

Mutagenèse dose dépendante aux UV chez des levures *Saccharomyces cerevisiae*, obtention de mutants auxotrophes.

On utilise une souche dite 1na prototrophe, haploïde, de signe sexuel a (Mating type a) stable (mutant *ho*) et une souche dite 1alpha prototrophe de signe sexuel alpha (Mating type alpha) stable (mutant *ho*)
Chaque souche est fournie sous forme d'une culture de 24 heures en bouillon YPD fortement agité, à 28°C.

Milieu YPD (yeast peptone dextrose) : extrait de levure 10g/L ; bactopectone 10g/L ; glucose 20 g/L.

J1

1. Mutagenèse aux ultra-violets (U.V.)

- Couler 10 milieux gélosés YPD en boîte de Pétri et faire sécher la surface 15 minutes à l'étuve ou sous enceinte à flux laminaire (selon les indications techniques indiquées). Les boîtes sont référencées UV₁, UV₂, UV₃, UV₄, UV₅, UV₆ et N₁, N₂, N₃, N₄. Les boîtes référencées UV_i seront inoculées après un traitement de l'inoculum par mutagenèse aux U.V. Les boîtes référencées N_i seront utilisées comme des témoins d'apparition d'UFC (unités formant colonies).
- Travailler avec la souche qui vous a été assignée. Diluer au 1/100 en eau distillée stérile sous un volume final de 20 mL et déterminer la concentration exacte en levures de la suspension ainsi obtenue l'aide d'une cellule de comptage de Malassez. A priori, la valeur doit être supérieure, aux alentours de 10⁶ cellules par mL. Voir aussi l'annexe n°1.
- Ajuster alors si nécessaire afin d'obtenir une suspension titrant entre 1.10⁶ et 2.10⁶ levures par mL (= suspension S).
- Réaliser alors 4 dilutions en cascade de raison géométrique 1/10 sous un volume final de 10 mL.
- Préparer la manipulation témoin de comptage, en absence de mutagenèse.

boîte	N1 (YPD en boîte de Pétri)	N2 (YPD en boîte de Pétri)	N3 (YPD en boîte de Pétri)	N4 (YPD en boîte de Pétri)
Inoculum (étalement en surface)	0,1 mL de de suspension à 1 à 2 10 ³ levures par mL	0,1 mL de de suspension à 1 à 2 10 ³ levures par mL	0,1 mL de de suspension à 1 à 2 10 ² levures par mL	0,1 mL de de suspension à 1 à 2 10 ² levures par mL
Incuber les boîtes ainsi inoculées à 30°C pendant 2 à 3 jours ou 4 à 5 jours à 25°C.				

- Réaliser la manipulation de mutagenèse U.V. Annoter 6 petites boîtes de Pétri stériles de 55 mm de diamètre UV₁, UV₂ ... UV₆. Puis travailler selon le tableau ci-dessous.

boîte	UV ₁	UV ₂	UV ₃	UV ₄	UV ₅	UV ₆
Introduire stérilement (en petite boîte de Pétri, après homogénéisation)	4,4 mL de suspension à 1 à 2 10 ³ levures par mL	4,4 mL de suspension à 1 à 2 10 ⁴ levures par mL	4,4 mL de suspension à 1 à 2 10 ⁴ levures par mL	4,4 mL de suspension à 1 à 2 10 ⁵ levures par mL	4,4 mL de suspension à 1 à 2 10 ⁶ levures par mL	4,4 mL de suspension à 1 à 2 10 ⁶ levures par mL
Réaliser l'exposition aux U.V.	Selon les consignes exposées ci-dessous					
	7s	11s	16s	21s	31s	37s
Inoculer les milieux YPD	Étalement en surface de 100 µL du contenu de chaque petite boîte exposée aux U.V (après homogénéisation douce). Les boîtes de milieu YPD seront annotées respectivement UV ₁ , UV ₂ ... UV ₆					
Incuber	Incuber les boîtes ainsi inoculées à 30°C pendant 2 à 3 jours ou 4 à 5 jours à 25°C. [Pour des raisons pratiques, on peut cultiver 24 heures à 48 heures à 30°C, puis transfert à 4°C pendant 4 jours, puis culture à 30°C pendant 2 jours ...]					

