

Lorsque tu manipules des levures, tu dois veiller à ne pas contaminer le gel nutritif sur lequel tu vas les déposer, avec des micro-organismes de l'environnement (de la peau, des cheveux, de la salive, de l'air, de l'eau, des outils...).

Aussi, tu dois respecter certaines règles d'hygiène et de sécurité avant, pendant et après la mise en culture :

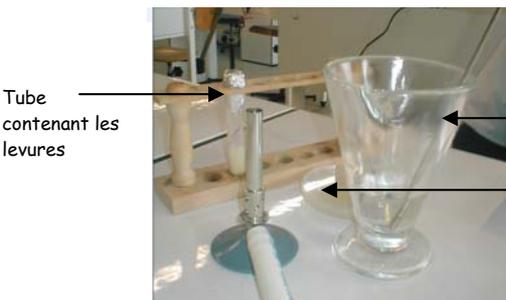
1/ Avant la mise en culture :



Protège tes vêtements à l'aide d'une blouse et noue tes cheveux s'ils sont longs.
Lave soigneusement tes mains avec un antiseptique (laisse les sécher).



Désinfecte ton plan de travail avec un chiffon imbibé d'eau de javel.
Place le bec bunsen au centre du plan de travail et allume le (sans que sa flamme dépasse 10 cm) pour permettre l'asepsie de l'air.



Öse +
verre à pied
Boîte de
Pétri

Dispose dans la zone stérile délimitée par un cercle d'une vingtaine de cm de rayon autour du bec bunsen le matériel que tu vas utiliser :

- un tube contenant la suspension de levures
- une boîte de Pétri contenant le gel nutritif
- un öse (= ensemenceur) placé dans un verre à pied contenant

2/ Pendant la mise en culture :

Laisse toujours le matériel dans le rayon de 20 cm autour du bec bunsen.

Ne touche pas la partie de l'öse qui sera en contact direct avec les levures et ne pose pas l'öse directement sur la table.

N'ouvre le tube contenant les levures et la boîte de Pétri que dans un environnement situé à 10 cm de la flamme du bec bunsen.

Evite de bouger brusquement et de parler pour ne pas projeter de micro-organismes.

Ne porte pas tes mains à la bouche.

3/ Après la mise en culture :

Eteins le bec bunsen.

Dépose le tube vide qui contenait la suspension de levures sur le plateau prévu à cet effet (à l'endroit indiqué par ton professeur)

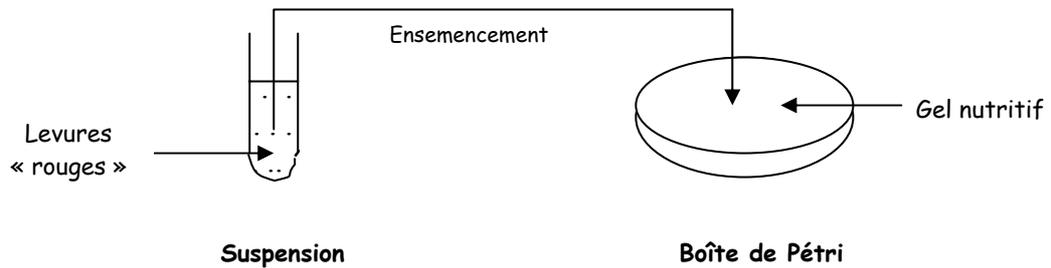


Dispose le bec bunsen et le verre à pied contenant l'öse sur le côté de ton plan de travail de telle sorte que tu puisses le désinfecter avec le chiffon imbibé d'eau de javel.

Ton binôme et toi, dirigez vous vers la lampe à UV avec la boîte de Pétri que vous venez d'ensemencer...

Principe de la manipulation :

Introduire des levures rouges en suspension dans un tube, sur le gel nutritif d'une boîte de Pétri (= ensemencer).

