

## Figure 1 : Expérience de Meselson et Stahl Un grand classique, à connaître sur le bout des doigts!

D'après [sno.jussieu.fr](http://sno.jussieu.fr)

### Le contexte :

Cette expérience date de **1958**. Elle permet de démontrer le caractère semi-conservatif de la multiplication de la molécule d'ADN chez les bactéries. Cette expérience a pu être réalisée grâce à plusieurs mises au point techniques :

① Meselson et Stahl mettent au point une technique d'obtention de gradient de densité par centrifugation. En utilisant du chlorure de Césium de densité moyenne 1,72, ils obtiennent après 24h de centrifugation à grande vitesse un **gradient de densité** (environ de 1,70 à 1,75), gamme qui englobe la densité de l'ADN (1,710).

② Ils cultivent les bactéries dans un milieu dans lequel les substances organiques utilisées comme source d'azote contiennent de **l'azote lourd** ( $^{15}\text{N}$ ). Au cours de la culture, toutes les molécules azotées et en particulier l'ADN intègrent de l'azote lourd  $^{15}\text{N}$ . **L'ADN "lourd" a une densité de 1,724 et peut être distingué de l'ADN "léger" (1,710).**

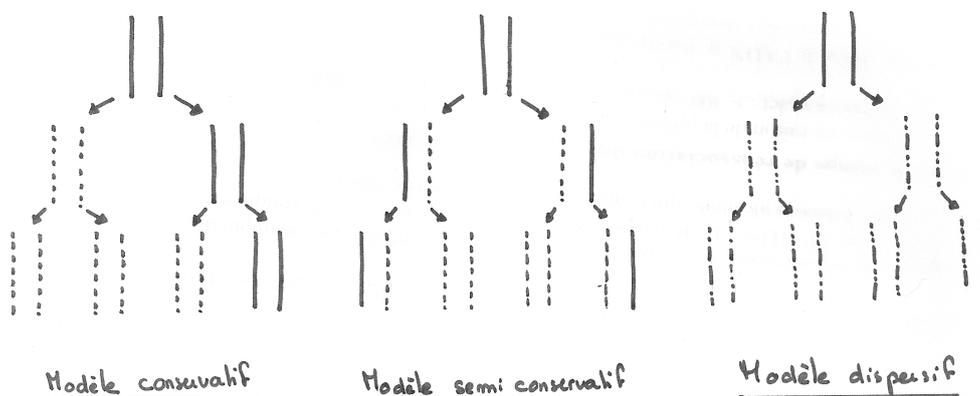
③ Ils mettent au point une méthode qui permet de **synchroniser** pendant quelques générations la division des bactéries.

### Problématique :

Depuis Watson et Crick (1953), on sait que l'ADN est une molécule formée de deux brins antiparallèles, formant une double hélice. Dès leur publication originale sur la structure de l'ADN, Watson et Crick ont proposé que cette double hélice puisse s'ouvrir, permettant ainsi la synthèse de nouveaux brins, complémentaires des brins originaux.

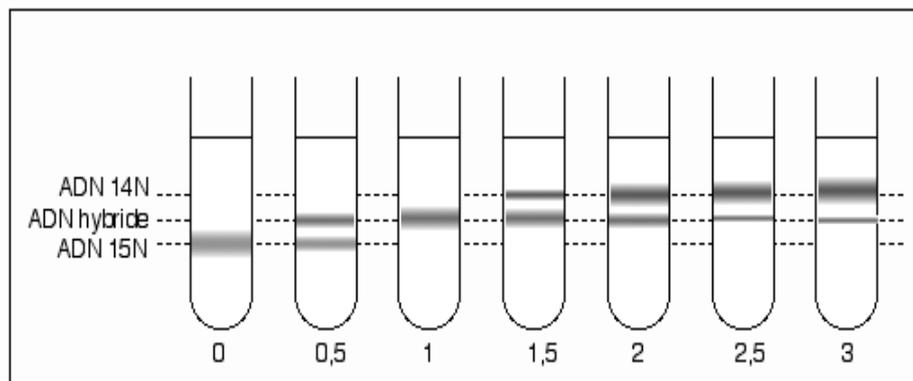
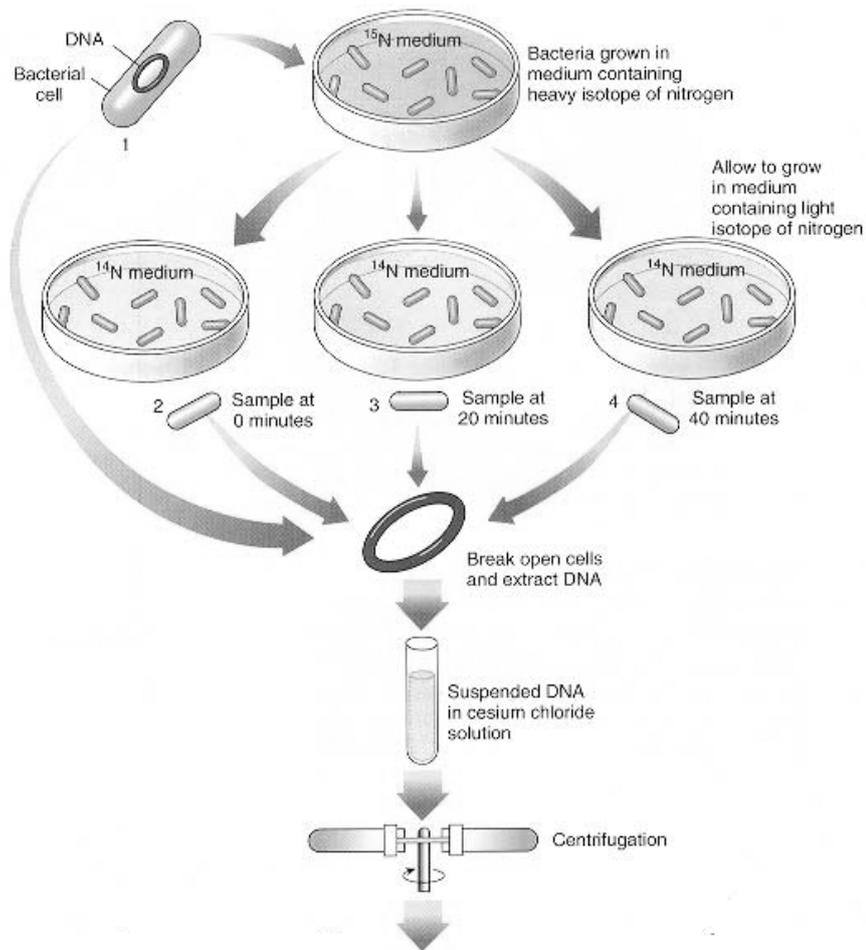
Le problème qui se posait à Meselson et Stahl était alors de comprendre comment se réalisait cette réplication : **selon quelles modalités passe-t-on d'une molécule d'ADN formée de deux brins à deux molécules d'ADN bicaténaire identiques ?**

### Trois hypothèses :



### L'expérience :

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



*Position des différentes bandes d'ADN au cours du temps. Les chiffres donnent le nombre de divisions.*

**Comparaison avec les modèles**

L'expérience de Meselson et Stahl montre donc la présence d'un ADN hybride au **bout d'une génération cellulaire**. Or, qu'attend-on pour les trois modèles proposés ?

Résultats attendus avec le modèle conservatif	Résultats attendus avec le modèle semi conservatif	Résultats attendus avec le modèle dispersif

**Conclusion :**

Au bout de deux générations cellulaires, Meselson et Stahl observent la présence d'ADN hybride et d'ADN léger. Qu'attend-on pour les 2 modèles restants?

