

Emilie veut prolonger son bronzage l'hiver venu. Elle compte aller « faire des UV » en Institut de beauté. Elle confie son projet à son amie, qui ne réagit pas bien. Pauline : Si tu veux avoir un cancer de la peau c'est comme ça qu'il faut faire !

Emilie n'avait pas pensé à tout ça. Elle ne sait plus vraiment si c'est une bonne idée. Alors UV, danger pour la santé ? Risque de Cancer ? Info ou intox ?

Certains produits chimiques (molécules cancérogènes) et rayonnements (UV, rayons gammas, rayons X) sont dangereux pour la santé car ils ont un **pouvoir mutagène**. Nous savons qu'ils désorganisent le fonctionnement de la cellule en produisant des **mutations**. Les mutations sont des changements de séquence de l'ADN qui peuvent avoir des conséquences sur la protéine produite et sur les caractères (phénotype) de l'être vivant étudié.

On cherche, par des mises en culture de levures, à montrer que l'exposition répétée aux UV augmente le taux de mutation e l'ADN

DOCUMENT DE RÉFÉRENCE

Document 1 : L'origine des cancers

Les cancers sont des maladies dues à une multiplication incontrôlée de certaines cellules, causées par une accumulation de mutations.

Document 2 : Des Souches de levures comme modèle

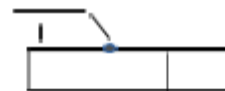
Les levures sont de petits champignons unicellulaires, que l'on utilise souvent comme modèle à la place des cellules humaines. L'industrie agroalimentaire en a sélectionné de nombreuses souches, chacune ayant ses propres caractéristiques, par exemple la forme des colonies* (qui peut être variable selon les espèces) mais surtout par leur capacité à réaliser certaines réactions chimiques.

Certaines souches de levures, comme **Ade2**, sont notamment utilisées en lycée : elles possèdent l'allèle *ade2⁻* du gène *ade2* qui est responsable de la couleur des levures, ce qui entraîne l'accumulation d'un composé à l'origine d'une coloration rouge. Mais elles deviennent blanches lorsqu'une séquence d'ADN du gène *Ade2* est mutée.

Document 3 : La culture de levures

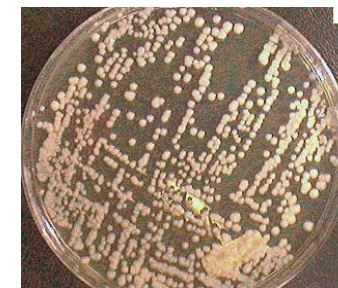
Le cycle cellulaire des levures dure environ 90 mn. Si on la cultive sur un milieu contenant tous les éléments nutritifs nécessaire, une levure peut se multiplier suffisamment pour former un amas visible à l'œil nu, appelé colonie, en quelques jours.

1 levure



Après 4 jours à 30°C

1 colonie de levures



**Une colonie regroupe de très nombreuses levures ayant la même information génétique car issues de la multiplication d'une levure initiale par mitoses successives.*

UTILISER DES TECHNIQUES : MATERIEL ET CONSIGNES

ETAPE 1: A l'aide du document ressource et de la liste du matériel à disposition, **rédigez une proposition de stratégie** afin de montrer que les UV induisent des mutations dans l'ADN.

Quelle(s) expérience(s) ? Comment la réaliser ? Quels résultats attendus ? Envisager des témoins, Envisager comment mesurer l'effet des UV.

Appelez le professeur pour vérification



ETAPE 2: Réalisez la manipulation en suivant le protocole proposé



Veillez scrupuleusement à respecter les consignes de sécurité en ce qui concerne la manipulation en milieu stérile afin d'obtenir les résultats escomptés.

CETTE ETAPE EST NOTEE PAR VOTRE ENSEIGNANT

NB : La croissance des levures nécessite 4 à 7 jours à 37°C. Pour la suite du TP, vous utiliserez donc les résultats proposés par le professeur

Appelez le professeur pour vérification

Matériel à disposition :

- suspension de levures ade2-
- séquences nucléotidiques de levures

Matériel stérile de mise en culture des levures:

- boîtes de Pétri avec milieu nutritif pour les levures
- bec électrique
- râteau à ensemer
- pipette pasteur stérile
- alcool ou javel

- enceinte à UV
- chronomètre
- marqueur indélébile

- Fiche protocole « Réaliser une mise en culture de levure en conditions stériles »
- Fiche technique « Anagène »
- Logiciel ANAGENE
- Logiciel MESURIM

Précautions de la manipulation



PROTOCOLE: REALISER UNE MISE EN CULTURE DE LEVURES EN CONDITIONS STERILES

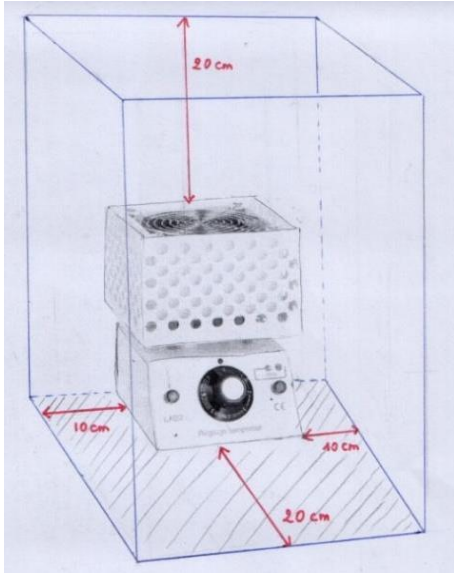
1. Préparer la paillasse pour la manipulation en champs stérile