**Suis ce protocole consciencieusement pour réaliser la mise en culture :**

Ton binôme et toi, devez toujours **manipuler dans la zone stérile autour de la flamme du bec bunsen (10 cm)**:



L'un de vous 2, saisit le tube contenant les levures en suspension :

- L'agite doucement,
- Enlève et pose sur la table le papier en aluminium qui le ferme
- L'incline, ouverture vers la flamme (pour éviter la chute de poussière à l'intérieur)



L'autre, saisit la boîte de Pétri :

L'entrouvre et maintient le couvercle ouvert de l'autre main



Celui de vous 2 qui tient le tube contenant les levures :

- Dépose la suspension de levures près d'un bord de la boîte de Pétri (tenue par l'autre), sur le gel nutritif.
- Dépose le tube vide sur son portoir



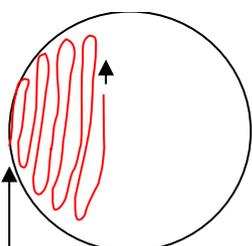
Le même :

- Saisit l'öse dans le verre à pied et le stérilise en passant rapidement son extrémité à la flamme (attendre quelques secondes son refroidissement)
- Entraîne le dépôt de levures en le déplaçant en zig-zag sans labourer le gel :

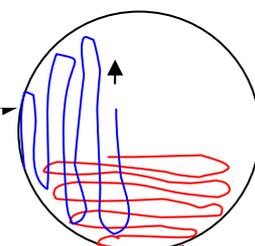
1^{er} passage

2^{ème} passage

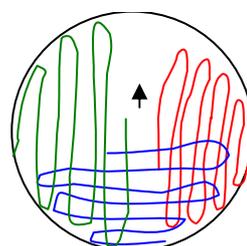
3^{ème} passage



Tourner
1/4 tour



Tourner
1/4 tour



Dépôt initial

A la fin du 3^{ème} passage : - Ferme rapidement la boîte de Pétri avec son couvercle

- Passe à nouveau l'öse à la flamme et redépose le dans le verre à pied

A partir du point de dépôt initial des levures :

- Progresse en zig-zag de haut en bas, avec l'öse sur la moitié de la surface du gel
- Fais tourner la boîte d'un quart de tour et recommence 2 fois (2^{ème} et 3^{ème} passage)

Suite TP 2^{nde} **IRRADIATION DES LEVURES ROUGES PAR LES UV** *Conditions de sécurité*

Lorsque tu utilises une lampe à UV (Ultraviolets), tu dois respecter certaines règles de sécurité pour éviter de t'exposer aux irradiations.

Respecte ces quelques règles de sécurité pour réaliser l'irradiation:



Protège tes yeux à l'aide des **lunettes anti-UV**

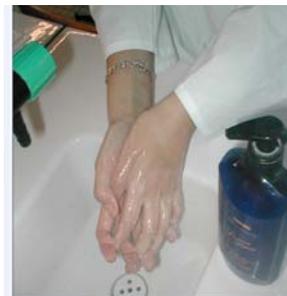
Vérifie que la lampe à UV soit bien **éteinte** avant que tu n'introduises dessous ta boîte de Pétri.

Ne retire ta boîte de Pétri et n'enlève les lunettes que lorsque tu as éteint la lampe à UV, (donc quand le temps d'irradiation est terminé).

☀️ N'enlève les lunettes et n'introduits tes mains sous la lampe à UV que lorsqu'elle est éteinte.

Après l'irradiation :

- Enlève ta blouse
- Lave toi soigneusement les mains avec un antiseptique



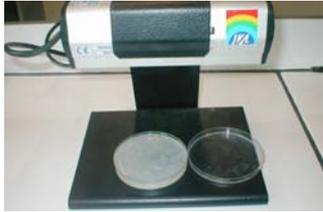
Suite TP 2^{nde} IRRADIATION DES LEVURES ROUGES PAR LES UV

Fiche technique

Principe de la manipulation :

Exposer les levures rouges (en culture dans la boîte de Pétri) sous une lampe à UV, pour les irradier pendant un temps précis.

