt= microtubule, chr = chromosome.



B) Organisation et dynamique du fuseau de division.

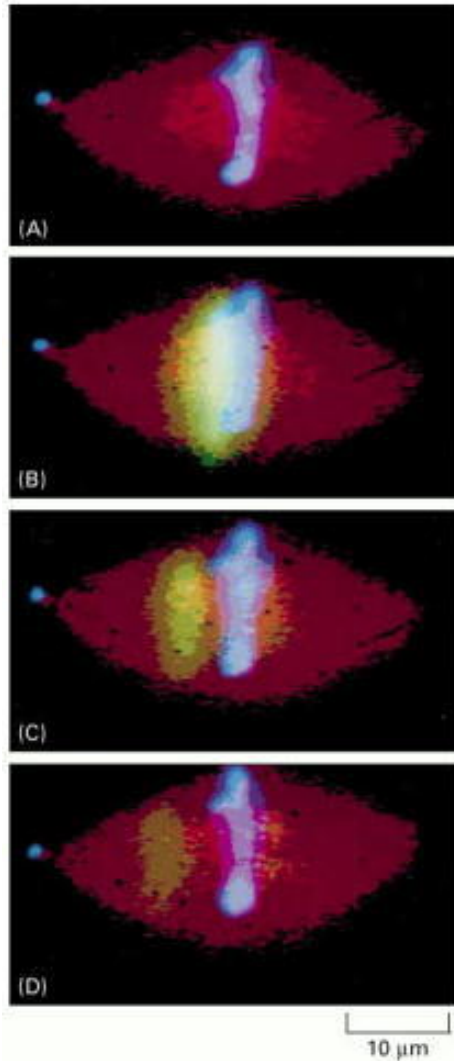
La dynamique du fuseau de division est étudiée par la technique de **photoactivation** (doc 4).

Principe : le fuseau de division est marqué avec 3 marqueurs fluorescents :

- ADN marqué en bleu (colorant DAPI)
- tubuline marquée à la rhodamine (rouge) et marquée par de la fluorescéine (jaune ou verte) piégée, c'est-à-dire non fluorescente tant qu'elle n'est pas activée par des rayons UV.

DOC 4 – ETUDE DE LA DYNAMIQUE DU FUSEAU MITOTIQUE EN METAPHASE PAR PHOTOACTIVATION. *Alberts 2002*

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26934>



Clichés en microscopie optique à fluorescence :

A : avant photoactivation

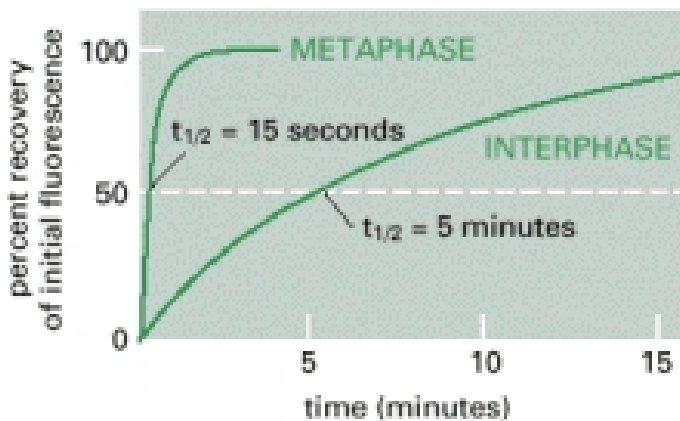
B : A $t=0$, un rayon d'ultraviolets photoactive les tubulines situées juste à gauche de la plaque métaphasique.

C : même observation à $t=1,5$ min

D : même observation à $t=2,5$ min

1. Présenter la technique de photoactivation à l'aide d'un schéma à l'échelle moléculaire.
2. Légender le cliché A du document 4.
3. Analyser et interpréter les résultats.

DOC 5 – COMPARAISON DE LA DYNAMIQUE DES MICROTUBULES EN METAPHASE ET EN INTERPHASE.



Toutes les molécules de tubuline sont marquées avec un fluorochrome.

