



# THEME 1A - Transmission, variation et expression du patrimoine génétique

## TP8 - Les mutations et la variabilité de l'ADN



Certains produits chimiques (molécules cancérogènes) et rayonnements (UV, rayons gamma, rayons X) sont dangereux pour la santé car ils ont un **pouvoir mutagène**. Ces agents 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. Nous allons étudier une mutation qui modifie la couleur des levures (*Saccharomyces cerevisiae*). En effet, elles possèdent un **gène Ade2** qui est responsable de la production d'un pigment rouge.

**Problématique : Comment les UV peuvent-ils modifier l'ADN et le phénotype d'un être vivant ?**

**Matériel :** Manuel Belin p34-41

- Suspension de levures Ade2 (normales : rouge, mutées : blanches) - Boîtes de Pétri stériles contenant le milieu YPD permettant la culture des levures
- Pipette, étaleur, gants, lunettes, charlotte (*facultatif*), masque, lampe UV permettant d'irradier l'ADN
- Ordinateur muni du logiciel **MESURIM2** et du logiciel **GenieGen2** et leurs banques de données

Activités et déroulement des activités	Capacités et critères de réussite
<p>➤ <b><u>ETAPE 1 : Proposez une stratégie expérimentale</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Proposez une stratégie</b> qui permette de déterminer que les UV induisent des mutations dans l'ADN, ce qui a des conséquences sur le phénotype.</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>📞 Appelez le professeur pour vérification</b></p> <p>➤ <b><u>ETAPE 2 : Mettez en œuvre le(s) protocole(s) proposé(s)</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Réalisez la manipulation de mutagenèse des levures</b> en suivant le protocole proposé.</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>📞 Appelez le professeur pour vérification</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Utilisez le logiciel MESURIM2 pour dénombrer les colonies rouges et blanches</b> aux différents temps d'exposition grâce aux les photographies fournies.</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>📞 Appelez le professeur pour vérification</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Utilisez le logiciel GenieGen2 pour comparer les séquences Ade2</b> des levures rouges et blanches et identifier l'impact sur la protéine produite.</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>📞 Appelez le professeur pour vérification</b></p> <p>➤ <b><u>ETAPE 3 : Présentez vos résultats selon une forme judicieuse</u></b></p> <p>➤ <b><u>ETAPE 4 : Rédigez une conclusion qui réponde au problème posé</u></b></p> <p><b>En fin de séance, rangez le matériel utilisé et nettoyez la paillasse.</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Concevoir une stratégie</b> <i>Quoi, Comment, Attendu ?</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Envisager des <b>témoins</b>, Envisager comment <b>mesurer l'effet</b> des UV.</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Réaliser une manipulation en suivant un protocole expérimental</b> <i>Travailler proprement et TRES CALMEMENT</i></p> <p style="text-align: center;"><i>NB : La croissance des levures nécessite 4 à 7 jours. Vous utiliserez donc les photographies des boîtes de pétri à 7 jours pour réaliser la suite du TP.</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Utiliser un logiciel de traitement de données (MESURIM2)</b> <i>Utiliser l'outil comptage, trouver les photos dans la banque ; annoter les catégories. Si les colonies sont trop nombreuses, restreindre le comptage à la moitié ou le quart de la boîte (attention aux calculs nécessaires).</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Utiliser un logiciel de traitement de données (GenieGen2)</b> <i>Comparer des séquences de même nature, identifier la mutation sur l'ADN, identifier la conséquence sur la séquence protéique, paramétrer correctement l'échelle de numérotation (ADN ou Protéines).</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Communiquer à l'écrit</b> <i>Choisir le mode de représentation des résultats et leur interprétation</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Rédiger un texte scientifique</b> <i>On a vu que ... (avec des valeurs, des éléments précis : nature et position de la mutation) Or on sait que ... (précision du vocabulaire) Donc ...</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Gérer et organiser le poste de travail</b></p>