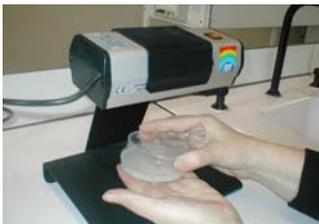
Suis ce protocole consciencieusement pour réaliser l'irradiation:



- Dépose la boîte de Pétri sous la lampe à UV éteinte.
- Enlève le couvercle (car il stoppe les radiations UV) et place le à l'envers, à côté de la boîte de Pétri (pour qu'il reste stérile)



Prends le chronomètre et démarre le au moment où tu allumes la lampe.



- Eteins la lampe et le chronomètre lorsque le temps d'irradiation prévu est atteint.
- Referme la boîte de Pétri à l'aide de son couvercle.
- Repositionne le chronomètre au « 0 ».



- Dépose la boîte de Pétri renversée (couvercle en bas) sur le plateau prévu à cet effet (à l'endroit indiqué par ton professeur).
- Maintiens la fermée à l'aide de scotch



- Inscris dessus, au marqueur, tes initiales et celles de ton binôme, ainsi que le temps d'exposition aux UV.

La semaine prochaine...

D'ici à la semaine prochaine, les levures « mères » (rouges) que tu as mises en culture sur la boîte de Pétri et que tu as irradiées vont se diviser et former des colonies de levures « filles ».

Ainsi, en reprenant ta boîte de Pétri, tu pourras analyser les conséquences de l'irradiation des levures par les UV.

☞ D'ici là, réfléchis aux résultats que tu dois obtenir...

Ce TP intervient en classe de 2^{nde}, dans la partie du programme : « Cellules, ADN et unité du vivant ».

D'un point de vue cognitif, il permet d'étudier l'effet mutagène des UV sur les levures et d'en déduire que les UV (= facteurs de l'environnement) agissent directement sur l'ADN en provoquant des mutations.

D'un point de vue méthodologique, il permet une initiation à la microbiologie : découverte des milieux de culture, des techniques de repiquage et de manipulation en conditions stériles.

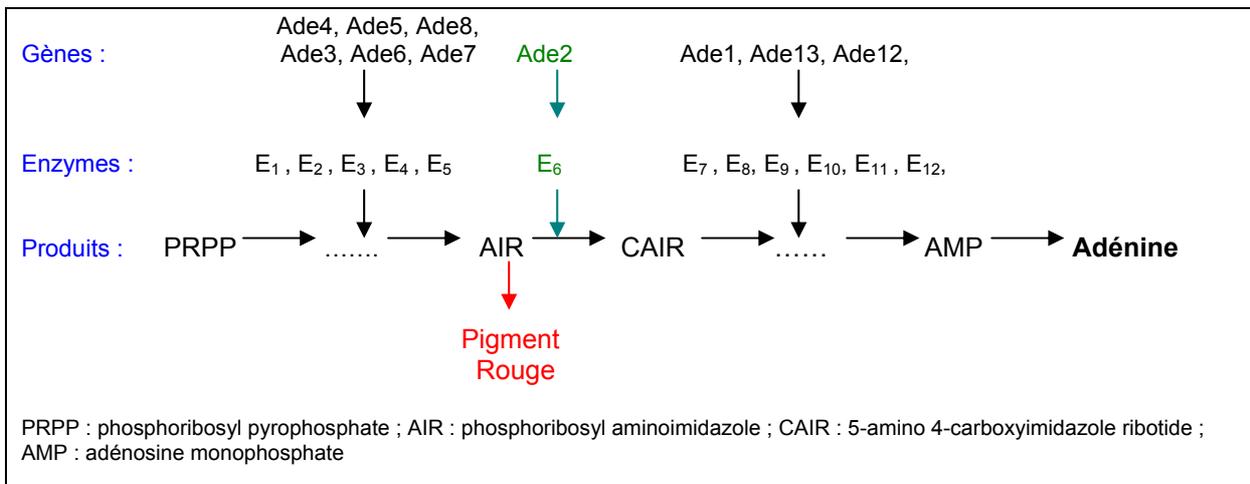
1/ Caractéristiques des souches de levures utilisées

La souche de levure utilisée est *Saccharomyces cerevisiae Ade2-*.