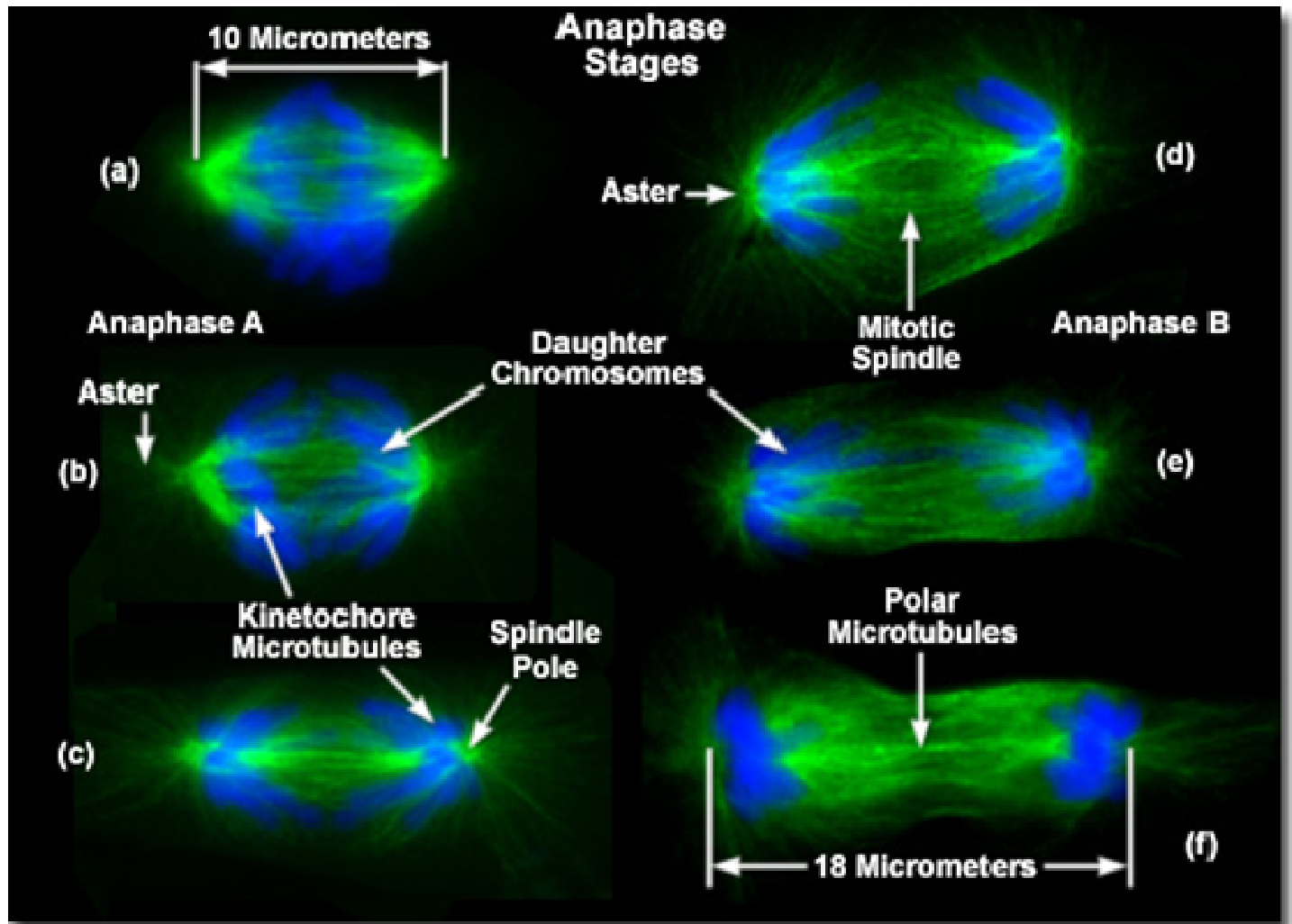
Un faisceau laser détruit les fluorochromes dans une petite région de la cellule (**photoblanchiment**). La récupération de fluorescence dans cette petite région photoblanchie est mesurée au cours du temps.

La même technique de photoblanchiment de tubuline est appliquée à des cellules en métaphase et des cellules en interphase. On mesure ensuite la récupération de fluorescence au cours du temps.

4. Présenter la technique utilisée dans le document 5 à l'aide d'un schéma à l'échelle moléculaire
5. A quel moment du cycle cellulaire les microtubules sont-ils le plus dynamiques ?

DOC 6 – OBSERVATION D'UNE ANAPHASE DE CELLULE ANIMALE EN MICROSCOPIE A FLUORESCENCE.

Clichés en microscopie optique à fluorescence : ADN marqué en bleu (DAPI), microtubules marqués en vert
<https://micro.magnet.fsu.edu/cells/fluorescencemitosis/anaphase2large.html>



6. Quelles sont les modifications du fuseau de division en anaphase ?

III. Etude du cycle cellulaire.

A) Repérer les cellules dans les étapes du cycle cellulaire.