# Protocole de mutagenèse chez les levures (Ade2) en conditions « quasi » stérile

## Matériel :

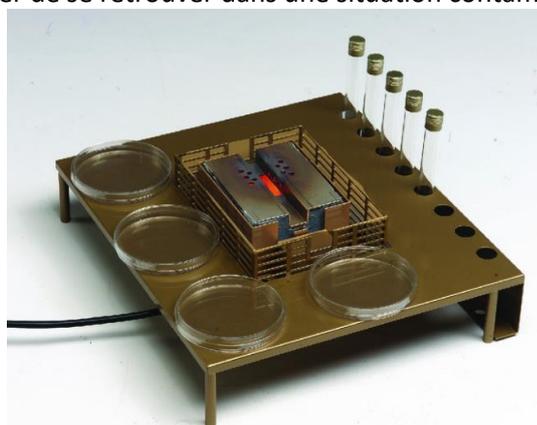
- Plan de travail : **STERILE si actif : la chaleur soulève l'air et évite les contaminations.**
- Tube de suspension de Levures (souche rose Ade2<sup>-</sup> mutante) **STERILE** → Déjà sur la table stérile
- Boîtes de Pétri avec milieu de culture gélosé **STERILE** → Déjà sur la table stérile
- Ensemenceur (bleu) – **Stérilisé par un bain de Javel** → A placer sur la table stérile **allumée**
- Pipette Pasteur – **Stérilisé par un bain de Javel** → A placer sur la table stérile **allumée**
- Hotte à U.V. (à faire fonctionner 1 ou 2 minutes pour la stériliser et assurer une efficacité maximale)
- Eau de Javel
- Gel hydroalcoolique
- Pince en bois
- Feutre

## 1- Avant la manipulation :

**ATTENTION : Faire pousser des Levures n'est pas un acte dangereux mais 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 les plus stériles possibles en suivant ces règles simples :**



- **On travaillera à moins de 20 cm de la « table stérile »**
- **N'ouvrir les tubes ou la boîte qu'au dernier moment**
- **Se déplacer au minimum, ne pas faire de courant d'air, pas d'excitation ou d'agitation**
- **Ne pas tousser, rire, parler et souffler près du plan de travail**
- **Utiliser un masque pour éviter de contaminer par les mouvements respiratoires**
- La blouse est propre et fermée
- Les cheveux sont attachés et emballés dans une charlotte (si disponible : facultatif)
- Le plan de travail et le matériel ont été stérilisés à la javel
- **Les mains devront être désinfectées** au gel hydroalcoolique (et on ne touche plus à ses cheveux, mains ...)
- **Anticiper chaque geste** pour éviter de se retrouver dans une situation contaminante.



Photographie d'une table stérile

## Astuce :

On *annote* généralement les boîtes sur le « fond », qui contiendra ensuite la gélose car le couvercle pourrait être « échangé ».

## 2- Réalisation de la boîte de culture :

- **Se laver les mains** et les désinfecter au gel hydroalcoolique (si possible)
- **Se munir de la pince** en bois
- **Aller chercher un tube de milieu gélosé** fondu à la paillasse professeur
- **Ramener ce tube à votre paillasse** et le placer sur le porte-tube de la table stérile

**Attention : les portes tubes des bcs électriques sont haut et les tubes risquent de tomber !**

- Sans ouvrir la boîte, **indiquer au feutre vos noms, votre classe, votre groupe**, ainsi que le **temps d'exposition**
- **Placer la boîte** (non ouverte) sur la table stérile
- **Dévisser le tube de milieu gélosé**
- **Ouvrir délicatement la boîte** (en laissant le couvercle à moins de 20 cm de la source de chaleur)
- **Vider l'intégralité du tube** dans la boîte
- **Refermer la boîte rapidement** puis la **placer sur la paillasse** (refroidissement plus rapide)

### 3- Mise en culture des levures :

- Vérifier que la boîte a bien figé (10 à 15 minutes), on doit pouvoir la retourner
- Agiter la suspension de Levures (celles-ci se déposent au fond du tube)
- Ouvrir le tube de levure sans faire entrer d'air et sans toucher le bord du tube (**à 20 cm !**)
- Prélever un peu de la suspension avec la pipette Pasteur (**à 20 cm !**)
- Déposer une goutte au centre de la boîte de pétri maintenue entrouverte
- Etalez la goutte avec l'ensemenceur de façon uniforme en faisant des stries TRES DOUCEMENT (gélose fragile)