- **S'attacher** les cheveux si nécessaire,
- **Fermer** la blouse
- **Se laver** les mains au savon et **s'essuyer** les mains avec du papier propre
- **nettoyer** la paillasse avec de l'eau de javel diluée.

- **placer** le bec électrique au centre de la paillasse.

- **Veiller** à placer tout le matériel nécessaire dans la zone de stérilité créée par le bac électrique (voir photo ci-contre).

- **Allumer** le chauffage pour délimiter une « sphère » stérile. Laisser chauffer 10 min.
(Ne jamais laisser un chauffage sans surveillance.)



Les risques biologiques :

Le milieu de culture utilisé convient très bien à d'autres microbes dont certains peuvent être pathogènes. Pour cette raison : **La manipulation doit se faire dans des conditions stériles**

2. Mettre les cellules / ensemercer une boîte de Pétri gélosée

1. **Sans l'ouvrir**, indiquez sur le côté de la boîte de pétri **votre numéro de binôme au feutre** puis à l'aide du tableau ci-dessous, **rajouter** sur le fond de chaque boîte le **temps d'exposition aux UV**

N° binôme	N° de boîte	Temps d'exposition aux UV
Binôme 1,3 5 et 7	Boîte 1	Témoin (0 s)
	Boîte 2	30 s
Binôme 2, 4, 6 et 8	Boîte 1	60 s
	Boîte 2	90 s

2. **Agiter** les suspensions de cellules avant la mise en culture

3. **Ouvrir** le tube à proximité du chauffage (milieu stérile)

4. **Verser** tout le contenu du tube dans la boîte de Pétri et faites de légers mouvements circulaires pour **étaler de façon uniforme** la suspension sur toute la gélose (*procédez comme pour étaler de la pâte à crêpe!!*).

5. **Incliner** légèrement la boîte et retirer l'excédent à l'aide de la pipette pasteur

6. **Déposer** votre pipette et son contenu dans le pot de javel.

7. Laisser la boîte entrouverte pendant quelques minutes afin de laisser sécher la préparation puis refermez-la.

APPELER L'ENSEIGNANT POUR VERIFICATION

8. **Apporter** la boîte près de l'enceinte à U.V. (lampe éteinte). **Placer la boîte dans l'enceinte.**

9. **Enlever le couvercle** de la boîte de Pétri et le **placer à l'envers à côté de la boîte**. **Allumez** la lampe et **exposer votre boîte aux U.V.** durant le temps indiqué sur le fond de la boîte

10. **Eteindre la lampe** et **remettre** le couvercle de la boîte de Pétri

11. **Sortir** la boîte et la **poser** sur votre table, couvercle vers le bas. **Vos boîtes seront placées** en incubateur à 30°C.

12. **Ranger, nettoyer au besoin** la paillasse puis appelez votre enseignant

Sécurité

PRECAUTIONS DE MANIPULATION



L'eau de Javel est corrosive

Consignes de sécurité : Utilisation des rayons ultraviolets (risque de lésions graves aux yeux et peau)

- L'enceinte à U.V. doit être **ouverte uniquement la lampe éteinte !**
- Ne pas tenter de voir la lampe.
- Ne pas y manipuler mains nues, la lampe allumée.



UTILISER DES TECHNIQUES : LOGICIELS MESURIM - EXCEL

ETAPE 3: Traitez les résultats obtenus:

- Utilisez le logiciel MESURIM 2 pour dénombrer les colonies rouges et blanches aux différents temps d'exposition grâce aux photographies fournies.
→ Accès à Mesurim 2 via le lien internet: <https://www.pedagogie.ac-nice.fr/svt/productions/mesurim2/>

A l'aide de la fiche technique à disposition **ouvrir le fichier "Boîte 15sec.jpg" puis compter** sur la photo le nombre de colonies normales et mutantes en vous servant des fonctions du logiciel.

- Ouvrez dans Excel, le fichier « *Tableau levures.xlsx* »
 - Donner un titre à chaque colonne et un titre au tableau
 - Saisir les résultats de votre comptage dans le tableau

On prendra pour la boîte témoin (Os): 490 colonies de levures rouges et 3 colonies blanches

Recommencer la même manipulation pour chaque photo de boîte : "Boîte 45sec.jpg" et "Boîte 90sec.jpg"

Tracer le graphique représentant le **nombre de colonies en fonction du taux d'exposition aux UV** ET le **pourcentage de colonies blanches en fonction du temps d'exposition aux UV**
(Aidez-vous de la fiche technique Excel)

Mettez-en forme votre graphique (titre, nom des axes...)