Cette souche porte une mutation qui affecte le gène Ade2, impliqué dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine.

Cette chaîne de biosynthèse de l'adénine réalisée dans le cytoplasme des levures fait intervenir successivement plusieurs enzymes (et donc gènes) et substrats ; elle est présentée simplifiée ci-dessous :

CHAÎNE DE BIOSYNTHESE SIMPLIFIÉE DE L'ADÉNINE :



Ainsi, en présence d'O₂, le gène Ade2 permet la transformation de l'AIR en CAIR, précurseur de l'adénine.

Les souches mutées Ade2- utilisées en TP, possèdent le gène Ade2 muté et sont donc incapables de transformer l'AIR en CAIR ; l'AIR se transforme alors en pigment rouge et la biosynthèse de l'adénine n'a pas lieu.

2/ Principe du TP

En TP, les levures mutées Ade2- mises en cultures par les élèves sur les boîtes de Pétri, à partir d'une suspension, doivent normalement synthétiser le pigment rouge et donc former après quelques jours de mise en culture **des colonies rouges**.

La manipulation réalisée par les élèves au cours de ce TP, consiste donc, outre le repiquage qu'ils réalisent, à exposer les levures repiquées à des radiations UV et donc à observer l'apparition de **colonies mutantes blanches** (n'ayant pas synthétisé le pigment rouge), dont la fréquence d'apparition est d'autant plus élevée que la durée d'exposition aux UV est longue.

3/ Organisation du TP

Le TP se déroule sur 2 séances d' 1h30 chacune :

▪ 1^{ère} séance :

Le TP est introduit en redéfinissant avec les élèves la notion de variabilité de l'information génétique et donc la notion d'allèles, étudiée dans le TP précédent.

Les élèves sont alors amenés à s'interroger sur **l'origine de la variabilité génétique**, c'est à dire l'origine des différents allèles d'un même gène.

Une 1^{ère} activité consisterait à : Observer et interpréter la variabilité génétique d'une culture de levures rouges

Il s'agit alors de présenter aux élèves une boîte de Pétriensemencée avec des levures Ade2-rouges et de leur faire observer que parmi les colonies de levures rouges, quelques unes (en nombre très réduit) présentent un phénotype blanc.

→ *Il est possible pour le professeur d'ensemencer lui même avec les levures Ade2-, quelques boîtes de Pétri, 1 semaine avant le TP et de les conserver à T°C ambiante, couvercle en bas (dans ce cas s'assurer de l'apparition d'une ou 2 colonies blanches) ou d'utiliser le manuel de l'élève dans lequel sont présentées des photos de boîtes de Pétriensemencées avec des levures rouges.*

Il convient dans cette 1^{ère} activité de faire réfléchir les élèves sur l'origine des quelques colonies blanches apparues spontanément.

Ainsi, en indiquant aux élèves que le repiquage d'une des colonies blanches sur une autre boîte de Pétri, engendre des colonies qui, toutes, sont blanches, ils en déduisent que la « blancheur » des colonies est déterminée par le matériel génétique.

De plus, en leur indiquant que cette « blancheur » est due à l'absence de synthèse d'un pigment rouge par les levures, ils en déduisent alors que **l'apparition de colonies blanches est due à une modification de l'information contenue dans un des gènes responsables de la fabrication du pigment rouge**, cette modification ayant conduit à l'absence de fabrication du pigment rouge.