Photographie de l'ensemenceur

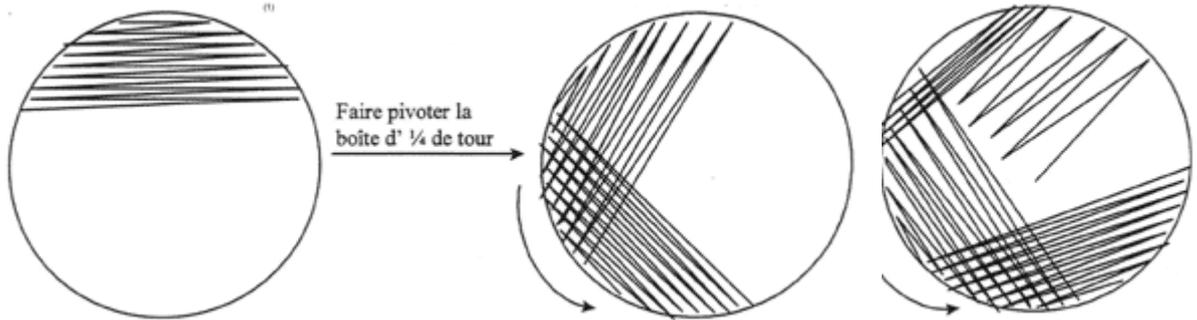


Schéma du principe de l'ensemencement par stries

### 4- Exposition aux UV :

**ATTENTION : Les UV utilisés dans cette expérience sont très efficaces pour muter l'ADN (longueur d'onde spécifique : 254 nm) et ils sont très concentrés (forte intensité) !!**

- La lampe s'éteint automatiquement quand on ouvre
- Enlever le couvercle de la boîte de Pétri et le placer à l'envers à côté de la boîte
- Si les couvercles sont nombreux, les empiler « face à face »
- Régler le minuteur sur 30 secondes
- Appuyer sur le bouton rouge
- Dès que la lampe s'éteint (OUT s'éteint), vous pouvez recommencer (si votre temps est 60 ou 90 s)
- Sortir la boîte de Pétri de l'enceinte à U.V.
- Refermer rapidement (mais calmement) le couvercle puis déposer votre boîte sur la pailleuse professeur
- Ranger votre pailleuse



Photographie de la mutabox (enceinte à UV)

Ici le bouton d'allumage est bleu

#### **Astuce :**

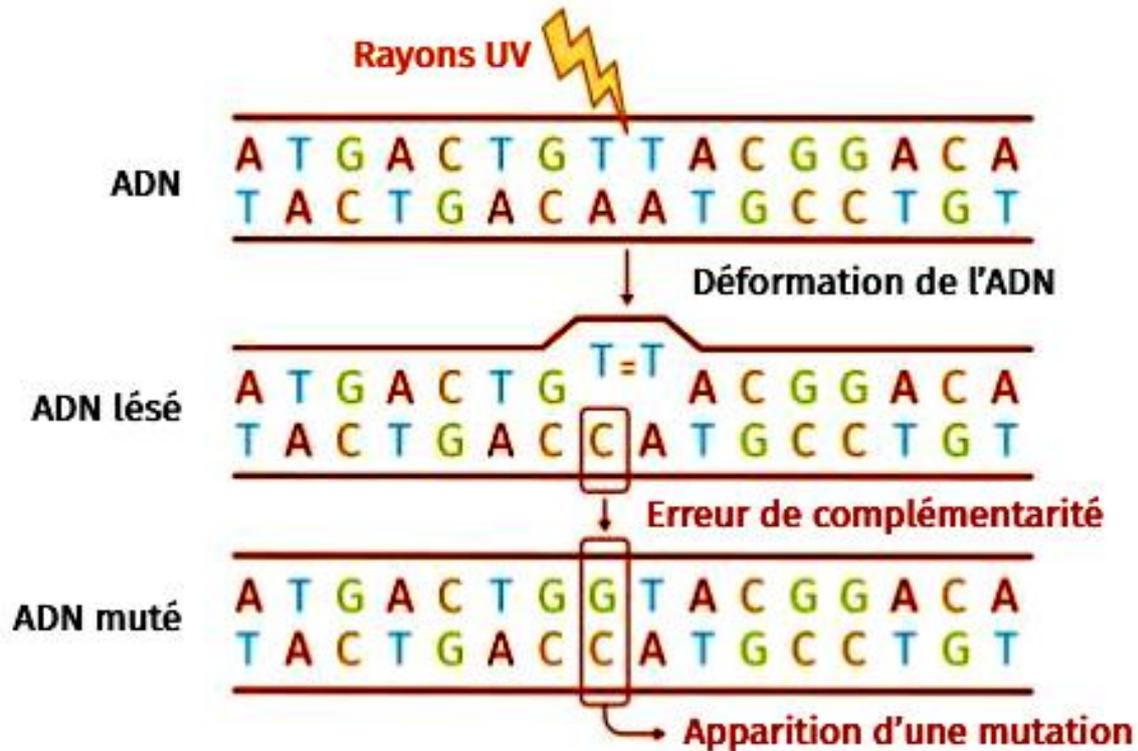
Le plastique arrête les UV (le risque est donc très faible tant que la boîte à UV est fermée).

