

## TP2 : Influence des rayonnements UV sur la mutagenèse du gène ADE2 chez la levure

Une mutation est une modification de la séquence de l'ADN. Elle peut apparaître naturellement ou être provoquée par des agents appelés *mutagènes*. Les rayonnements ultraviolets (UV) font partie des agents mutagènes physiques : ils peuvent endommager l'ADN des cellules.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme unicellulaire souvent utilisé en laboratoire. Le gène **ADE2** intervient dans la fabrication de l'adénine, un constituant essentiel des cellules. Ici lorsque ce gène fonctionne normalement, les colonies de levures sont rouges. En revanche, lorsqu'une mutation touche le gène **ADE2**, les levures produisent un pigment blanc : les colonies deviennent blanches ou crème.

### Comment la durée d'exposition aux UV influence-t-elle l'apparition de mutations du gène ADE2 chez la levure ?

#### Objectifs :

- Réaliser une expérience de mutagenèse par les UV.
- Appliquer les règles de stérilité lors de manipulations microbiologiques.
- Observer un lien entre mutation génétique et phénotype.
- Compter et analyser des résultats expérimentaux à l'aide du logiciel Mesurim par deux méthodes différentes.

**Vous allez ensemencer** quatre boîtes de Petri avec la même souche de levure, puis **exposer** chaque boîte à des rayonnements UV pendant 0 s, 15 s, 30 s et 60 s. Après incubation, **vous allez compter** le nombre total de colonies et le nombre de colonies rouges afin de **calculer la proportion de levures mutées**.

**Vous comparerez** ensuite les résultats obtenus pour les différentes durées d'exposition afin de **déterminer l'effet des UV sur la fréquence de mutation du gène ADE2**.

#### Matériel

- Levures *Saccharomyces cerevisiae* (gène ADE2 fonctionnel)
- Boîtes de Petri contenant un milieu gélosé
- Bec électrique
- Anse de platine (ou boucle d'ensemencement)
- Lampe UV
- Chronomètre
- Marqueur
- Incubateur
- Ordinateur avec le logiciel Mesurim

#### Consignes de sécurité

- Porter une blouse et des lunettes de protection.
- Ne jamais regarder directement la lampe UV.
- Ne pas exposer la peau aux UV.
- Allumer la lampe UV uniquement avec l'autorisation du professeur.
- Manipuler le bec électrique avec précaution (risque de brûlure).
- Se laver les mains après la manipulation.

#### Règles de stérilité

- Porter un masque
- Travailler près du bec électrique allumé afin de limiter les contaminations.
- Stériliser l'anse de platine à la flamme avant et après chaque utilisation.
- Ne jamais poser l'anse stérile sur la paillasse.
- Ouvrir les boîtes de Petri le moins longtemps possible.

### 1) Suivre la démonstration du professeur et réaliser le protocole, vous êtes en équipe 4 (deux binômes)

#### Protocole expérimental

##### **3. Exposition aux UV**

- Retirer le couvercle de la boîte au moment de l'exposition.
- Exposer les levures aux UV selon les durées suivantes :
  - 0 s : témoin (pas d'UV)
  - 15 s
  - 30 s
  - 60 s
- Remettre le couvercle après chaque exposition.

##### **4. Incubation**

- Fermer les boîtes.
- Placer les boîtes à l'incubateur pendant le temps indiqué par le professeur.

##### **1. Préparation des boîtes**

- Étiqueter quatre boîtes de Petri : **0 s, 15 s, 30 s, 60 s**.

##### **2. Ensemencement (consignes du professeur)**

- Stériliser l'anse de platine à la flamme du bec électrique.
- Prélever une petite quantité de levures.
- Étaler les levures sur toute la surface de la gélose.
- Refermer immédiatement la boîte.
- Répéter l'opération pour chaque boîte.

## **2) Origine génétique des modifications observées :**

Les UV provoquent des dommages sur l'ADN, comme la formation de dimères de thymine. Lors de la réPLICATION de l'ADN, ces dommages peuvent entraîner des erreurs. Si une mutation touche le gène **ADE2**, la levure ne fabrique plus correctement l'adénine et un pigment blanc s'accumule. Les colonies blanches correspondent donc à des levures mutées.

### **a) Comparaison des gènes ADE2 normal et muté avec Anagène :**

L'observation du phénotype (couleur des colonies) permet de suspecter l'existence de mutations. Afin de relier ces observations à une modification de l'ADN, une comparaison de séquences du gène ADE2 est réalisée à l'aide du logiciel Anagène et le fichier ade2.

1. Repérer les différences entre les séquences (substitution, insertion ou délétion de nucléotides).
2. Retrouver la position du dimère de thymine
3. Traduire les séquences en acides aminés si nécessaire.
4. Comparer les protéines obtenues.

### **Exploitation**

- Identifier la ou les mutations présentes dans le gène ADE2 muté.
- Mettre en relation la mutation de l'ADN avec une modification de la protéine ADE2.
- Expliquer comment cette modification peut empêcher le fonctionnement normal de l'enzyme et conduire à l'apparition de colonies blanches.

### **b) Exploitation des résultats avec Mesurim :**

Vous allez estimer les colonies de levures par de méthodes :

#### **Par comptage :**

1. Récupérer les différentes photographies dans le dossier TP ADE2.
2. Importer les images dans Mesurim.
3. Compter le nombre total de colonies.
4. Compter le nombre de colonies rouges.
5. Calculer la proportion de colonies mutées pour chaque durée d'exposition.
6. Comparer les résultats obtenus.

#### **Par mesure de surface :**

1. Importer les images
2. Dans mesurer prendre Surface et faire l'échelle (diamètre de la boite = 10 cm) et validez
3. Puis couleur et cliquer sur une colonie (vous pouvez ajuster le résultat avec la barre de seuil)
4. La valeur de la surface apparaît (attention à l'unité)

Comparer les résultats obtenus par les deux méthodes, quelle est celle qui vous semble la plus fiable, justifier

## **3) Faites un bilan général l'activité**