Il convient ensuite de définir la notion de **mutation (dans ce cas, spontanée)**.

Cette 1^{ère} activité, outre son intérêt d'aborder la notion de mutation, est également l'occasion de rappeler aux élèves les notions de cellules mères et cellules filles et donc de caractères héréditaires transmissibles de génération en génération.

Une 2^{ème} activité consisterait à : étudier les conséquences de l'irradiation d'une culture de levures rouges par les UV

Chaque binômeensemence une boîte de Pétri par des levures Ade2- en suspension, puis place cette culture sous la lampe à UV pendant une durée précise et différente d'un binôme à l'autre (15, 30, 60, 80 s).

Il est nécessaire d'ensemencer une ou 2 boîtes de Pétri témoin (0 s sous les UV). Des binômes peuvent la réaliser, mais leur frustration de ne pas irradier leur boîte peut amener le professeur à lui-même réaliser les boîtes témoins.

Pour réaliser la mise en culture et l'irradiation, les élèves doivent suivre des règles d'hygiène et de sécurité (Cf fiches élèves jointes).

Après l'irradiation, les boîtes de Pétriensemencées sont soit mises à incuber (couvercle vers le bas) par le professeur pendant 5 jours à 28°C (étuve) puis conservées au réfrigérateur (de la même manière) jusqu'à la séance suivante, soit placées 1 semaine à T°C ambiante.

▪ 2^{ème} séance :

Chaque binôme analyse les résultats de son ensemencement et évalue le nombre de colonies rouges et de colonies blanches par une technique simple de dénombrement (ex : technique du carré échantillon) et en déduit alors le nombre total de colonies et le **pourcentage de colonies blanches par rapport au nombre total de colonies**.

Ensuite, les résultats de chaque binôme sont mis en commun dans un tableau et discutés de leur validité et de leur exploitation possible.

Exemple de résultats possibles pour les dilutions données :

Temps d'exposition aux UV (s)	Nombre total de colonies	Nombre de colonies rouges	Nombre de colonies blanches	% de colonies blanches
0	6940	6732	208	3
15	6019	5237	782	13
30	2290	1901	389	17
60	1024	707	317	31
80	853	469	384	45

Sur l'ensemble des boîtes de Pétriensemencées, la probabilité que des contaminants (type champignon par exemple) apparaissent sur quelques boîtes est élevée.

Ainsi, cette séance est aussi l'occasion pour les élèves de comprendre l'importance d'ensemencer en conditions stériles et de vérifier qu'ils aient alors bien suivi les conditions d'hygiène requises.

Après avoir étudié l'origine des mutations et défini ce que sont les **agents mutagènes**, il convient dans cette séance d'étudier les conséquences des mutations, par exemple chez l'homme, à partir de l'étude des cancers (le cancer de la peau permet de faire un lien direct avec ce qui a été vu précédemment en montrant l'effet des UV sur l'ADN des cellules épidermiques et donc de sensibiliser les élèves aux effets néfastes des expositions prolongées au soleil).

4/ Intelligibilité des résultats obtenus

L'absorption de l'énergie des UV par l'ADN entraîne la formation de dimères de thymines adjacentes, ce qui provoque des cassures au sein de la molécule dues à des distorsions de la double hélice.

Souvent ces cassures sont réparées par des enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN, mais ces enzymes peuvent commettre des erreurs et donc produire des mutations. Ainsi, plus ces enzymes sont sollicitées, plus le risque d'apparition de mutations est important.