#### **DONC**

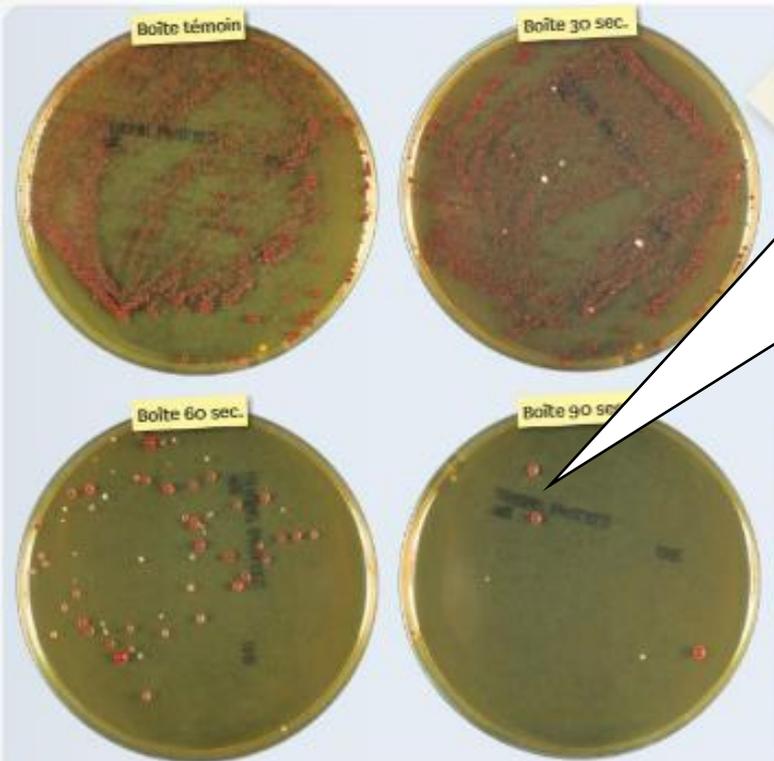
Ne pas oublier d'ouvrir les boîtes de Pétri sinon, les levures ne seront pas irradiées.

### Document 1 : L'action des UV sur l'ADN

Les UV sont des agents mutagènes qui augmentent fortement le taux de mutations de l'ADN. Généralement, les UV agissent sur les Thymines (T) qui vont se lier entre elles : on parle de formation de **dimère de thymine**. Ceci déforme l'ADN et contribue à des erreurs de réplication ou d'appariement de l'ADN, ce qui cause la mutation.



### Document 2 : Mesurer l'effet des agents mutagènes sur les levures Ade2 (doc 1 p36 BELIN)



Les levures sont des **unicellulaires eucaryotes** (avec noyau), entourées par une paroi.

Ces cellules sont normalement isolées mais lorsqu'on les cultive sur une boîte de Pétri, chaque cellule se multiplie et forme un petit dôme (tas) qu'on appelle une **colonie**.

