

## **Kit métabolisme des levures** Réf. LEV/SMAC.

### **BUTS ET ORGANISATION DU TP**

#### **BUTS :**

**Montrer que les activités fondamentales des cellules telles la reproduction et le métabolisme sont sous le contrôle d'un programme génétique.**

**Pour ce faire :** Mettre en évidence la capacité de quatre souches de levures non-pathogènes à métaboliser différents sucres.

**NB :** Ce kit permet également une initiation aux techniques de microbiologie.

#### **ORGANISATION :**

Les travaux pratiques se dérouleront sur 2 séances.

1<sup>ère</sup> séance : Initiation aux techniques de microbiologie, observation microscopique, ensemencement selon la technique des stries sur 4 milieux de cultures riche et sélectifs.

2<sup>ème</sup> séance : Observation et interprétation des résultats.

### **COMPOSITION**

#### **SOUCHES:**

##### **[B] = SCHWANNIOMYCES Castellii :**

De forme ovoïde, elle ressemble aux saccharomyces mais est remarquable par ses propriétés physiologiques : elle a une activité amylolytique (digère l'amidon), a un fort effet PASTEUR et pas ou peu d'effet CRABTREE.

##### **[D], [E], [F] = SACCHAROMYCES Cerevisae**

###### **[D] = souche rho+sac+**

C'est la souche sauvage ; elle est prototrophe, c'est à dire qu'elle n'a pas d'exigences et pousse sur milieu minimum. Elle possède son génome mitochondrial intact (rho+) et peut donc respirer. Elle peut utiliser le saccharose comme source de carbone et d'énergie (sac+) car elle possède une saccharase qu'elle secrète.

###### **[E] = souche rho – sac+**

Elle ne diffère de la souche D que par une mutation altérant le cytochrome B. Elle ne peut donc pas respirer et ne poussera pas sur glycérol qui est un substrat uniquement respirable.

###### **[F] = souche rho+sac –**

Elle ne diffère de la souche D que par une mutation altérant la synthèse de la saccharase (n'est pas secrétée à l'extérieur de la cellule). Elle ne poussera donc pas sur saccharose.

###### **[C] = SCHIZOSACCHAROMYCES Pombe**

Cette souche présente la particularité de se reproduire par scissiparité (cloisonnement transversal)

## MILIEUX :

### Version à couler :

Milieu 5 : **Bouteille N°5 : 400ml de milieu pauvre + glucose.**

Milieu 6 : **Bouteille N°6 : 400ml de milieu pauvre + glycérol.**

Milieu 7 et 8 :

**2 Bouteilles N°7 : 800ml de milieu pauvre.**

**Tube N°6 : 5ml de solution filtrée d'amidon (50g/L).**

**Tube N°7 : 5ml de solution filtrée de saccharose (200g/L).**

Note : **Si la solution d'amidon est trouble, chauffer au bain marie 80°C jusqu'à solubilisation de l'amidon.**

## MATERIEL (EN OPTION):

- 80 anses stériles
- 99 boîtes de pétri stériles

## GENERALITES

### § A LIRE IMPERATIVEMENT AVANT TOUTE MANIPULATION §

#### A) CONDITIONS DE TRAVAIL :

Lorsque l'on manipule des micro-organismes, il faut prendre des précautions qui sont de deux ordres : ne pas contaminer l'espèce étudiée avec des souches externes et ne pas polluer l'environnement avec nos expériences. Ainsi, il est fondamental de respecter certaines conditions expérimentales propres à l'espèce étudiée.

Voici quelques règles concernant la manipulation des levures :

- nettoyage de la paillasse à l'alcool ou à l'eau de javel
- travail dans un rayon de 30 cm autour de la flamme d'un bec bunsen
- mains passées à l'alcool, port d'une blouse en coton
- instruments et milieux stérilisés ouverts et utilisés autour de la flamme
- ne mettre en contact que des matériels stérilisés entre eux et avec les cellules ; ne pas poser le matériel sur la paillasse ni toucher le col des tubes ou la partie du matériel qui sera en contact avec les levures, les milieux ou les solutions
- pot avec javel pour récupérer les pipettes usagées
- éviter les mouvements brusques, ne pas parler devant des boîtes ouvertes
- les levures sédimentent rapidement, il est donc nécessaire d'agiter les suspensions avant chaque prélèvement
- noter au marqueur indélébile au dos des boîtes : initiales des binômes et dénomination de la boîte.