Dans notre TP, les UV peuvent introduire des mutations à 3 niveaux de la chaîne de biosynthèse de l'adénine :

- dans un gène en amont du gène Ade2- : la voie de biosynthèse de l'adénine est donc stoppée avant que ne soit synthétisé le pigment rouge : les colonies sont donc blanches
- dans le gène Ade2- : cette mutation rétablit alors la fonctionnalité de ce gène ; les levures n'accumulent donc plus l'AIR et peuvent à nouveau synthétiser l'adénine : les colonies sont blanches
- dans un gène impliqué dans la chaîne respiratoire : cette mutation entraîne l'absence de production d'énergie nécessaire au fonctionnement des enzymes de la voie de biosynthèse qui est alors stoppée avant que ne soit synthétisé le pigment rouge : les colonies sont blanches

Les mutations les plus probables engendrées par les UV sont les 1ères.

La diminution du nombre total de colonies plus la durée d'exposition aux UV est longue s'explique par l'effet létal des mutations qui trop nombreuses ne permettent plus la survie des cellules.

5/ Obtention et préparation des souches de levures et des milieux utilisés dans le TP

➤ Obtention :

Il est possible d'obtenir la souche de levures Ade2- et les milieux nécessaires à sa mise en culture par *Jeulin* ou *Sordalab*. En commandant le Kit « *Mutagenèse : effet des UV sur la souche Ade2-* », on reçoit :

- la souche de levures Ade2-,ensemencée sur une boîte de Pétri
- des milieux présentés sous différentes formes : en poudre à reconstituer puis couler ; à couler (pré stérilisés) ou déjà coulés sur boîtes de Pétri
- le matériel nécessaire à l'ensemencement (il est possible de ne commander que ce dont on a besoin)

Il est également possible de recevoir la lampe ou la boîte à UV, en option dans ce kit.

➤ Préparation :

- Dans le cas où les milieux commandés sont à couler, quelques jours avant le TP, le préparateur coule les milieux nutritifs dans les boîtes de Pétri stériles et les conserve au réfrigérateur couvercle vers le bas (pour éviter la chute de l'eau de condensation sur la gélose) jusqu'au TP.
- 1/2 heure avant le début du TP, le professeur prépare pour les 2 groupes (s'ils se suivent) la suspension de levures Ade2-, livrée initialement sur une boîte de Pétri : Cette préparation nécessite de travailler en milieu stérile (dans les mêmes conditions que les élèves) et donc de travailler sur un plan de travail stérile, à proximité de la flamme d'un bec bunsen avec des instruments stériles (*modalités de stérilisation : cf 6/*). Il s'agit pour le professeur d'isoler (avec un cure-dent stérile par ex) quelques colonies (une vingtaine) de la souche Ade2- livrée sur la boîte de Pétri et de les mettre en suspension dans un flacon contenant 10 ml d'eau stérile et d'agiter jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Il s'agit ensuite d'effectuer une dilution de cette « suspension mère » au 1/10 (pour 5 ml de « suspension mère », compléter à 50 ml avec de l'eau stérile) et d'en répartir 1 ml (ou 2 ml au maximum) dans différents petits tubes (1 par binôme). Chaque petit tube est ensuite recouvert par un papier d'aluminium. NB : Il est possible d'effectuer un comptage des levures avant de diluer la « suspension mère » pour déterminer la concentration en levure de la suspension préparée (la méthode est expliquée sur la notice jointe au Kit).

6/ Règles d'hygiène et de sécurité à respecter pour le TP

➤ Moyens d'aseptiser ce qui est en contact (direct ou non) avec les levures

Les mains : elles doivent être lavées soigneusement avant le TP (après également !) soit avec :

- un antiseptique (vendu en pharmacie, par exemple),
- ou - du savon puis passées à l'alcool à 90° et laissées séchées à l'air libre

L'antiseptique est préférable car son toucher et son odeur sont plus agréables pour les élèves et parce qu'il est non inflammable (l'utilisation de l'alcool est dangereuse à proximité de la flamme d'un bec bunsen)

En aucun cas, les élèves ne doivent se laver les mains à l'eau de javel diluée qui est très irritante.

L'air : il est aseptisé par la flamme d'un bec bunsen dans un périmètre de 10 cm de rayon autour de la flamme du bec bunsen ou par le cône de chaleur d'un bec électrique, dans un périmètre de 10 cm de rayon autour du cône.