Résultats attendus avec le modèle	Résultats attendus avec le modèle

**Conclusion :**

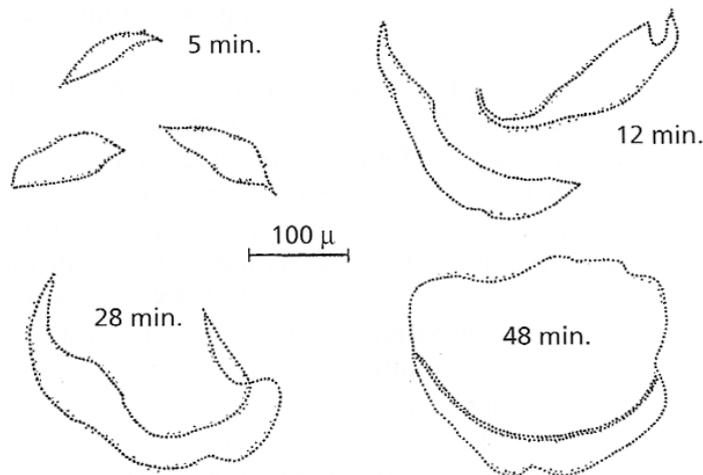
**Figure 2 : expérience de Cairns (1963)**

Pour visualiser au microscope électronique comment se réplique l'ADN, des bactéries sont cultivées dans un milieu contenant de la **thymidine tritiée** (rendue radioactive par incorporation de tritium  $^3\text{H}$ ).

Cairns met au point une méthode de lyse de la cellule permettant de libérer l'ADN directement sur une grille de microscopie électronique, en minimisant les risques de cassures de la molécule d'ADN. La préparation est recouverte ensuite d'une émulsion photographique et après exposition et développement, l'examen révèle des grains d'argent le long de la molécule d'ADN.

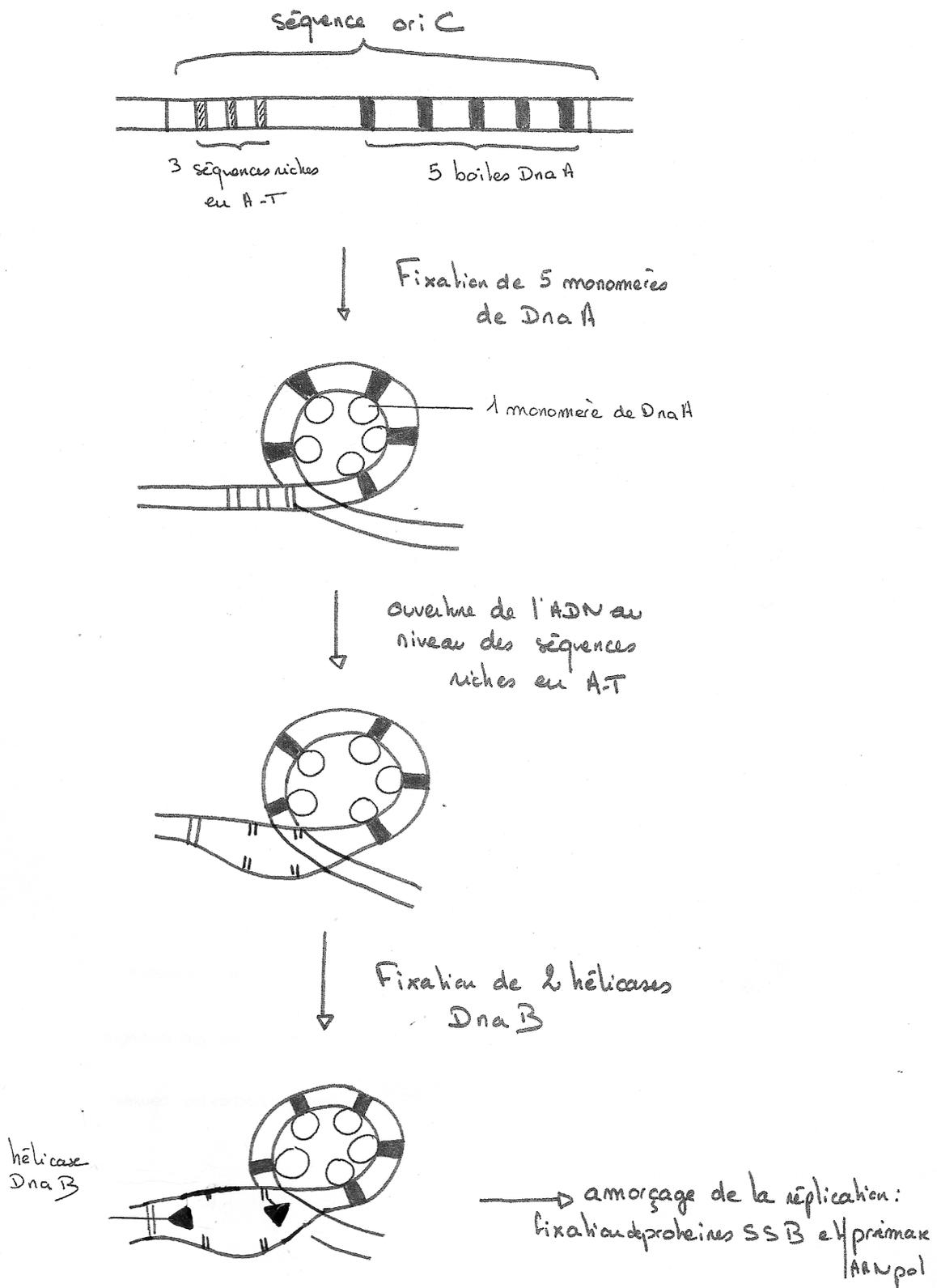
Ces premières observations ont montré la circularité du chromosome d'*E.coli*.

Il a ensuite réalisé des **marquages à la thymidine tritiée pendant des temps variables** : les résultats sont présentés ci-dessous :



**Réalisez des schémas interprétatifs à 28 et 48 minutes**

**Figure 3 : Initiation de la réplication au site oriC chez *Escherichia coli***



### Figure 4 : L'ADN polymérase III

#### ➤ Travaux de Kornberg et al., 1957 : découverte de l'enzyme ADN pol I

En 1957, Kornberg publie la découverte d'une enzyme capable de synthétiser de l'ADN dans des extraits d'*E. coli*. Ses expériences sont basées sur l'utilisation de thymidine triphosphate radioactive ( $^{14}\text{C}$ ) : il montre que l'enzyme est capable d'incorporer ce nucléotide dans une molécule d'ADN.

Cette enzyme a été appelée **ADN pol I** : c'est un monomère de 928 acides aminés dont l'expression est gouvernée par le gène *polA*.

La découverte de mutants de *E. coli* se répliquant normalement avec très peu d'activité pol I a encouragé la recherche d'autres ADN polymérases. Deux ADN polymérases ont été découvertes : **ADN pol II** et **ADN pol III** (dans l'ordre de leur découverte). L'ADN pol II est impliquée dans certains mécanismes de réparation de l'ADN (voir II du chapitre) et est sous le contrôle du gène *polB*.

La mutation thermosensible du gène *polC* responsable de la synthèse de l'ADN pol III entraîne l'arrêt de la réplication.

#### Ces résultats montrent que la réplacase de *E. coli* est l'ADN polIII.

#### Remarque : les mutants **thermosensibles**

Pour connaître les rôles des gènes *polA*, *B* et *C*, des expériences de mutation ont été réalisées. Cependant, toute mutation qui bloque la réplication entraîne la mort de la bactérie : on utilise donc des mutations thermosensibles c'est-à-dire des **mutations qui n'apparaissent qu'au-dessus d'une certaine température** ( $T > T$  permissive). Ceci permet de cultiver les bactéries ( $T < T$  permissive) puis d'étudier les effets des mutations en augmentant la température.

