Kit répression catabolique

RC/SMAC et RC/SMC

OBJECTIFS COGNITIFS ET ORGANISATION DU TP

OBJECTIFS COGNITIFS :

➡ Montrer que **le phénotype ne dépend pas uniquement du génotype**, l'expression d'un gène est soumise également aux **facteurs de l'environnement**.

➡ Approche de la **relation Génotype-Phénotype**.

➡ Exemple de voie métabolique, répression catabolique.

Afin de mettre en évidence les relations génotype-phénotype-environnement, deux manipulations sont proposées :

- Technique de l'auxonogramme : Culture d'une souche de levures *Saccharomyces cerevisae Ade2* sur un milieu additionné d'une pastille d'adénine : mise en évidence de la répression catabolique.
- Culture anaérobiose de cette même souche : mise en évidence de la nécessité de l'O2 dans l'établissement du phénotype (colonies rouges).

Nous avons sélectionné la souche de levures *Saccharomyces cerevisae* Ade2 car son phénotype particulier est observable à l'œil nu ce qui permet de faciliter l'interprétation des résultats et d'éveiller l'intérêt de l'élève.

ORGANISATION :

Les travaux pratiques se dérouleront en deux séances :

☯ **Première séance (1H30) :**

* Mise en suspension de colonies de levures prélevées sur boîte de pétri
* Ensemencement sur milieu complet
* Dépôt d'une pastille d'adénine
* Découpe d'un carré de gélose afin de créer une zone de croissance anaérobie
* Incubation à 28°C ou à température ambiante

☯ **Deuxième séance (la semaine suivante) :**

* Observation
* Interprétation des résultats.

COMPOSITION

⊡ **Souche :** Saccharomyces cerevisae Ade2- sur boîte de pétri (**notée Y**)

⊡ Milieu :

- 1 litre de milieu riche YPD2

  Version à couler : 3 bouteilles de 350ml

  Version coulée : 50 boites de milieu

- 50 pastilles vierges.

- 0,25g d'Adénine.

- 1 bouteille d'eau stérile

⊡ Matériel en option:

- 20 inoculateurs stériles
- 20 étaleurs stériles
- 20 tubes stériles de 5 ml
- 2 tubes stériles de 50 ml et 4 de 10 ml

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 ou 15 cm autour d'un bec électrique (ou lampe à alcool).
- 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.

NB : une technique pratique permet de distribuer le matériel aux élèves tout en conservant sa stérilité : il suffit de stériliser une dizaine de serviette en papier (type essuie-main) enveloppées dans une feuille de papier aluminium = champ stérile. Fournir à chaque binôme un champ stérile, ainsi il suffit de glisser le matériel entre les deux premières serviettes (première épaisseur) et il reste stérile. De plus chaque binôme disposera de 10 serviettes donc au fur et à mesure de la manipulation, les élèves auront la possibilité de se servir de plusieurs épaisseurs pour poser leur matériel.

B) PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURES :

Milieu pré stérilisé à couler :

⊡Faire chauffer les bouteilles de milieu au bain-marie bouillant (1cm au-dessus du niveau du milieu) jusqu'à totale dissolution (30 à 60 minutes). Penser à dévisser légèrement le bouchon pour éviter l'explosion. Laisser légèrement refroidir, puis couler 17 boîtes par bouteille.

⊡Soit faire 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 (agiter par rotation) et penser à dévisser le bouchon.

Attendre le refroidissement complet du milieu, puis conserver au réfrigérateur couvercle vers le bas jusqu'au TP.

Préparation des pastilles d'adénine (la veille ou quelques jours avant) :

Ajouter les 0,25g d'adénine à 75ml d'eau déminéralisée, porter à ébullition, ajouter les pastilles d'adénine puis laisser bouillir cinq minutes.
Prélever ensuite les pastilles à l'aide d'une pince stérilisée et les placer dans une boîte de pétri stérile afin de les laisser sécher (éventuellement à l'étuve.)