Le plan de travail : il est désinfecté, avant et après la mise en culture, avec un chiffon imbibé d'eau de javel diluée (au 1/5^{ème} : 1 berlingot du commerce de 250 ml pour 1 l d'eau) ou d'alcool à 70 ou 90 °.

Pour les mêmes raisons que précédemment, préférer l'eau de javel (non inflammable) à l'alcool, à condition toutefois d'exiger la présence d'une blouse protégeant les vêtements du risque de décoloration.

Le matériel :

Avant le TP :

Le matériel métallique est stérilisé à l'eau de javel ou à l'alcool à 90° et peut être passé à la flamme.

Les tubes, flacons et pipettes utilisés pour réaliser les cultures sont :

- passés à l'autoclave à 120° pendant 1/2 h
- ou - stérilisés dans le panier d'une cocotte-minute contenant 0,5 l d'eau (laisser tourner la soupape pendant 1/2 h à partir de sa mise en rotation)
- ou - stérilisés au four à micro-ondes, munis d'un bouchon en coton cardé pendant quelques min à 650W.

NB : Au cours de la stérilisation à l'autoclave ou à la cocotte-minute, les flacons ou les tubes ne doivent jamais être fermés hermétiquement : recouvrez les orifices des flacons obturés par du coton cardé avec du papier d'aluminium également.

Après le TP : tout le matériel contaminé doit être désinfecté à l'eau de javel avant d'être lavé ou avant d'être jeté s'il s'agit de matériel à usage unique.

➤ L'utilisation de la lampe à UV pendant le TP

Il existe 2 types de lampe à UV :

- la boîte d'irradiation : elle permet de travailler en sécurité car la lampe à UV se trouve dans un « coffre » en plastique et les rayonnements UV sont donc arrêtés. Sa contenance permet d'irradier plusieurs boîtes de Pétri en même temps, ce qui permet un gain de temps.
- La lampe à UV « à découvert » : elle n'isole pas l'individu l'utilisant des rayonnements UV qu'elle émet et nécessite donc de prendre des précautions particulières pour ne pas exposer la peau ou les yeux aux UV.

Il est donc souhaitable de porter des lunettes et des gants anti-UV. En l'absence de gants, il est indispensable de sensibiliser les élèves au fait qu'ils ne doivent pas introduire leur main sous la lampe tant que celle-ci n'est pas éteinte.

➤ Sécurité à respecter lors de l'observation des résultats

Le professeur et les élèves ne doivent pas toucher le milieu de culture avec les mains lors de la lecture des résultats (on ne contrôle jamais totalement ce que l'on fait pousser sur un milieu). Aussi, il est indispensable de fermer les boîtes de Pétri juste après leur ensemencement avec des morceaux de scotch et d'interdire les élèves de les enlever pour soulever le couvercle, même si la buée rend l'observation difficile.

➤ La gestion du devenir des milieux de culture après le TP

Lorsque l'on manipule des micro-organismes, il faut veiller à ne pas polluer l'environnement avec nos expériences (surtout lorsque l'on a favorisé les mutations des micro-organismes par les UV). Il est donc indispensable lorsque les résultats ont été observés de placer les boîtes de Pétri dans de l'eau de javel ou de les autoclaver.

7/ Quelques conseils pratiques,

➤ La conservation des milieux de culture

Les milieux de cultureensemencés peuvent être conservés plusieurs jours au réfrigérateur, couvercle en bas, de telle sorte que l'eau due à la condensation ne tombe pas sur les levures.

➤ Gestion de l'attente des élèves pour réaliser l'irradiation aux UV

Pour éviter que plusieurs binômes attendent de passer leur boîte de Pétriensemencée sous les UV, il est possible de faire observer des levures au microscope à ceux qui ne sont pas occupés par l'irradiation.