La lampe U.V. utilisée est à situer à 34 cm du plan de travail recevant les boîtes d'étalements de levures. Il convient d'être très précis sur la durée d'exposition des levures aux U.V. **Il convient de ne pas s'exposer personnellement aux UV en utilisant correctement l'écran souple de protection de l'appareillage, en se protégeant les mains par le port de gants et et les yeux par un écran facial adapté. Le regard, non protégé, ne doit jamais être exposé aux UV.**

Réaliser les expositions aux U.V. en procédant comme suit.

- Tracer une cible de la taille d'une boîte de Pétri de 55 mm, bien centrée sous le système d'éclairage U.V.
- Allumer le tube U.V. à l'avance pour que l'énergie débitée soit non fluctuante ; ne jamais intervenir dans la zone sous U.V. sans protection : gants et lunettes ;
- Mettre une boîte de Pétri UV_i à exposer en place dans la cible. Le plastique des boîtes de pétri se comporte en écran total aux U.V. Ainsi, tant que le couvercle est présent, l'exposition aux UV est nulle.
- Chronométrer la durée de l'exposition entre enlever et remettre le couvercle de chaque boîte.

- Exposer aux U.V. la boîte UV₁ pendant 7 s ; la boîte UV₂ pendant 11 s ; la boîte UV₃ pendant 16 s ; la boîte UV₄ pendant 21 s ; la boîte UV₅ pendant 31 s et la boîte UV₆ pendant 37 s. Après exposition, placer chaque boîte quelques minutes à l'obscurité.

Compte-rendu : manipulations réalisées pour le comptage en cellule de Malassez et résultats obtenus ; manipulations réalisées pour obtenir les 4 suspensions de levures nécessaires aux étalements et justifications.

J2, J3 et J4

2. Survivants et sélection des mutants auxotrophes

2.1 Survivants

Compte rendu. Discuter les résultats de la numération sur les boîtes N_i et calculer les taux de survivants sur les boîtes aux références UV_i (la numération des boîtes N_i servant de référence). Consigner les résultats dans le compte-rendu sous forme de tableaux judicieusement construits. Montrer que la cinétique de mortalité par l'exposition aux UV est une cinétique de premier ordre. Calculer le temps de réduction décimale, le temps de demi-vie et la vitesse spécifique de mortalité dans le cadre de l'exposition réalisée.

2.2 Sélection de mutants auxotrophes

C'est pour un taux de survivants vers 2 % que la population contient statistiquement le plus grand nombre de mutants auxotrophes (soit par exemple 30 colonies pour 1,5 10³ cellules au départ).

Les mutants auxotrophes sont décelés par réplique au velours des colonies survivantes :

- réplique sur milieu YNB^{wo/aa} minimum (seuls les levures prototrophes peuvent y cultiver) ;
- puis copie seconde sur milieu gélosé YPD (milieu de culture pour tous les survivants) ;
- et la « matrice YPD des survivants » est aussi conservée à 0-4°C.

Incuber pendant 48 heures à 30°C. Lire les résultats. Repiquer à la touche les colonies « candidat mutant auxotrophe » sur milieu YPD (plusieurs colonies peuvent être repiquées sur une boîte).

La composition du milieu YNB^{wo/aa} est la suivante : Yeast nitrogen base « sans aminoacides ni sulfate d'ammonium » 1,7 g/L ; sulfate d'ammonium 5 g/L ; glucose 20g/L ; agar 20g/L. La base Yeast nitrogen « sans aminoacides ni sulfate d'ammonium » est formé d'un cocktail de vitamines (biotine, thiamine, acide pantothénique ...concentrations finales de l'ordre de quelques µg/L), de traces de micro-nutriments minéraux et de KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄, 7H₂O, NaCl, CaCl₂, 6H₂O pour obtenir finalement et respectivement 0,85g, 0,15g, 0,5 g, 0,1g et 0,1g par litre de milieu final.

Compte-rendu. Expliquer pourquoi un candidat mutant auxotrophe ne cultive pas sur YNB et cultive sur YPD. Indiquer la boîte choisie pour réaliser les répliques. Consigner les résultats obtenus après incubation.

2.3 Cas particulier de certains mutants auxotrophes adénine négatifs

Certains mutants déficients pour la biosynthèse de l'adénine (phénotype ade-) sont très aisés à repérer car la mutation conduit à l'apparition de colonies rouges sur milieu YPD. Des éléments d'explication sont fournis ci-dessous.