MATERIEL BIOLOGIQUE

La levure saccharomyces cerevisae Ade2$^-$:

Il s'agit d'un champignon eucaryote unicellulaire haploïde.

C'est le plus petit génome eucaryote connu : 14000 kb et 6200 gènes.

La souche utilisée porte une mutation qui affecte le gène **Ade2** impliqué dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine (cf. schéma).

Le gène **Ade2** a pour fonction de transformer un intermédiaire de cette chaîne : l'Amino imidazole ribotide ou AIR qui se transforme en un pigment rouge en aérobiose.

La mutation **Ade2$^-$** a deux effets :

* La souche étant incapable de synthétiser l'adénine, elle ne poussera pas sur milieu minimum

* Si on lui apporte l'adénine en supplémentant le milieu de culture (ou en la faisant pousser sur milieu riche), elle va l'utiliser et présentera un phénotype rouge du fait de l'accumulation de l'AIR.

Ce phénotype rouge nous permet de disposer d'un « crible positif » visible à l'œil nu ! On différencie ainsi facilement les souches qui portent la mutation **Ade2$^-$** après croissance sur boîte de pétri.

NB : S'il y a trop d'adénine dans le milieu, un effet de rétro-inhibition (feed-back) peut avoir lieu sur les gènes en amont d'**Ade2**. Dans ce cas, les colonies resteront blanches ou à peine rosées.

QUELQUES CARACTERISTIQUES PROPRES AUX LEVURES :

Les levures se reproduisent par bourgeonnement ou plus rarement par scissiparité (cloisonnement transversal) = spécificité des Schizosaccharomycètes.

Les levures forment des colonies coniques sur boîte de pétri, contrairement aux bactéries qui ont plutôt tendance à former des colonies plates et aux champignons dont le mycélium est facilement identifiable.

Leur taille (5 à 15µm) est supérieure à celle des bactéries (1 à 3 µm), ce qui permet de les observer facilement au grossissement 400.

PROTOCOLE

Le matériel permet de travailler en demi-groupe.

PRECAUTIONS :

Durant tout le TP, travailler près d'une flamme. Le matériel ne doit jamais quitter un rayon de 30 cm autour de la flamme et ne doit pas être posé sur la paillasse, même si celle-ci a été lavée à l'alcool. Les mains doivent être passées à l'alcool, mais en aucun cas cela ne permet de toucher la partie du matériel qui sera en contact avec les levures, les boîtes ou les solutions.

PREPARATION :

Préparation d'une suspension de levures de concentration comprise entre $5x10^4$ et 10^5 cellules/ml :

Cette étape sera réalisée par l'enseignant avant le début du TP.

Verser 5 ml d'eau stérile dans un tube stérile de 10 ml : Tube A.

Verser 20ml d'eau stérile dans un tube stérile de 50ml : Tube B.

Avec un ensemenceur stérile, prélever quelques colonies de levures isolées sur boîte de pétri, mettre en suspension dans le tube A puis agiter. Continuer jusqu'à l'obtention d'une **solution légèrement trouble**. Agiter énergiquement (au Vortex si possible), ainsi la solution est bien homogène.

Avec un compte-gouttes stérile, prélever 0,25 ml de cette solution (0,25ml = 1 graduation sur le compte-gouttes) et ensemencer dans 20ml d'eau stérile (tube B). Cette suspension sera utilisée pour ensemencer les boîtes de pétri préparées précédemment. Nous la noterons « **suspension C** », sa concentration doit être approximativement entre $5x10^4$ et 10^5 cellules/ml. Utiliser une lame de comptage pour s'assurer de la concentration, une concentration trop élevée peut fausser l'interprétation des résultats.

Note : Sur une lame de comptage KOVA, 10^5 cellules/ml ~ 1 levure/petit carré de comptage.