#### ➤ Complexe enzymatique : **holoenzyme PolIII**

L'enzyme polIII est formée :

- d'un cœur catalytique composé de 3 sous-unités
- d'un anneau composé de 2 sous-unités  $\beta$

Le **cœur** de l'enzyme est formé par les 3 sous-unités  $\alpha$ ,  $\epsilon$  et  $\theta$  :

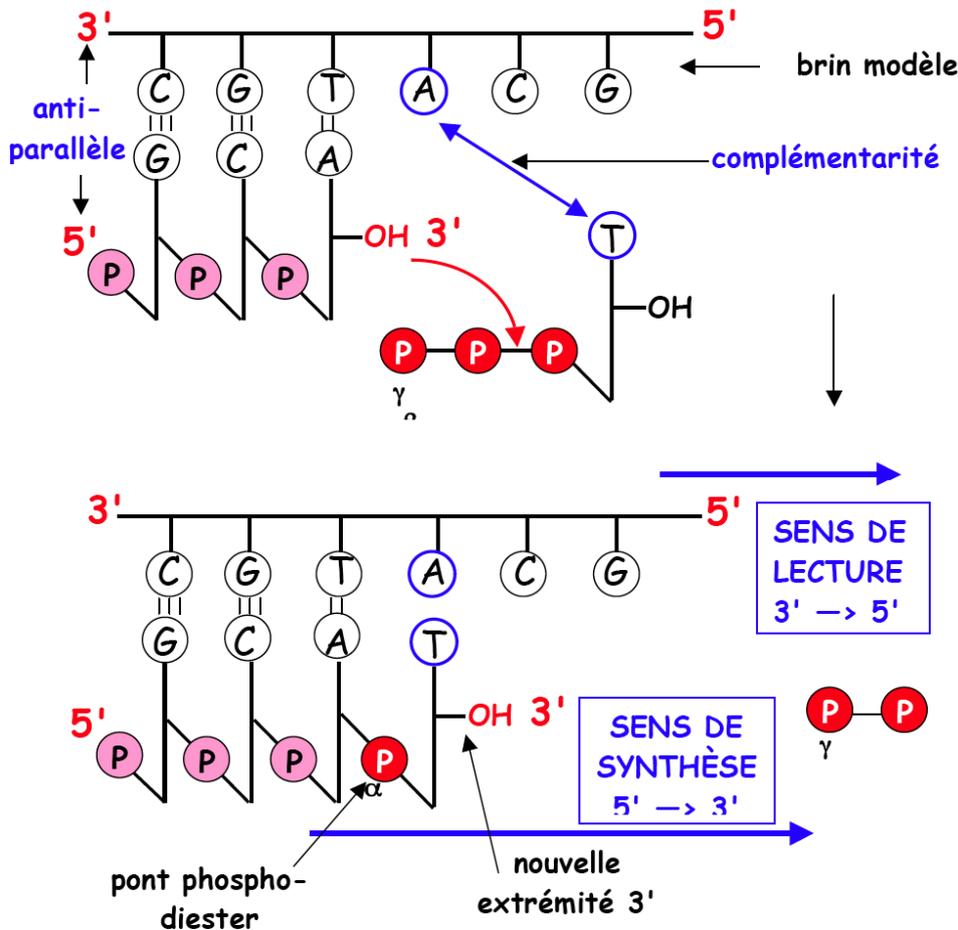
- $\alpha$  est le produit du gène *polC* et possède l'activité polymérase  $5' \rightarrow 3'$
- $\epsilon$  possède une activité exonucléase ( $5' \rightarrow 3'$  et  $3' \rightarrow 5'$ ) et est la première correctrice d'erreurs
- $\theta$  est une protéine accessoire qui active  $\epsilon$ .

Les 2 sous unités  $\beta$  forment un **anneau** capable de se refermer autour de l'ADN. En l'absence de cet anneau, l'enzyme se détache au bout de 10 à 15 résidus alors qu'en sa présence, sa « **processivité** » augmente et devient pratiquement illimitée. Cet anneau est formé de 2 sous unités en forme de C (366 aa chacune) qui s'associent en une structure coulissante appelée **pince coulissante**.

**Définition de processivité** : capacité de l'enzyme à catalyser de nombreuses réactions consécutives sans libérer son substrat.

#### ➤ Mode d'action :

L'ADN pol III catalyse la formation d'une chaîne polynucléotidique en associant des désoxyribonucléotides triphosphates sur une matrice = ancien brin = brin modèle, par complémentarité des bases.



La réaction est thermodynamiquement possible grâce à l'élimination du groupement pyrophosphate  $PP_i$  par la pyrophosphatase (notion de couplage à revoir)

Étapes de la polymérisation :

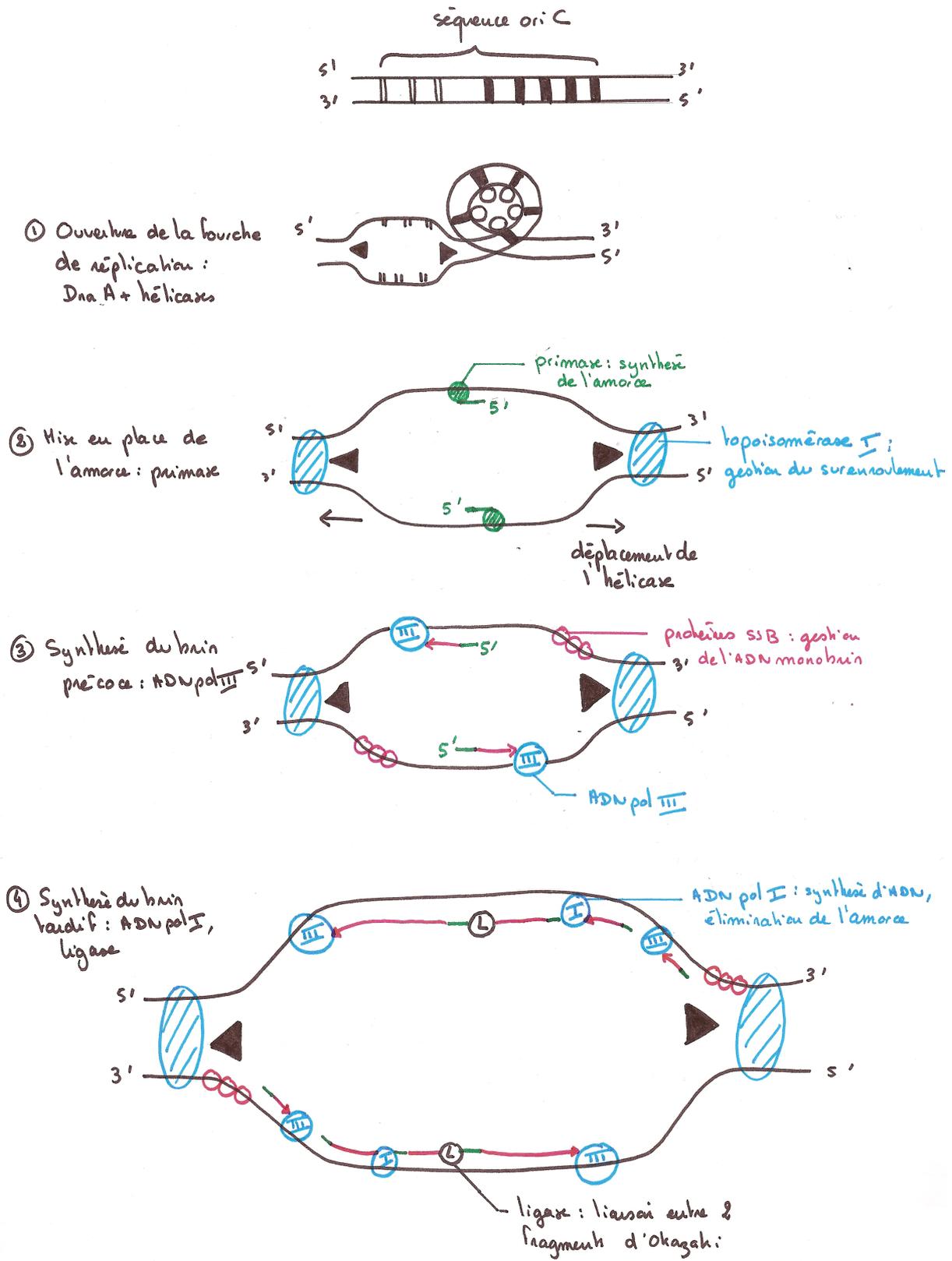
- ① Chaque nucléotide entrant forme d'abord une association par établissement de liaisons H entre sa base azotée et la base azotée libre de la matrice (liaison WC)
- ② Rupture de la liaison phosphoanhydride du nucléoside triphosphate, ce qui libère de l'énergie (exergonique)
- ③ Utilisation de l'énergie libérée pour créer une liaison ester entre le phosphate 5' du nouveau nucléotide et le groupement OH 3' du brin qui se construit. **Création d'une nouvelle liaison phosphodiester.** L'extrémité initiale de ce nouveau brin est toujours un groupement phosphate 5' et il se termine toujours par un groupement hydroxyle OH libre 3'