Le tableau ci après résume la biosynthèse de l'AMP à partir du prpp (phosphorybosyl pyrophosphate) et qui implique de la glycine, de l'aspartate, de la glutamine ...L'AMP est alors convertible en ATP et dATP. L'ATP et le dATP sont les formes utilisées pour la biosynthèse des acides nucléiques ARN et ADN.

nom du gène	<i>ade4</i>	<i>ade5</i>	<i>ade8&3</i>	<i>ade6</i>	<i>ade7</i>	<i>ade2</i>
enzyme	↓ Enz1	↓ Enz2	↓ Enz3	↓ Enz4	↓ Enz5	↓ Enz6
produit	prpp → pra	→ gar	→ fgar	→ fgam	→ AIR	→ cair
produit	← AMP	← iads	← IMP	← faicar	← aicar	← saicar
enzyme	↑ Enz12	↑ Enz11	↑ Enz10	↑ Enz9	↑ Enz8	↑ Enz7
nom du gène	<i>ade13</i>	<i>ade12</i>	?	?	<i>ade13</i>	<i>ade1</i>

prpp : phosphorybosyl pyrophosphate ; pra, gar, fgar, fgam : intermédiaires non précisés ; AIR : phosphoribosyl aminoimidazole ; cair, saicar, aicar, faicar : intermédiaires non précisés ; IMP : inosine monophosphate ; iads : intermédiaire adénylosuccinate ; AMP : adénosine monophosphate.

On a montré que les mutants *ade1-* et *ade2-* cultivent et accumulent le produit intermédiaire AIR lorsqu'ils sont cultivés sur milieu YPD. Or il se trouve que ce produit se transforme en un pigment rouge en conditions de métabolisme respiratoire oxybiontique. Ainsi ces mutants de phénotype *ade-* forment des colonies rouges en aérobiose sur milieu YPD. Les mêmes mutants cultivés sur milieu YPD complétement en adénine ne forment pas de pigment rouge (ils n'accumulent pas AIR)

Compte-rendu. Repérer la présence de colonies rouges. Consigner les résultats dans le compte-rendu. Comment peut-on expliquer l'accumulation de AIR par les mutants *ade2* et *ade1* en culture sur milieu YPD alors que ce n'est pas le cas sur milieu YPD complétement en adénine? La composition de YPD est fournie en tête de ce document de travaux pratiques.

J5 et J6

3. Caractérisation des auxotrophies

Mettre en suspension (en eau stérile) les mutants auxotrophes obtenus et un témoin souche d'origine. Déposer en grille 10 μ L ou une touche de chaque suspension sur un milieu YPD, un milieu YNP^{wo/aa} et sur 9 milieux contenant les mélanges indiqués sur le tableau ci-après. Attention, comme on ne lave pas les souches pour réaliser les tests d'auxotrophie, les prélèvements doivent être très superficiels en évitant absolument toute trace de milieu de culture. (Si on teste peu de clones, on peut aussi ensemercer en stries jusqu'à 5 clones par boîte).

Lorsque les gouttes sont absorbées sur le milieu, incubé à 30°C pendant 3 jours.

Les suspensions troubles réalisées pour les ensemencements à la touche doivent être très peu denses afin d'éviter des artefacts de cadavérisme. Prévoir les boîtes de culture témoins (YNB^{wo/aa} et YPD)

Identifier les mutants. Expliquer dans le compte-rendu comment les 9 milieux utilisés permettent d'identifier les mutants. Pourquoi certains mutants ne cultivent que sur une seule des 9 boîtes ?

L'enseignant responsable de la séance de travaux pratiques indiquera un éventuel mutant à repiquer sur milieu YPD puis à conserver pour le souchier.

Nota bene. La lecture des résultats est parfois délicate : artefacts de très faible croissance par cadavérisme, souches débilitées qui montrent des croissances très faibles. Mais avec un peu de chance on trouvera des mutants auxotrophes qui ont gardé un bon potentiel de croissance et qui sont aisés à analyser.

Tableau de composition des 9 milieux pour caractérisation d'auxotrophie. Chaque milieu est constitué d'une base YNB^{wo/aa} complétement selon la ligne ou la colonne de référence du tableau ci-dessous.