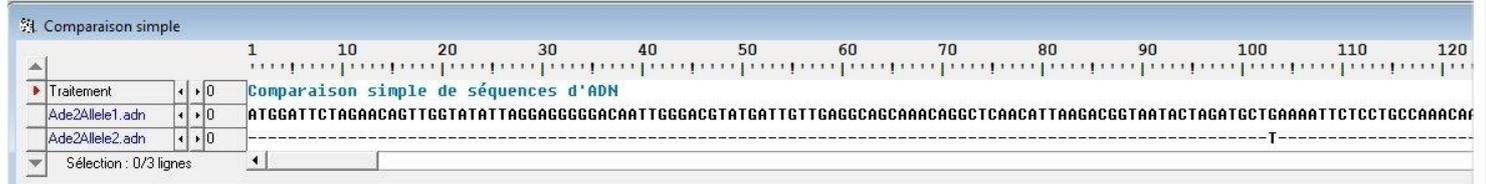
Les colonies présentent la couleur correspondant à celle des levures qui la composent.

Durée d'exposition (en secondes)	0	30	60	90
Nombre de colonies rouges	22 000	4 100	220	15
Nombre de colonies blanches	3	40	40	10

**1** L'étude de l'effet des rayons ultra-violet (rayons UV) sur les levures *ade2<sup>-</sup>*. Le gène *ade2* intervient dans le processus de synthèse de l'adénine (une base de l'ADN). Les levures *ade2<sup>-</sup>* portent l'allèle *ade2<sup>-</sup>* du gène *ade2*. La présence de cet allèle entraîne l'accumulation, au sein des cellules, d'un composé (dénommé «AIR»), ensuite oxydé en un pigment rouge. Différentes mutations, touchant le gène *ade2* ou d'autres gènes, empêchent la synthèse du composé AIR ou son oxydation: les colonies de levures sont alors blanches.

### Document 3 : Identifier et présenter des mutations

Les levures Ade2 blanches sont mutées. Pour rechercher la mutation, on utilise Anagène, après avoir séquencé l'ADN de cette levure.



Capture d'écran Anagène montrant la comparaison des séquences des levures rouges et blanches

### AIDE ETAPE 3

Pour présenter les résultats, il faut :

- Lister quelques codons (triplets de nucléotides) pour les 2 séquences : 4 à 5
- Vous pouvez utiliser les tirets pour montrer que les séquences sont identiques
- Encadrer la mutation
- Annoter sa position (n°)
- Faire de même pour les séquences de protéines

### Document 4 : L'effet des UV et les cabines à UV (doc 3 p 37 BELIN)

Le lien entre l'exposition aux UV artificiels des cabines de bronzage et les cancers de la peau a été étudié. Plus de 100 000 femmes scandinaves ont été suivies pendant 14 ans. Le risque relatif (RR) lié à la fréquentation de ces cabines a ainsi pu être déterminé. Depuis juillet 2009, les UV émis par les appareils de bronzage artificiels sont classés dans le groupe des agents cancérigènes (favorisant l'apparition de cancers) certains. Les cancers sont des maladies dues à une multiplication incontrôlée de certaines cellules, causée par une accumulation de mutations.

$$\text{Risque relatif} = \frac{\text{risque de développer une maladie si l'on est exposé à un facteur}}{\text{risque de développer cette maladie si l'on n'est pas exposé à ce facteur}}$$

Fréquence d'utilisation des cabines	Durée d'utilisation	Risque relatif
≥ 12 fois par an	≥ 20 ans	2,4
	≤ 10 ans	1,4
≤ 10 fois par an	20 à 30 ans	1,2
Nulle	-	1,0

### Document 5 : L'effet de mutagènes plus puissants : la radioactivité

Le 26 avril 1986, en Ukraine, un réacteur de la centrale nucléaire de Tchernobyl explose, répandant un gigantesque nuage radioactif dans la région. Considéré comme le pire accident nucléaire de l'histoire, cet événement a encore des répercussions sur la biosphère. En effet, les éléments radioactifs ont une longue durée de vie et continuent de contaminer les sols de la région. Des chercheurs ont étudié les effets de la radioactivité sur l'ADN d'une espèce d'arbre commune de la région, le pin sylvestre. Pour cela, ils ont mesuré la dose de radioactivité dans les sols et les cônes (structures qui portent les graines) et estimé la fréquence des mutations dans les cellules des graines de pins dans différents sites contaminés depuis plus de 30 ans.