D'où la réaction :  $dNTP + (ADN)_n \rightarrow (ADN)_{n+1} + PP_i$

Remarques:

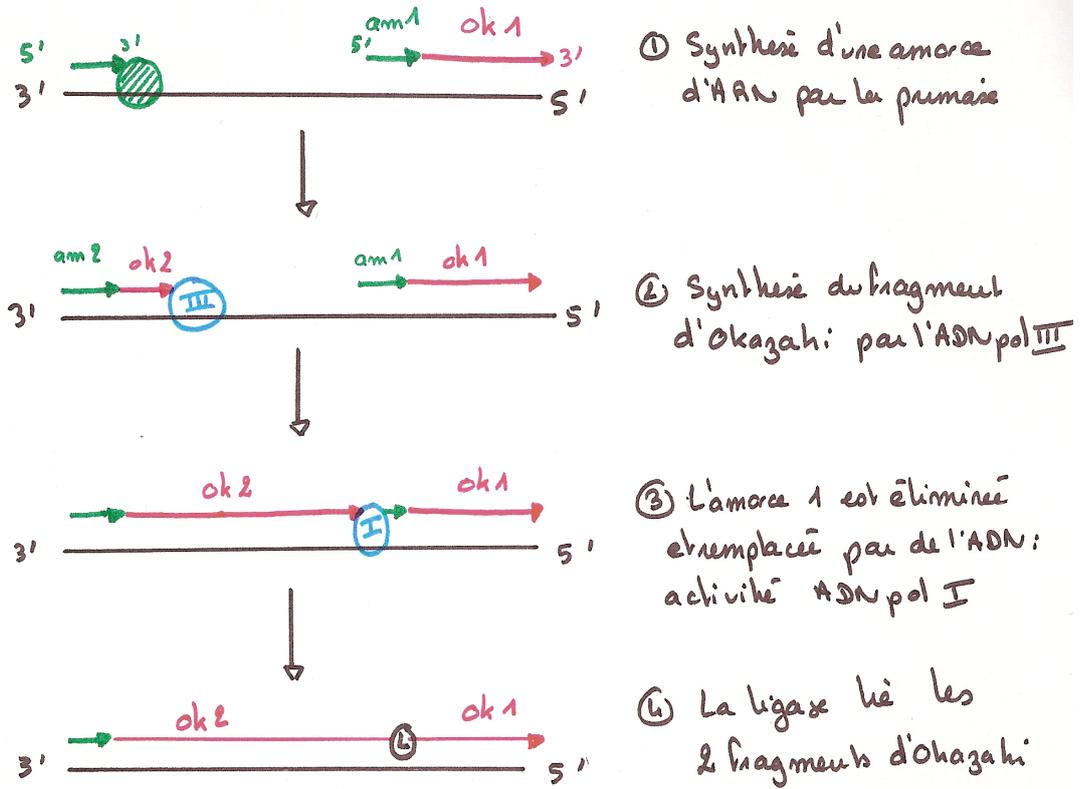
- la réaction est irréversible en raison de l'hydrolyse du pyrophosphate
- des cations divalents ( $Mg^{2+}$ ) participent au mécanisme catalytique : 2 ions  $Mg^{2+}$  localisés dans le site actif, aident à stabiliser les charges négatives des substrats, des états de transition et du  $PP_i$

Figure 5a : Modèle de réplication chez *E. coli*

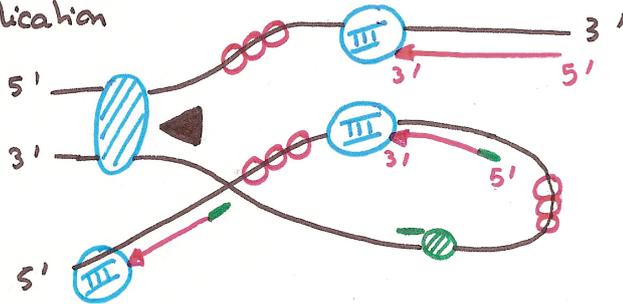


La réplication chez Escherichia coli

Figure 5b : Modèle de répllication chez *E. coli* (brin retardé)

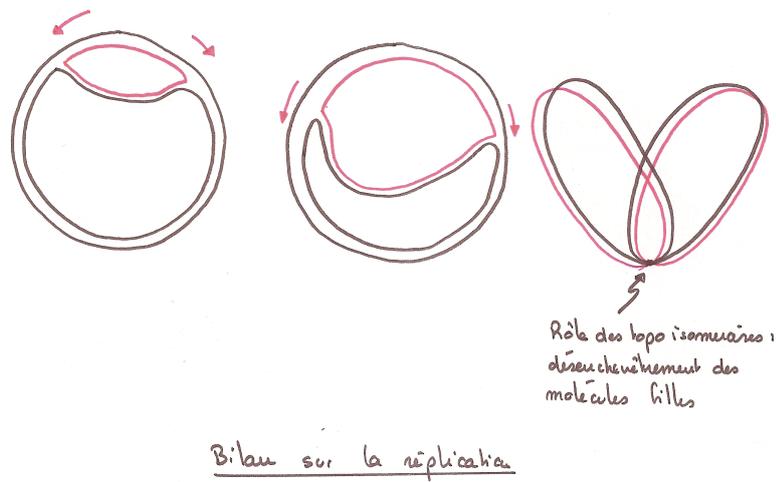


déplacement de la fourche de répllication ←

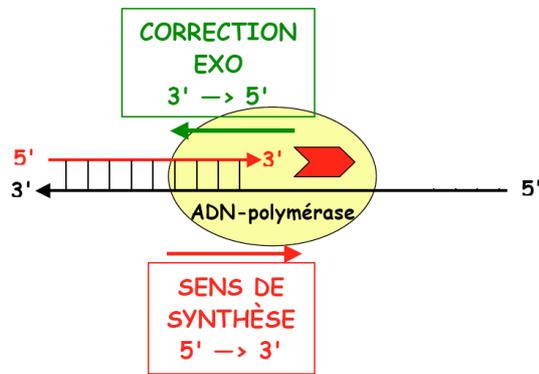


Modèle de répllication

**Figure 6 : Bilan sur la réplication**

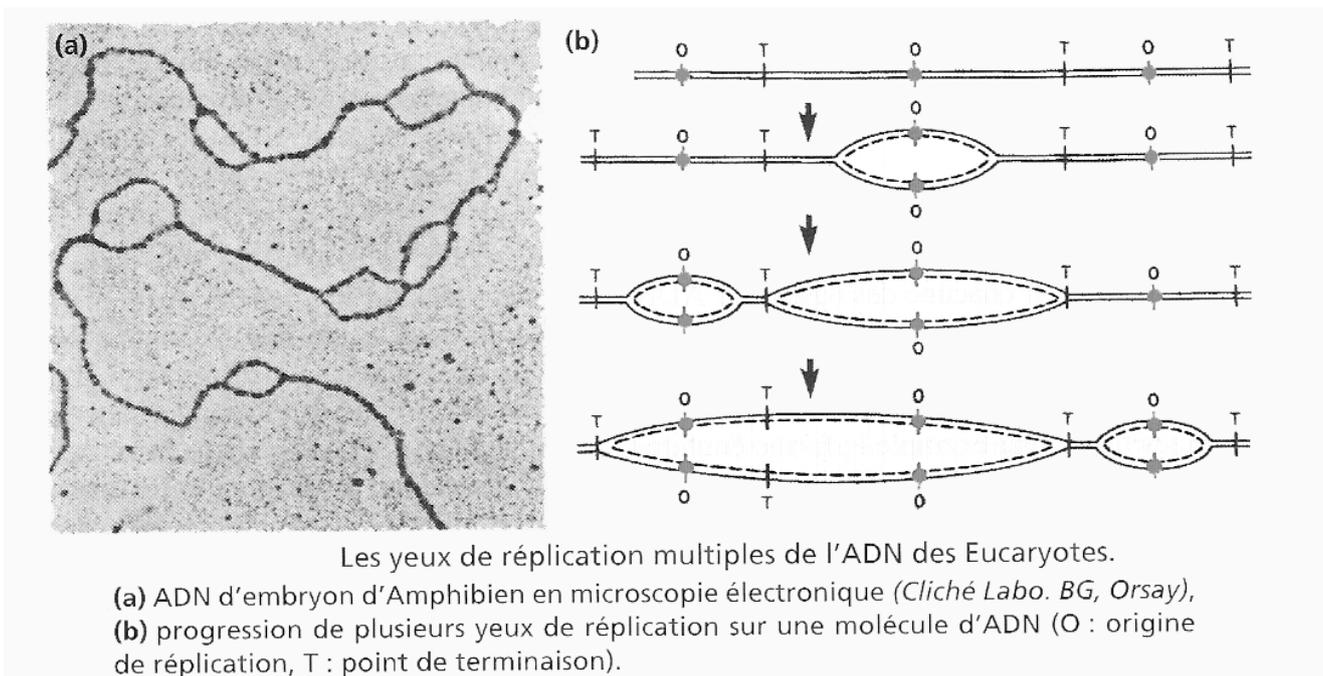


**Figure 7 : mécanisme de relecture de l'ADN pol III**



**Figure 9 : plusieurs origines de réplication chez les Eucaryotes**

(in Peycru et al., Dunod, 2005)