La cytométrie de flux est une technique permettant de faire défiler des particules (molécules ou cellules) dans le faisceau d'un laser, de les compter et de les trier selon des paramètres.

L'iodure de propidium est un agent intercalant des acides nucléiques fluorescent. Une population de cellules est marquée à l'iodure de propidium et ensuite triée dans un cytomètre de flux selon l'intensité de fluorescence.

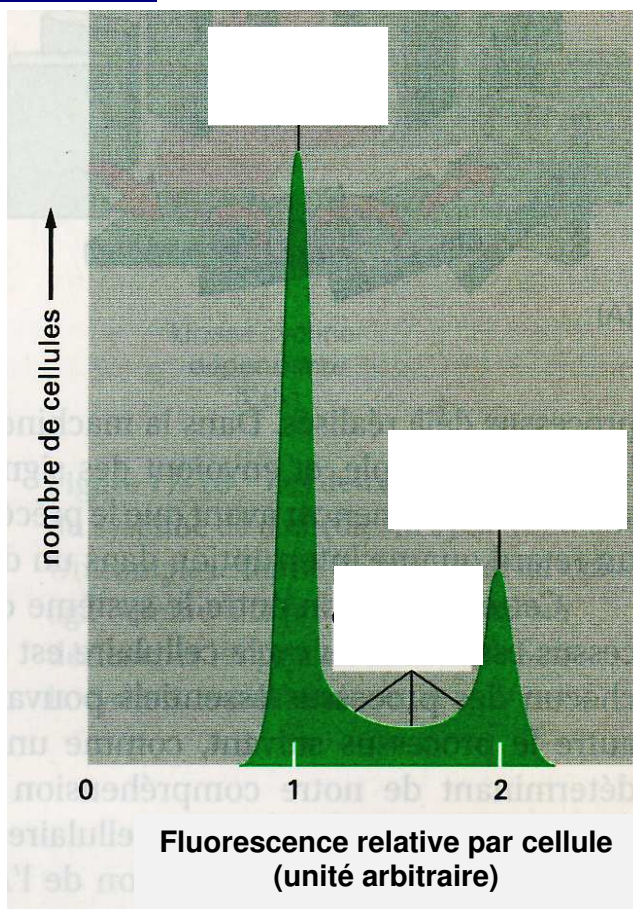
Alberts

1. Repérer les cellules qui sont en G1, S, G2 et M du cycle cellulaire.

Les pourcentages de cellules dans chacune des phases sont reportés dans le tableau ci-dessous :

Phase	G1	S	G2/M
Pourcentage de cellules	64%	21%	15%

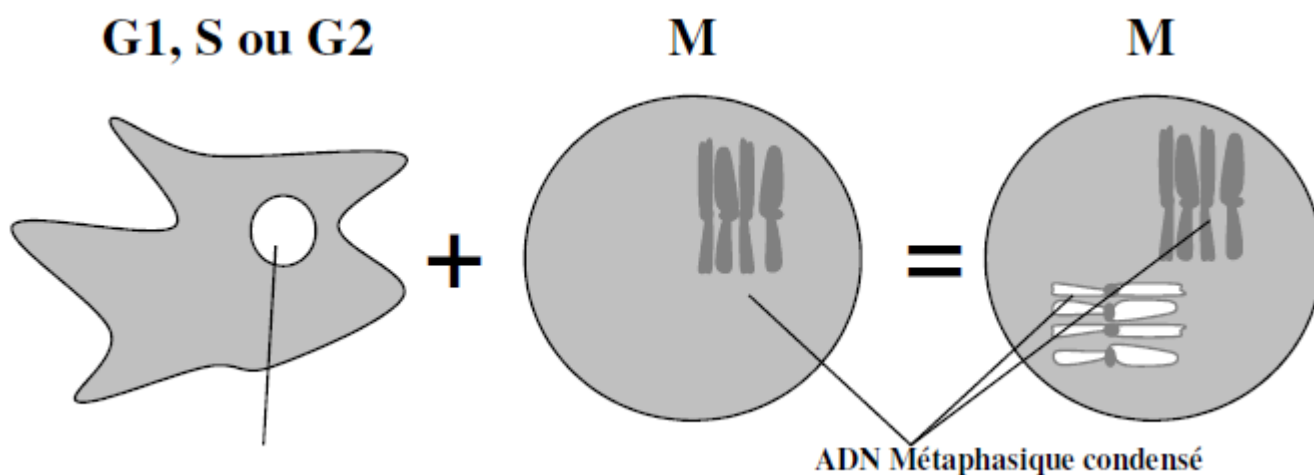
2. Sachant que le cycle cellulaire dure 20h pour ces cellules, estimez la durée de chacune des phases du cycle cellulaire.