Utiliser une pipette stérile pour répartir par 1ml dans 20 tubes stériles de 5ml.

MANIPULATION

PREMIERE SEANCE :

Les deux manipulations proposées seront réalisées simultanément par les élèves

Fournir à chaque binôme :

*2 boîtes de pétri avec milieu YPD2.

*1ml de la suspension C.

*1 compte-gouttes stérile.

*1 étaleur stérile (le conditionnement de ces étaleurs ne permet pas d'en fournir un à chaque binôme dés le début de la séance, faire circuler les sachets au moment de l'ensemencement...).

*1 pastille d'adénine préparée précédemment (procéder comme pour les étaleurs.)

*1 scalpel stérilisé (lame passée à l'alcool puis à la flamme ou autoclavée).

*1 pince stérililisée pour le dépôt de la pastille d'adénine.

NB : Afin que le matériel reste stérile, ne faites pas manipuler tous les binômes en même temps et distribuez les compte-gouttes et les étaleurs au fur et à mesure.

1) A l'aide d'un compte-gouttes stérile, déposer deux gouttes de la suspension C (0,1ml) sur les deux boîtes de milieu de culture.

2) Utiliser l'étaleur stérile pour répartir la suspension sur la gélose de façon homogène. Attention à ne pas transpercer la gélose avec l'étaleur.

Agir par mouvements de va-et-vient délicats et éventuellement circulaires.

3) Laisser sécher les boîtes pendant dix minutes.

4) Avec une pince stérile, déposer une pastille d'adénine au centre d'une des deux boîtes de milieu.

5) Sur l'autre boîte, à l'aide d'un scalpel stérile, découper un carré de deux centimètres de coté dans la gélose, soulever ce morceau avec la lame et le retourner en le rabattant sur le reste de la gélose. Une zone de croissance anaérobiose est ainsi créée, les levures s'y développeront sans oxygène (ou avec peu d'oxygène...).

Si vous ne possédez pas de scalpels en nombre suffisant, faites circulez les scalpels en prenant soin de les stériliser à l'alcool et à la flamme entre chaque utilisation. Attention, la lame reste brûlante quelques dizaines de secondes, attendre le refroidissement avant de manipuler à nouveau.

6) Incuber les boîtes 5 jours à 28°C (ou une semaine à température ambiante si vous ne disposez pas d'étuve), couvercle vers le bas, puis conserver au réfrigérateur de la même manière jusqu'à la séance d'observation des résultats.

NB : Si un contaminant (type champignon par exemple) apparaît sur une boîte, écartez-la immédiatement pour éviter de contaminer les autres boîtes de la pile.

DEUXIEME SEANCE :

Réaliser l'observation et l'interprétation des résultats.

Fermer les boîtes de pétri avant l'observation, utiliser du Parafilm ou à défaut du ruban adhésif.

Cette étape permet d'éviter de mettre l'élève en contact avec un éventuel contaminant "indésirable".

FICHE RECAPITULATIVE

PREPARATION :

- Préparation des milieux de culture.
- Préparation des pastilles d'adénine.
- Préparation de la suspension à ensemencer (suspension C).

MANIPULATION :

- Ensemencement de la suspension C sur deux boîtes de milieu.
- Dépôt d'une pastille d'adénine sur l'une des deux boîtes.
- Découpe du rabat.
- Incubation 5 jours à 28°C ou une semaine à température ambiante.

NB : Placer tous les instruments dans l'eau de javel (concentration = 1%) en fin de manipulation.
Placer les boîtes dans de l'eau de javel (concentration = 1%) ou les autoclaver.
Ne pas toucher le milieu avec les mains et bien les laver en fin de séance (on ne contrôle pas forcément ce que l'on fait pousser sur un milieu complet.)

INTERPRETATION DES RESULTATS

REPRESSION CATABOLIQUE :

L'adénine présent sur la pastille va diffuser et un gradient de concentration va s'établir sur la boîte de pétri à partir de la pastille. Les colonies de levures qui vont pousser dans un certain rayon autour de la pastille resteront blanches.