**Figure 8 : réparation des erreurs en post-réplication**

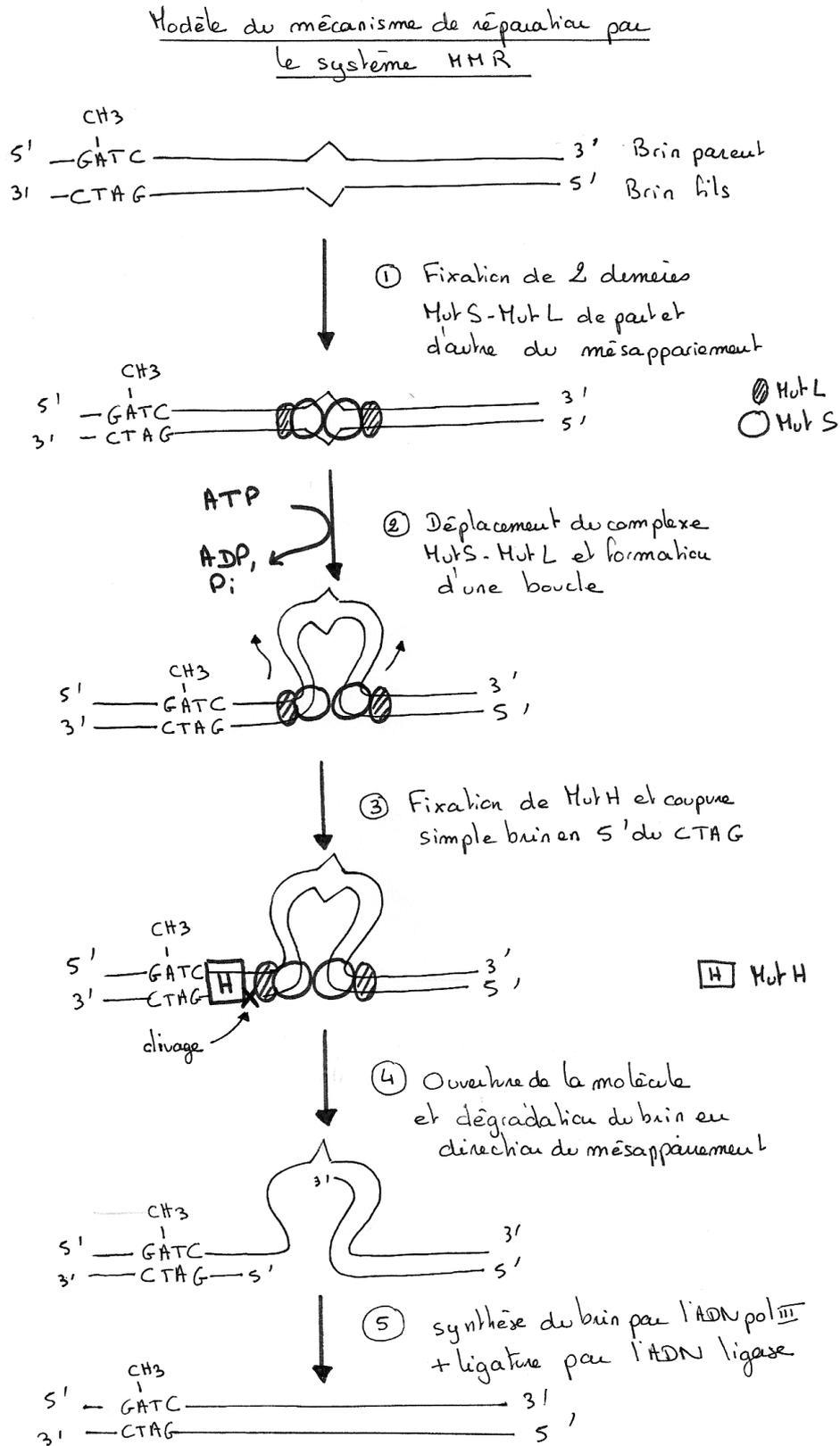
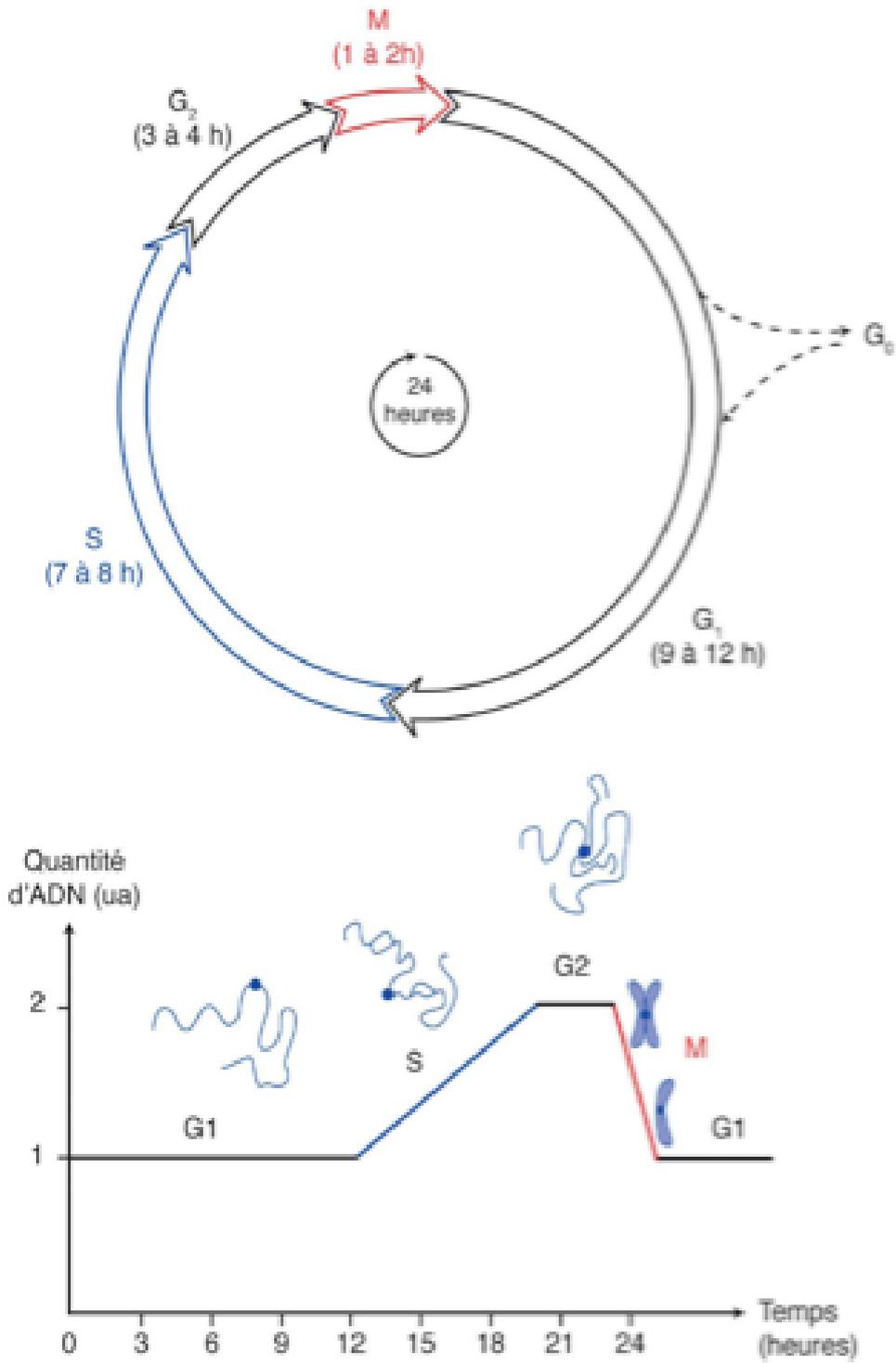
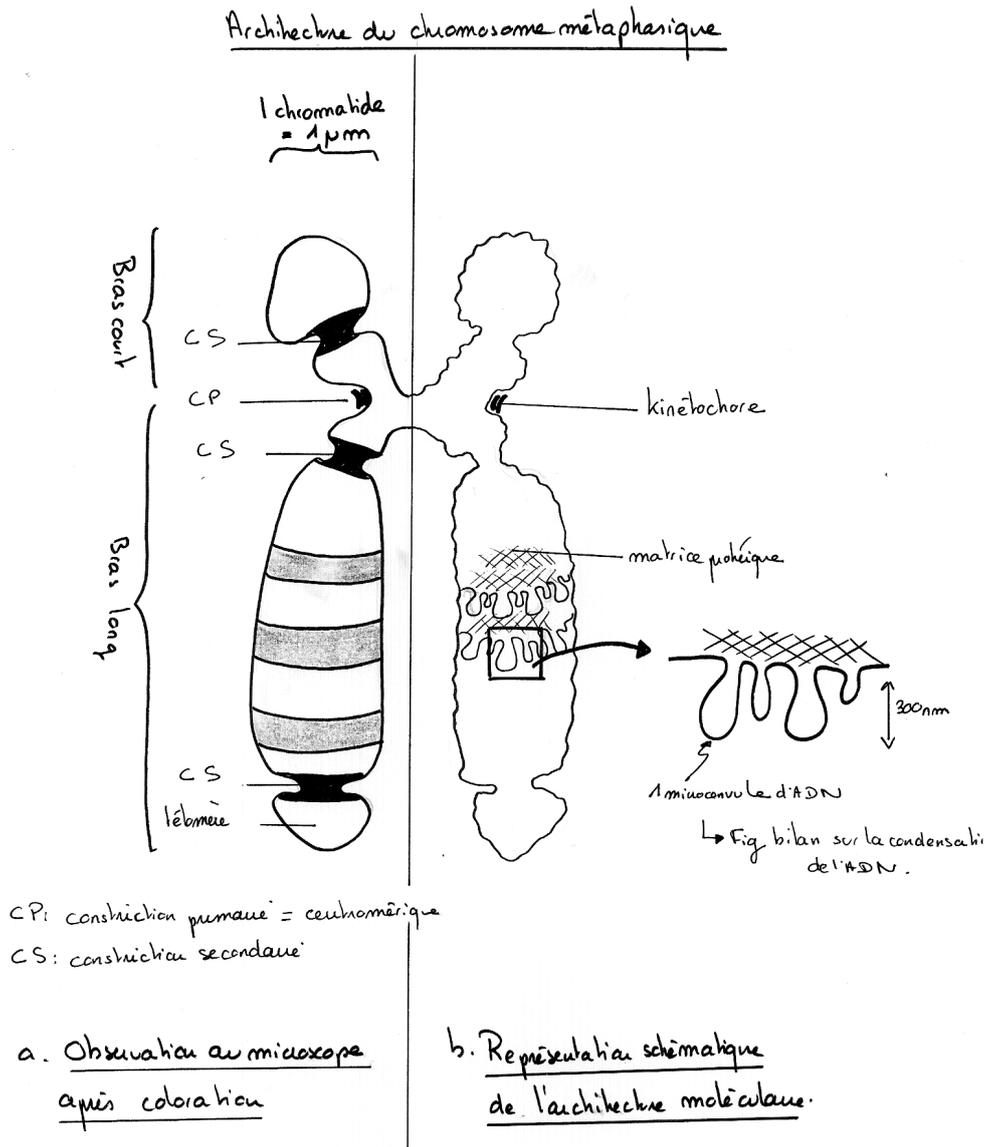