Site	Dose de radioactivité mesurée (en mGy.an <sup>-1</sup> )	Fréquence de mutations
1	0,02	0,003
2	0,23	0,008
3	10	0,009
4	19,4	0,020
5	33,1	0,041
6	38,6	0,054

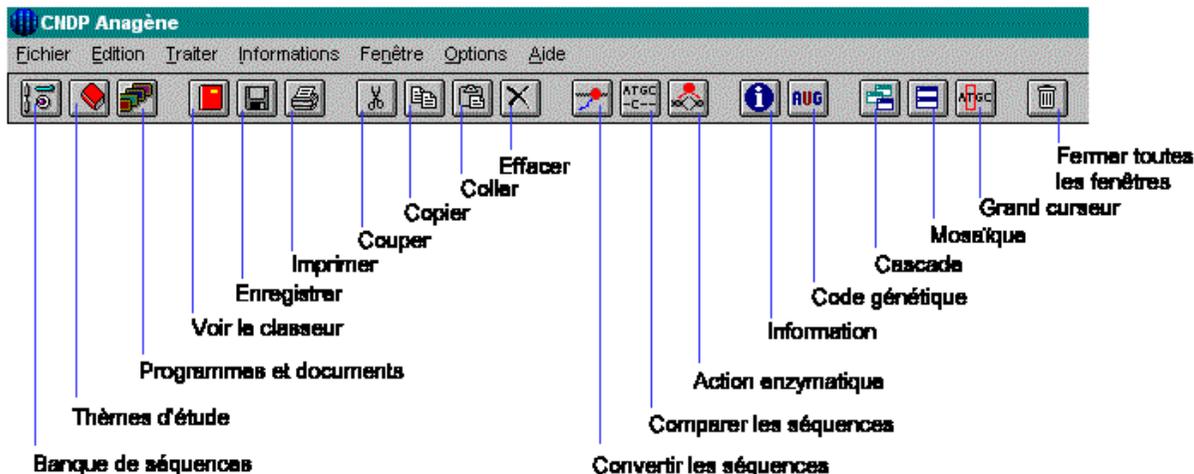


## FICHE TECHNIQUE : COMPTAGE OU MESURE AVEC MESURIM

Mesurer des angles	Mesurer une surface
<ul style="list-style-type: none"> <li>• «Choix/Outil de mesure/Angle»</li> <li>– <b>Tracer</b> à la souris deux segments en partant du sommet de l'angle à mesurer, des flèches apparaissent à l'opposé du sommet.</li> <li>– la valeur de l'angle s'affiche en bas de l'écran</li> </ul> <p><i>ATTENTION : la valeur affichée est celle de l'angle compris entre le premier et le deuxième segment dans le sens trigonométrique</i></p>	 et <b>choisir</b> sa couleur  et son épaisseur  «Image/Délimiter des zones» - <b>Colorer</b> grossièrement un élément, puis un autre avec une autre couleur et ainsi de suite, faire de même avec le fond - <b>Cocher</b> «étendre la classification à tous les pixels» : le résultat s'affiche pour chaque élément en % de la surface totale de l'image ou en unité de surface si l'échelle a été définie
Compter des objets et présenter graphiquement les résultats	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Compter des objets</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <b>Cliquer</b> « Outils/Comptage »</li> <li>– <b>choisir</b> dans la fenêtre flottante le nombre de séries à compter ; <i>des couleurs par défaut sont attribuées à chaque série. Remplacer</i> si nécessaire les numéros par des noms plus évocateurs</li> <li>– <b>cocher</b> la ligne 1 et <b>repérer</b> dans l'image un objet appartenant à la classe 1</li> <li>– <b>cliquer</b> sur l'objet, un point de la couleur de la classe s'affiche sur l'objet en même temps qu'il est comptabilisé dans le tableau.</li> <li>– <b>faire de même</b> avec les autres objets de la série</li> <li>– <b>utiliser</b> la même méthode pour les autres lignes.</li> </ul> </li> </ul> <p>Pour <b>effacer</b> un point <b>cliquer</b> dessus puis <b>cliquer «oui»</b> dans la fenêtre «Avertissement».</p> <p><b>Construire un graphique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <b>Cliquer</b> «Outils/Tableau» et <b>cocher</b> la première ligne.</li> <li>– <b>Reporter</b> les valeurs du compteur dans le tableau (en X le n° des séries et en Y le nombre d'objets comptabilisés)</li> <li>– <b>Double-cliquer</b> sur le graphique pour <b>modifier</b> sa présentation.</li> </ul> <p><i>REMARQUE : Il est possible <b>d'enregistrer</b> le tableau en fichier texte pour le <b>traiter</b> dans un tableur (Excel ou OpenOffice) et <b>construire</b> un histogramme.</i></p>	
Mesurer les dimensions d'un objet connaissant l'échelle	Créer une échelle