#### B) PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURES :

Milieu pré stérilisé à couler :

Faire chauffer les bouteilles de milieu au bain-marie bouillant (eau jusqu'au col de la bouteille) jusqu'à totale dissolution (30 à 60 minutes). Penser à dévisser légèrement le bouchon pour éviter l'explosion. Laisser légèrement refroidir, puis couler 20 boîtes par bouteille.

Il est également possible de fondre le milieu au micro-ondes, cependant éviter la puissance maximale et surveiller pour éviter les projections (baisser alors la puissance) ; contrôler également l'état du milieu toutes les 30 secondes.

Supplémenter les boîtes coulées avec les bouteilles N°7 avec les solutions de sucres filtrées :

Une fois le milieu solidifié, verser 2 gouttes de la solution d'amidon (Tube N°6) à l'aide d'un compte-gouttes stérile sur la moitié des 40 boîtes préparées avec le sachet N°9 et étaler à l'aide d'un étaleur stérile, les boîtes de milieu 7 sont prêtes. Utiliser un autre compte-gouttes pour déposer 2 gouttes de la solution de saccharose (tube N°7) sur les 20 autres boîtes, étaler, les boîtes de milieu 8 sont prêtes. Laisser sécher.

#### **NB :**

**le saccharose et l'amidon sont fournis en solutions filtrées car la stérilisation par la chaleur dégrade l'amidon en glucose et dégrade le saccharose en glucose et fructose. Ce mode de stérilisation (par la chaleur) peut fausser les résultats en permettant la croissance de toutes les souches.**

Couler les milieux et étaler les solutions devant la flamme d'un bec bunsen.

Ne pas oublier de marquer le numéro du milieu au dos des boîtes avant de couler les milieux !

#### **PREPARATION**

Couler les milieux

### **TRAVAUX PRATIQUES**

Une initiation aux techniques de la microbiologie doit être réalisée avant de commencer à manipuler :

Observation au microscope, rappel des précautions, topo...

#### **MANIPULATION EXAO :**

La souche E est incapable de respirer car son génome présente une anomalie dans la chaîne respiratoire ; effectuer une mesure grâce à un logiciel EXAO afin de montrer cette particularité.

#### **OBSERVATION DE LA SOUCHE C :**

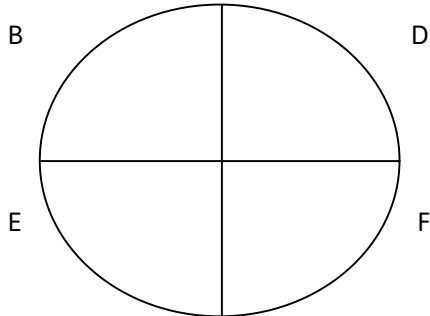
Celle-ci se fait sous lame et lamelle, observer le cloisonnement transversal en comparant avec la souche D qui se divise par bourgeonnement.

#### **STRIE A L ENSEMENCEUR :**

Donner à tous les binômes une boîte de pétri de chaque milieu.

①Au marqueur, diviser les boîtes en quatre quartiers égaux (écrire au dos de la boîte).

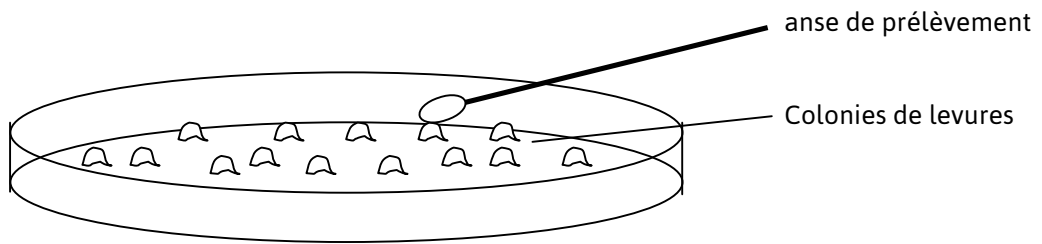
Attribuer à chaque quartier une lettre correspondant au nom des souches.