APPELEZ LE PROFESSEUR POUR IMPRIMER VOS RESULTATS

Matériel à disposition

logiciel de traitement de données (MESURIM)

Utiliser l'outil comptage



UTILISER DES TECHNIQUES : Logiciel Anagène de visualisation des séquences d'ADN, d'ARN et de protéines

ETAPE 4: Analysez vos résultats.

- Décrire les courbes obtenues sur vos graphiques.
 - Traitez les séquences nucléotidiques afin de comprendre la différence entre les levures Ade2- et Ade2+
- Pour cela utilisez le logiciel ANAGENE pour comparer les séquences Ade2 des levures rouges et blanches :
- Lancez le logiciel ANAGENE et Ouvrez le fichier « **ade2.edi** »
 - Ade2Allèle1 correspond à l'allèle Ade2+ et Ade2Allèle2 correspond donc à l'allèle Ade2 -
 - Faire une comparaison par « alignement avec discontinuité »

Matériel à disposition

logiciel de traitement de données (ANAGENE)

Comparer des séquences de même nature, utiliser une comparaison avec discontinuité.



RÉPONDRE À LA PROBLÉMATIQUE DE DÉPART

ETAPE 5: REDIGEZ UNE CONCLUSION QUI REPONDE AU PROBLEME POSE ET EXPLIQUE L'ACTION DES UV

Rédiger un texte scientifique

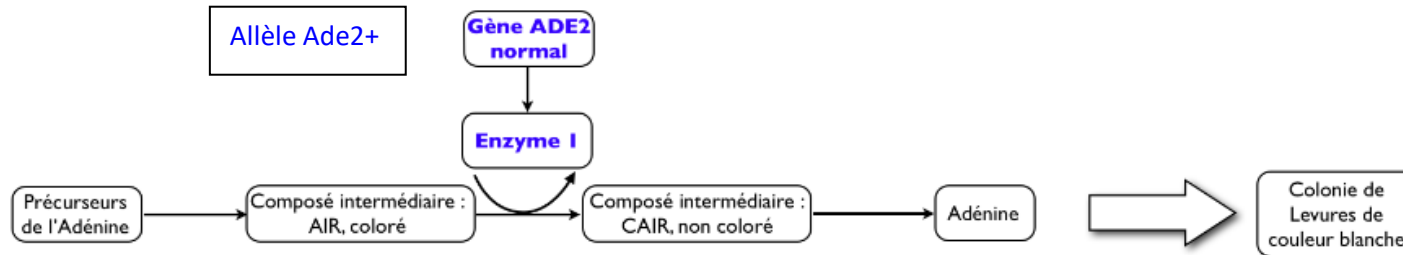
On a vu que ... Or on sait que ... Donc ...

Utiliser le vocabulaire scientifique, donner des arguments, des valeurs, faire les liens entre les observations et les connaissances.

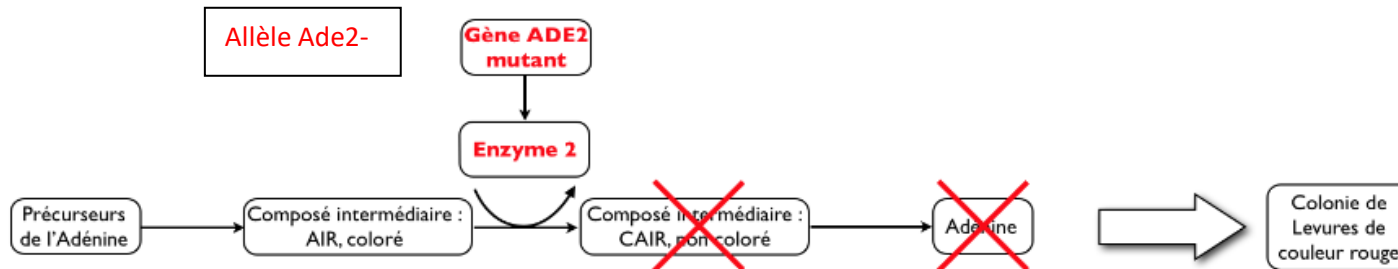


Document :

Mécanismes en jeu lors de la production d'une colonie de Levures de couleur blanche (Phénotype sauvage)



Mécanismes en jeu lors de la production d'une colonie de Levures de couleur rouge (Phénotype mutant)



Aide à la compréhension du document 1:

Les levures de la souche **ade2 +** sont capables de synthétiser de l'**adénine**, une substance qui donne une couleur crème à la colonie. La synthèse de l'adénine se fait selon une chaîne de transformation complexe qui dépend de l'expression de plusieurs gènes. Ces gènes codent pour des enzymes (= protéines) qui permettent la transformation d'un produit initial (PRPP) en produits intermédiaires jusqu'au produit final.

Les levures de la **souche ade2-** ont la particularité de donner des colonies de couleur rouge. Elles sont, en effet, incapables de transformer une substance, le AIR en CAIR. Ce composé (AIR) s'accumule, s'oxyde et donne un pigment rouge, responsable de la couleur décrite.