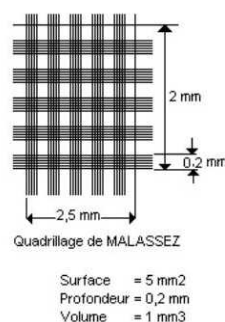
	1	2	3	4	5
6	ade	gua	cys	met	ura
7	his	leu	ile	val	lys
8	phe	tyr	trp	thr	pro
9	glu	ser	ala	asp	arg

Données bibliographiques

- Données fournies par Monsieur Revardel.
- D. Pol, dans « travaux pratiques de biologie des levures », ellipses, 1996, 156 pages.
- A. Wiseman (editor), dans « Genetically-engineered proteins and enzymes from yeast : production and control », Ellis Horwood limited, 1991, 203 pages.
- J.A. Barnett, R.W. Payne et D. Yarrow dans « Yeast : characteristics and identification », Cambridge University Press, 2nd edition, 1990.
- J.R. Dickinson, M. Schweizer dans « The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae* », Taylor & Francis Ltd, 1999, 343 pages.
- <http://www.biochem.emory.edu/labs/acorbe2/yeastUV.html>
- Shinji Hashimoto, Mayumi Ogura, Kazuo Aritomi, Hisashi Hoshida, Yoshinori Nishizawa, and Rinji Akada ; Isolation of Auxotrophic Mutants of Diploid Industrial Yeast Strains after UV Mutagenesis ; Applied and Environmental Microbiology, January 2005, p. 312-319, Vol. 71, No. 1

Annexe 1 : cellule pour numération de Malassez

La lamelle étant correctement positionnée, prélever un petit volume de suspension à dénombrer avec une pipette Pasteur, toucher soigneusement le côté de la lamelle couvre-objet avec la pointe de la pipette et laisser la chambre se remplir par capillarité. Ne pas sur-remplir ou sous-remplir.



Annexe 2 : données concernant l'action du rayonnement U.V. sur l'ADN

Les rayons ultraviolets (U.V.) agissent comme un puissant agent mutagène.

Les U.V. entraînent des lésions de l'ADN comme la formation de liaisons covalentes entre bases ou avec des résidus aminoacyls de protéines voisines. Les UV induisent en particulier la formation de liaisons covalentes entre deux pyrimidines (thymine ou cytosine) successives sur un brin ADN ; il y a alors formation d'un dimère déformant localement la double hélice d'ADN. La duplication de l'ADN est ainsi empêchée.

Il existe des systèmes enzymatiques de réparation qui, notamment, sont capables d'exciser les zones de dimères et de recopier la région excisée sur le modèle du brin complémentaire restant. Mais ces systèmes peuvent être « dépassés » par l'ampleur des lésions et ils « réparent » alors selon une activité qui ne peut plus prétendre à une totale fidélité au modèle initial : ils conduisent ainsi à des mutations.

L'effet mutagène des U.V. est létal à forte dose lorsque les mécanismes de réparation sont complètement débordés par l'ampleur des « réparations à effectuer ».

Annexe 3 : Données sur les suppléments du milieu YNB^{wo/aa}

Selon le tableau suivant. Pour compléter le milieu minimum YNB^{wo/aa}.

	solvant	concentration solution stock en g/L	concentration finale dans le milieu en mg/L	en mL de solution stock à ajouter par L de milieu (ou à étaler sur une boîte de pétri ¹)
Ala	eau	10	30	3 (0,1)
Asp	eau	10	30	3 (0,1)
Arg	eau	10	30	3 (0,1)
Cys	eau	10	30	3 (0,1)
Glu	eau	10	30	3 (0,1)
His	eau	10	20	2 (0,1)
Ile	eau	10	20	2 (0,1)
Leu	eau	10	30	3 (0,1)
Lys	eau	10	30	3 (0,1)
Met	NaHCO ₃ 5g/L	10	20	2 (0,1)
Phe	dissoudre en NaOH 2,5 mol/L puis dans l'eau	10	50	5 (0,1)
Pro	eau	10	30	3 (0,1)
Ser	eau	80	400	5 (0,1)
Thr	eau	40	200	5 (0,1)
Trp ²	NaHCO ₃ 5g/L	10	20	2 (0,1)
Tyr	HCl 0,05 mol/L	2	30	15 (0,2)
Val	eau	30	150	5 (0,1)
Adénine sulfate	HCl 0,05 mol/L	2	20	10 (0,2)
Guanine	HCl 0,05 mol/L	2	20	10 (0,2)
Uracile	NaHCO ₃ 5g/L	2	20	10 (0,2)

- 1. nécessite un étalement parfait de la solution de supplément.
- 2. ne doit pas être autoclavé avec le milieu de culture. A ajouter après autoclavage.