B) Contrôle du cycle cellulaire.

Des expériences de fusion cellulaire sont réalisées entre des cellules animales à différents stades du cycle cellulaire.

DOC 1 – RESULTATS DE FUSIONS CELLULAIRES.



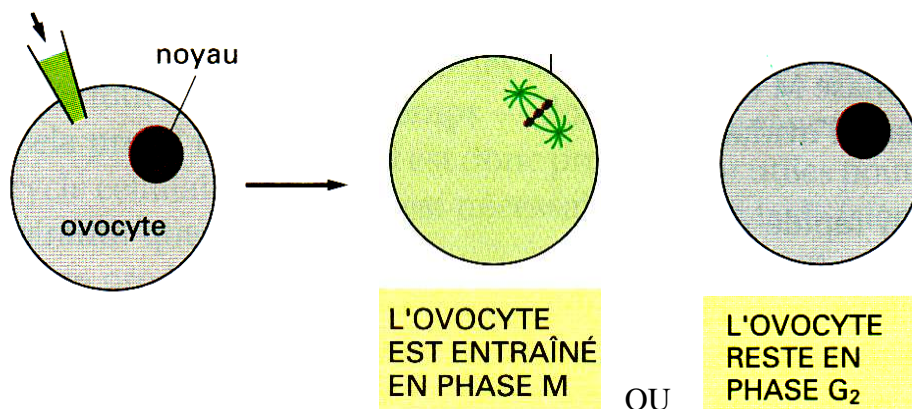
ADN Interphasique: Chromatine

1. Quel est l'effet de la fusion cellulaire sur les chromosomes de la cellule en interphase (G1, S ou G2) ? Quelle hypothèse pouvez-vous émettre pour expliquer ce résultat ?
2. Décrivez les propriétés de l'inducteur d'entrée en phase M à l'aide des expériences ci-dessous.

DOC 2 – INJECTIONS DE CYTOPLASME ENTRE OVOCYTES. Alberts

Principe des injections : injection du cytoplasme d'une cellule en phase M ou G2 dans un ovocyte bloqué en phase G2.

Le devenir de l'ovocyte injecté est ensuite observé.



<i>Cellule d'où provient le cytoplasme injecté</i>	<i>Traitement du cytoplasme</i>	<i>Devenir de la cellule subissant l'injection</i>
Cellule en phase M	-	Entre en phase M
Cellule en interphase	-	Reste en phase G2
Cellule en phase M	Traitement par une RNase	Entre en phase M
Cellule en phase M	Traitement par une protéase	Reste en phase G2

L'inducteur d'entrée en phase M est appelé **MPF** (M-phase Promoting Factor).

Le MPF de cellule en métaphase a été purifié par chromatographie d'affinité et analysé par électrophorèse SDS-PAGE (doc 3).

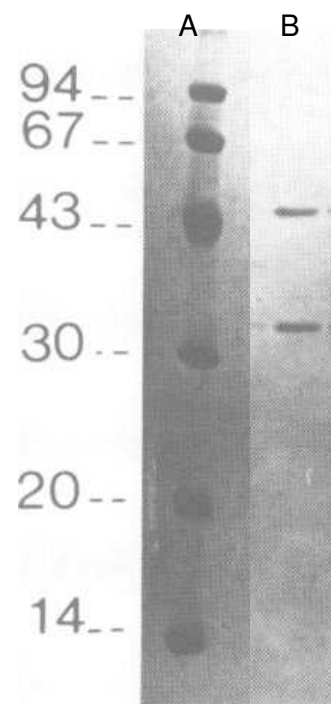
3. A l'aide du document 3, analysez la structure moléculaire du MPF.

DOC 3 – ANALYSE PAR ELECTROPHORESE SDS-PAGE DU MPF.

A : marqueur de masse moléculaire.

B : révélation au bleu de Coomassie (colorant des protéines) de l'électrophorèse du MPF purifié.