Lorsque sa concentration dans le milieu est suffisamment élevée, l'adénine va inhiber le premier enzyme de sa chaîne de biosynthèse inhibant ainsi l'accumulation de l'AIR (voir chaîne de biosynthèse), donc la formation du pigment rouge. Les levures ne rougissent pas.

Le métabolite final inhibe la première étape de la chaîne par rétroinhibition, c'est la répression catabolique. Elle permet aux levures d'économiser l'énergie que leur coûterait la synthèse d'un métabolite disponible dans le milieu.

Cette expérience illustre l'adaptabilité des levures aux variations de leur milieu de culture. Les facteurs du milieu modulent l'expression de gènes impliqués dans les diverses chaînes de biosynthèse et modulent ainsi l'établissement du phénotype.

CROISSANCE ANAEROBIOSE

Le rabat de gélose forme une zone de croissance anaérobiose sur la boîte de pétri. Les levures qui vont se développer dans cette zone seront privées d'oxygène. Elles ne rougissent pas ou peu.

Le rougissement est un phénomène aérobiose (voir chaîne de biosynthèse).

Les conditions du milieu peuvent moduler l'établissement du phénotype en inhibant la synthèse d'une protéine.

Le génotype ne suffit pas à l'établissement du phénotype, les facteurs extérieurs entrent également en ligne de mire.

Ces deux expériences permettent de démontrer que le phénotype d'un individu ne dépend pas uniquement de son génotype mais également de l'environnement. Les différents facteurs du milieu activent ou inhibent la synthèse de protéines.

ATTENTION : Si au moment de l'étalement l'élève traverse la gélose avec son étaleur, les levures qui vont se développer sous la gélose seront blanches car la formation du pigment rouge est un phénomène aérobie.

Parentés entre les êtres vivants :

En culture in vitro cellulaire, il a été démontré qu'une concentration importante d'adénine entraîne la dégénérescence des neurones. C'est le cas chez les trisomiques 21 :

Chez l'être humain, on retrouve la chaîne de biosynthèse de l'adénine, le gène codant pour l'enzyme N°2 de cette chaîne est porté par le chromosome 21.

Les trisomiques 21 portent donc trois copies de ce gène. Etant donné que la régulation de la synthèse de l'adénine s'effectue sur la première étape de la chaîne, elle n'est plus correctement régulée

Quelques conseils complémentaires :

- Les levures en suspension dans l'eau peuvent éclater sous l'effet de la pression osmotique, il est conseillé de ne pas préparer les suspensions la veille du TP mais juste avant la manipulation.

- Lors de l'interprétation des résultats, des colonies de levures sont roses et non rouges. Elles doivent être considérées comme rouges, ces levures n'ont pas suffisamment " lancé " leur chaîne de biosynthèse de l'adénine et accumulé peu d'AIR. Cependant, dés qu'il y a accumulation du pigment, c'est que la levure est mutée sur Ade2 et pas sur les gènes en amont de la chaîne.

- Les lames de comptage sont impérative pour la préparation de la suspension cellulaire car une mauvaise concentration peut fausser les résultats finaux. En effet, s'il y a trop de levures sur la boîte de pétri, le rougissement est moins évident car les différentes colonies doivent se partager les constituants du milieu.

- Eviter la culture à 37°C et plus car la levure Ade2 semble thermosensible et ne pas bien rougir au delà de cette température.

- Après plus de 10 jours au réfrigérateur, les levures rouges ont tendance à blanchir (probablement par dégradation du pigment), tenez compte de ce paramètre !

Références Internet :

http://wwwusers.imaginet.fr/~pol

Se rendre dans le manuel de travaux pratiques virtuel.

Références bibliographiques :

« Travaux pratiques de Biologie des levures » de Didier POL Editions Ellipses.