② Pour chaque souche :

Avec un ensemenceur stérile, prélever quelques levures en déposant l'extrémité arrondie sur le sommet d'une colonie. Strier ensuite le quartier correspondant sur les quatre boîtes préparées en ①.

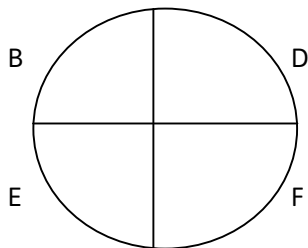
**NB : Il n'est pas nécessaire de prélever beaucoup de levures, une pointe suffit amplement pour ensemer**



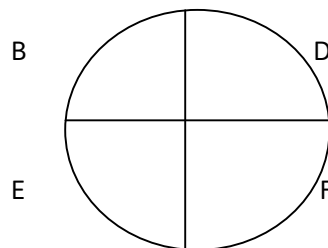
NB : Chaque binôme va utiliser quatre ensemenceurs : un par souche.

③ Incuber les boîtes 4 jours à 30°C ou une semaine à température ambiante (20-22°C) après avoir pris soin de noter les initiales des binômes au dos des boîtes. Conserver ensuite les boîtes au réfrigérateur (couvercle vers le bas) jusqu'à la séance suivante.

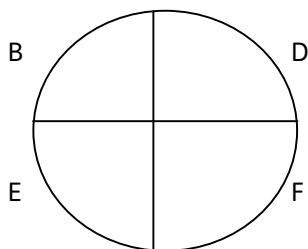
### INTERPRETATION DES RESULTATS



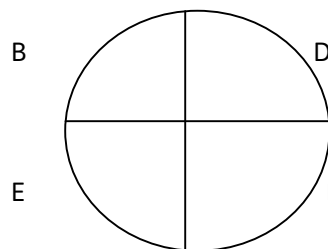
Milieu 5



Milieu 6



Milieu 7



Milieu 8

Cette technique permet de déterminer le métabolisme de chaque souche de levures.

**Milieu 5 :** toutes les souches poussent : Les levures trouvent dans ce milieu tout le nécessaire pour leur croissance.

**Milieu 6 :** Le glycérol est un substrat uniquement respirable donc les souches capables de respirer pousseront. La souche E est rho – (mutation dans un gène impliqué dans la chaîne respiratoire), elle ne pousse donc pas.

**Milieu 7 :** La source de carbone est l'amidon, ne pousseront que les souches capables de le métaboliser :

Peu de souches sont capables d'utiliser un polysaccharide. La souche B (*Schwanniomyces castellii*) présente une activité amylolytique car elle synthétise et exporte une amylase, elle pousse donc sur ce milieu.

La souche D forme des petites colonies alors qu'elle est à priori incapable de métaboliser l'amidon !

L'explication se trouve dans la fabrication du milieu de culture : Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C. Il se produit une hydrolyse partielle de l'amidon en glucose qui permet la croissance de la souche D, cependant le glucose est en faible concentration, ce qui explique la taille des colonies...

Les souches E et F : Le peu de glucose issu de l'hydrolyse de l'amidon est insuffisant à leur croissance car des mutations altèrent leur métabolisme.

**Milieu 8 :** La source de carbone est le saccharose, la souche F ne pousse pas car elle possède une mutation la rendant incapable de sécréter la saccharase (sac -).

“Les activités métaboliques telles la reproduction et la respiration sont sous le contrôle d'un programme génétique” : La manipulation EXAO et l'observation de la souche C nous permet d'illustrer cette partie du programme.

## IDEES

Voici un exemple d'exercice à soumettre aux élèves :

**“Expliquer pourquoi la souche D pousse sur le milieu 3 alors qu'elle est incapable de métaboliser l'amidon. Expliquer la petite taille des colonies”**

Indices :

- 1) Donner le protocole de fabrication du milieu 3.
- 2) La souche D peut utiliser le glucose.
- 3) Expliquer que l'amidon est une chaîne ramifiée de glucose et le principe d'hydrolyse.

Vous êtes bien entendu le plus apte à déterminer comment tourner la question, quels indices fournir et sous quelle forme.