Labbé et al. EMBOJ 1989



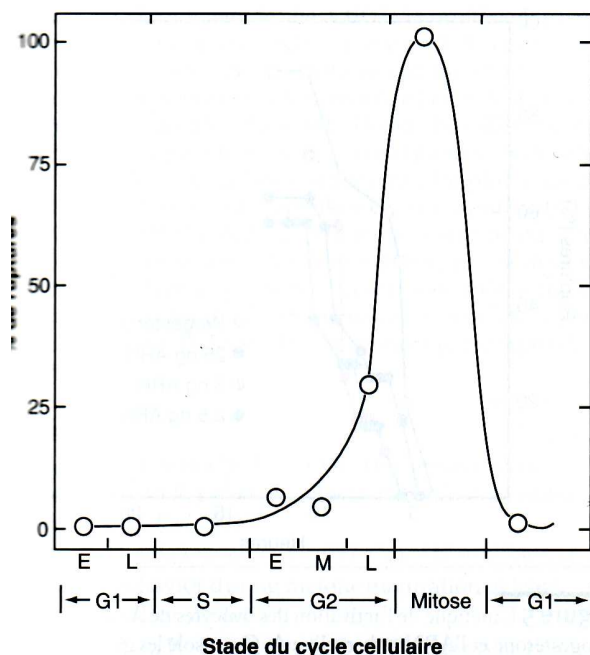
Le MPF est constitué de :

- une protéine **kinase** (activité enzymatique de phosphorylation)
- une protéine nommée **cycline** : la concentration de cette protéine varie au cours du cycle cellulaire, elle est produite au cours de l'interphase et du début de la mitose, puis dégradée au milieu de la mitose.

L'activité du MPF varie ainsi de façon cyclique au cours du cycle cellulaire.

Pour information : dosage de l'activité du MPF au cours du cycle cellulaire. Karp

Le pourcentage d'activité de l'inducteur est indiqué en ordonnée.



On s'interroge désormais sur les cibles du MPF impliquées dans l'entrée en mitose des cellules.

La rupture de l'enveloppe nucléaire est provoquée par la dissociation de la lamina nucléaire. La phosphorylation des lamines entraîne leur dissociation et la perte de cohérence de la lamina.

L'expérience suivante consiste à récupérer des noyaux issus de cellules embryonnaires de poulet. Les noyaux sont incubés pendant 1h30 avec divers traitements. Les noyaux sont ensuite soumis à l'action d'un détergent puis centrifugés. Si la lamina est dissociée, les lamines sont solubilisées par le détergent ; si la lamina n'est pas dissociée, les lamines restent associées malgré l'action du détergent. Culot et surnageant sont séparés et soumis à une électrophorèse SDS-PAGE. Un western blot est ensuite effectué avec un anticorps anti-lamine B (doc 4).

Dans une autre expérience, les noyaux sont incubés pendant 30 minutes en absence ou en présence de MPF avec de l'ATP marqué radioactivement. Les noyaux subissent ensuite un traitement par détergent ; puis les protéines sont incubées avec un anticorps anti-lamine B couplé à des billes. La centrifugation permet ensuite d'isoler les complexes bille-anticorps-lamine B. Ces complexes sont enfin chauffés à 95°C dans un tampon contenant du SDS puis soumis à électrophorèse SDS-PAGE suivie d'une autoradiographie (doc 5).

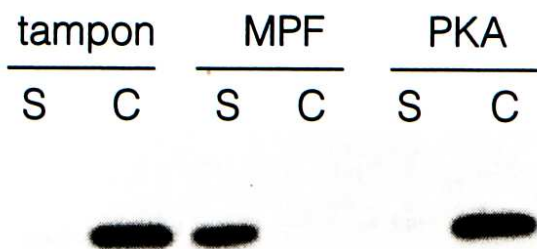
DOC 4 – RESULTATS DU WESTERN BLOT AVEC ANTICORPS ANTI-LAMINE B.

Tampon : incubation des noyaux en présence d'ATP.
MPF : incubation des noyaux en présence d'ATP et de MPF extrait de cellules en prophase.

PKA : incubation des noyaux en présence d'ATP et d'une protéine kinase impliquée dans la signalisation intracellulaire, la PKA.

C : culot. S : surnageant.

Ellipses – Biologie BCPST1



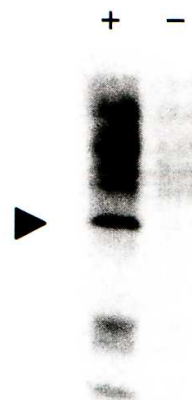
DOC 5 – TEST DE PHOSPHORYLATION DES LAMINES.

Ellipses

+: incubation des noyaux en présence d'ATP radioactif et de MPF.

- : incubation des noyaux en présence d'ATP radioactif et en absence de MPF.

La tête de flèche indique la position de la lamine B.



4. A l'aide des documents 4 et 5, analysez le rôle du MPF sur le noyau au cours de la prophase.