Figure 10 : place de la mitose dans le cycle cellulaire

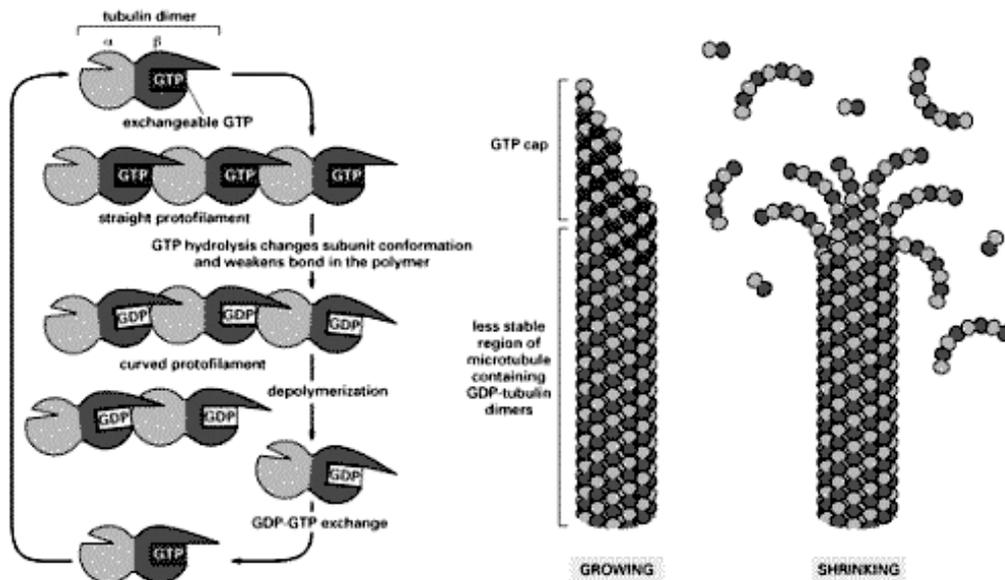


**Figure 11 : Organisation d'un chromosome métaphasique**

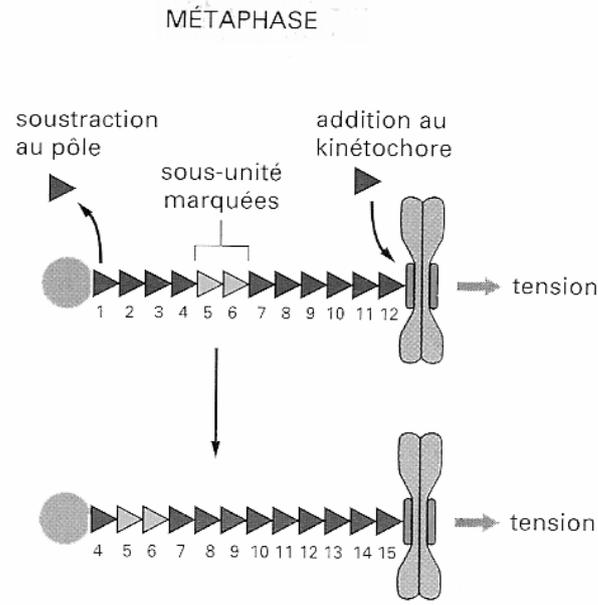


**Figure 12 : microtubules en instabilité dynamique**

(in Alberts, Med-Sciences, 1994)



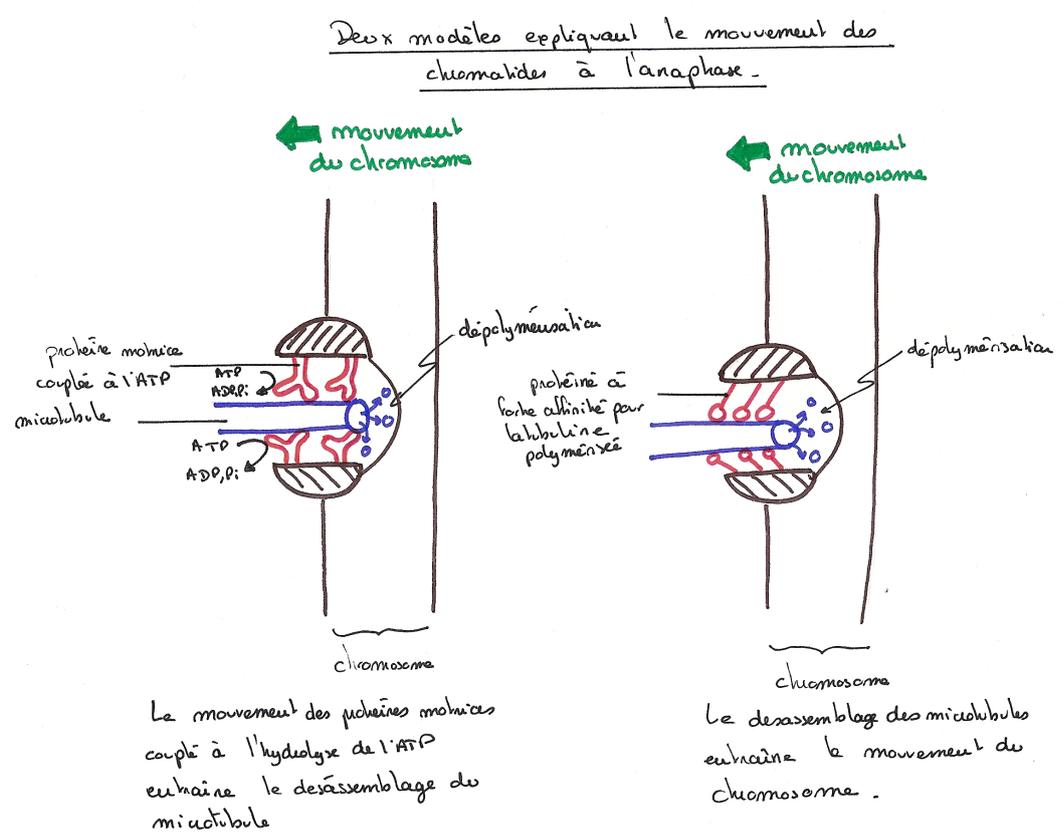
**Figure 13 : microtubules pendant la métaphase = état stationnaire (≠immobilité!)**  
(in Alberts, Med-Sciences, 1994)



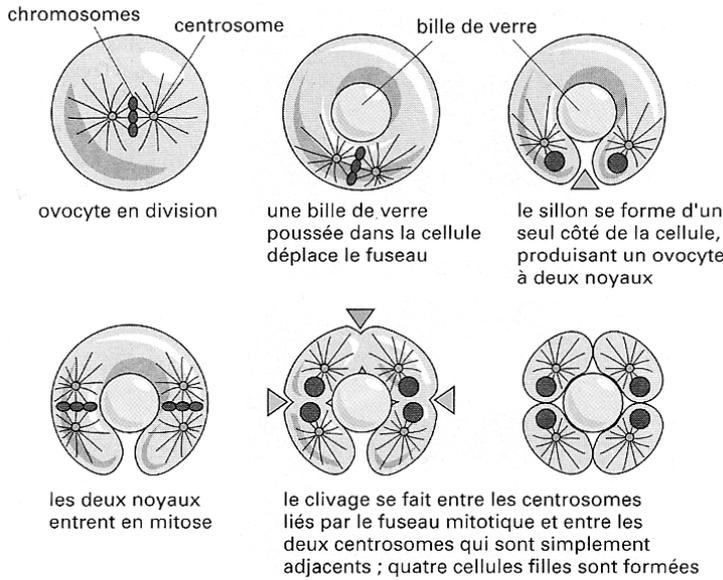
**Comportement des microtubules kinétochoriens au cours de la métaphase et de l'anaphase.** (A) En métaphase, des sous-unités sont ajoutées à l'extrémité plus d'un microtubule au niveau du kinétochore, et sont éliminées par l'extrémité moins au niveau du pôle du fuseau. Il existe aussi un flux constant de sous-unités de tubuline vers le pôle, les microtubules restant stationnaires et sous tension.

(A) le microtubule kinétochorien conserve une longueur constante

**Figure 14 : Deux modèles expliquant la traction des chromosomes par les microtubules (anaphase)**

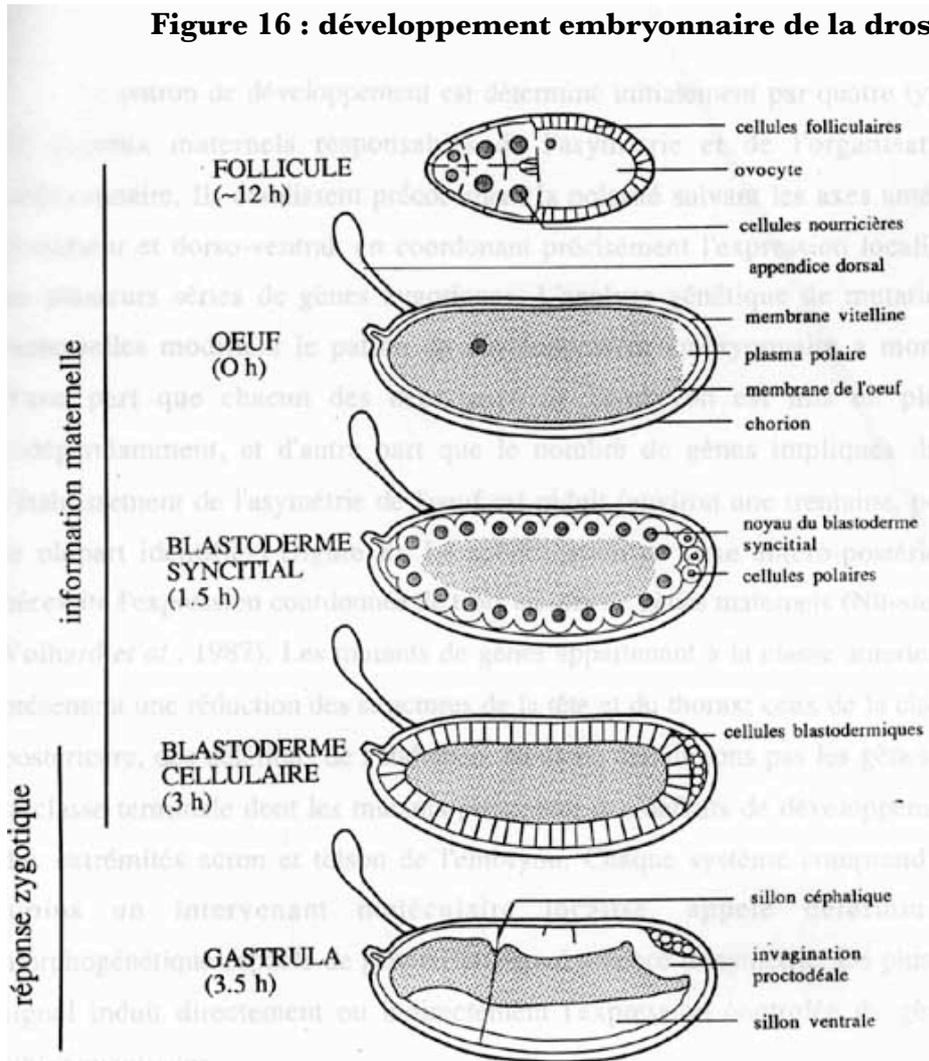


**Figure 15 : mise en évidence du rôle des asters dans la mise en place du sillon de division** (in Alberts, Med-Sciences, 1994)

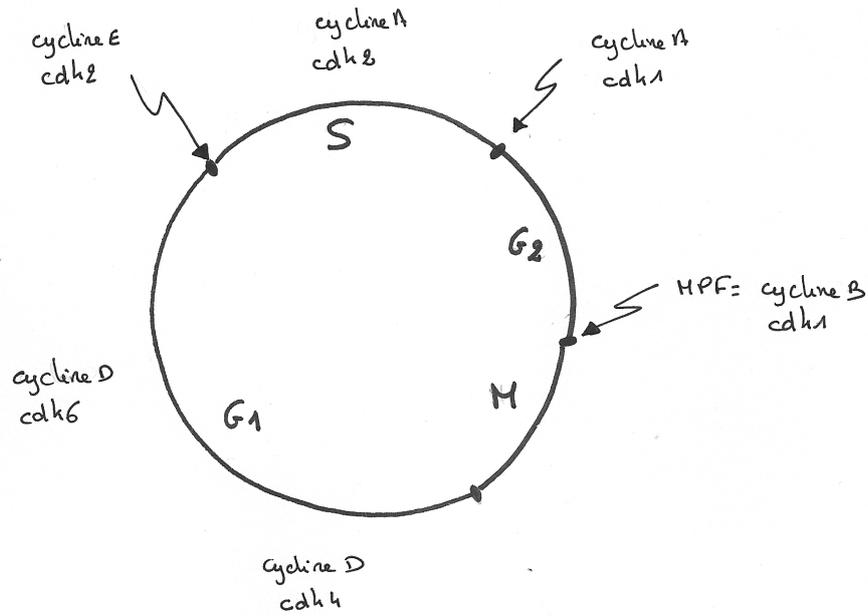
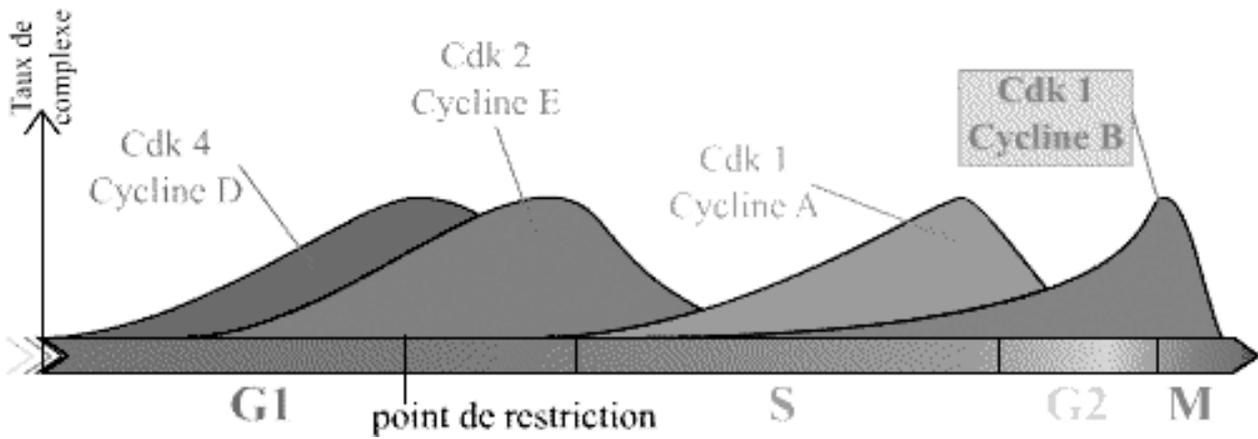


**Une expérience qui montre l'influence de la position des asters microtubulaires sur le futur plan de clivage.** Si le fuseau d'une cellule mitotique est mécaniquement repoussé d'un côté de la cellule, la formation du sillon membranaire est incomplète, manquant de se produire sur le côté opposé de la cellule. Les clivages ultérieurs ont lieu non seulement selon la manière normale propre aux deux fuseaux mitotiques (*têtes de flèche jaune*), mais aussi entre les deux asters adjacents qui ne sont pas liés par un fuseau mitotique mais qui, dans cette cellule anormale, partagent le même cytoplasme (*tête de la flèche rouge*). Apparemment, le faisceau contractile de filaments d'actine qui produit le sillon de clivage se forme toujours dans la région à mi-distance entre les deux asters, impliquant que les asters modifient d'une façon ou d'une autre la région adjacente du cortex cellulaire.

**Figure 16 : développement embryonnaire de la drosophile**

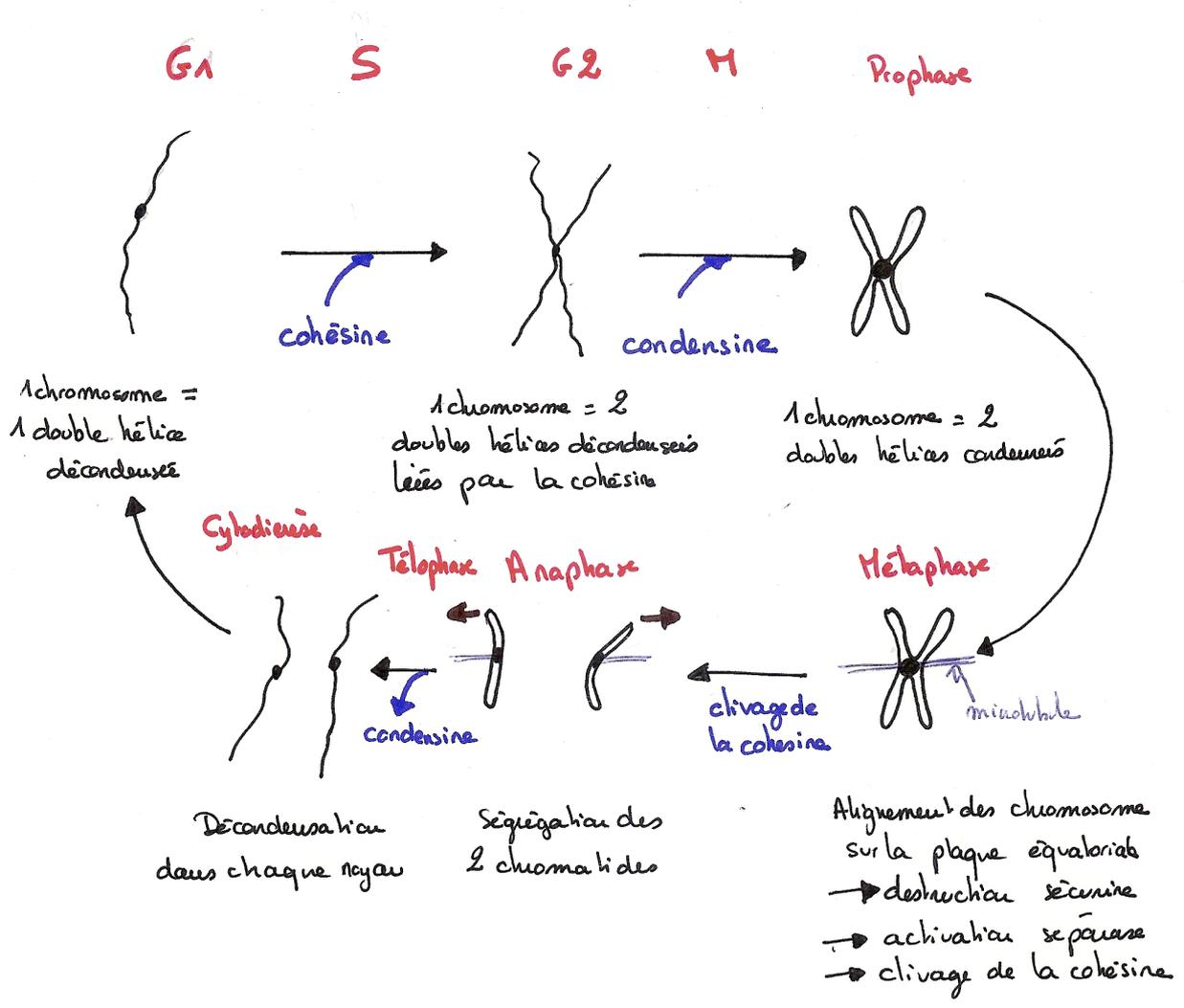


**Figure 17 : expression des complexes cyclines/cdk au cours du cycle cellulaire**



Action des différentes cyclines -cdk  
au cours du cycle cellulaire:

Figure 18 : le cycle d'un chromosome



Bilan : Cycle d'un chromosome