<ul style="list-style-type: none"> <li>– <b>Sélectionner</b> l'image.«Image/Créer/Modifier l'Échelle»</li> <li>– <b>cocher</b> «Échelle déjà mémorisée» et <b>choisir</b> le nom de l'échelle à utiliser</li> <li>– <b>tracer</b> une ligne à la souris sur la partie de l'objet à mesurer : la mesure s'affiche en bas à droite.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– «Image/Créer/Modifier l'Échelle» et <b>cocher</b> «Échelle à définir»</li> <li>– <b>Tracer</b> une ligne avec le curseur de la souris sur une partie de l'image de calibrage dont la dimension est connue.</li> <li>– <b>Reporter</b> en bas dans les cases correspondantes, son unité et sa valeur.</li> <li>– «transférer l'échelle» et <b>cocher</b> «Ajout temporaire». <b>Choisir</b> un Nom pertinent.</li> </ul>
Réaliser une lecture optique d'une bande d'électrophorèse	
<ul style="list-style-type: none"> <li>– <b>Ouvrir</b> une image scannée de la bande d'électrophorèse</li> <li>– <b>tracer</b> un trait à la souris sur la totalité de la bande</li> <li>– «Choix/Outil de mesure/Lumière sur une bande»</li> <li>– dans le menu flottant «Mesure d'intensité de couleur sur une ligne», <b>choisir</b> une largeur de bande d'une dizaine de pixels</li> <li>– <b>cocher</b> «Tout», «Mesure en absorption» et «Mesure linéaire»</li> <li>– <b>mesurer</b> pour afficher le graphique.</li> </ul>	

## FICHE TECHNIQUE : COMPARAISON - CONVERSION AVEC ANAGENE

### Les icônes de la barre d'outils



### Numérotation des éléments d'une séquence

50 60  
|.....|  
:AAGCAAGAATAAT

Echelle de repérage des nucléotides

189 192  
|.....|  
1Thr Ala1PheSerSerThrT  
1Th Cliquer pour changer d'échelle

Echelle de repérage des acides aminés  
Attention au décalage des numéros

Cliquer sur l'échelle pour passer de l'échelle des nucléotides à celle des acides aminés.

#### Utiliser le curseur

Surligner pour sélectionner la partie de la séquence choisie. Cliquer sur l'icône « grand curseur ».

#### Bulles d'aide

Une bulle d'aide s'affiche sur l'objet pointé par le curseur de la souris

### Editer une séquence

Sélectionner cette séquence dans l'un des répertoires d'Anagène :

- Banque de séquences
- Thèmes d'étude
- Programmes et documents

ou par «Fichier / Ouvrir / sauve»

### Sélectionner une séquence



Cliquer sur le bouton de sélection. La séquence sélectionnée s'inscrit sur fond blanc. On peut sélectionner plusieurs séquences. La flèche rouge indique la ligne pointée, sur laquelle il est possible d'obtenir des informations et que l'on peut déplacer à l'aide des flèches grises, haut - bas.

### Convertir une séquence

Menu «traiter / convertir ces séquences». Pour traiter une séquence, elle doit être au préalable sélectionnée.

#### Informations sur la ou les séquence(s) sélectionnée(s)

Menu «informations / sur la ligne pointée» pour obtenir des informations sur la sélection : soit d'une ligne, soit de toutes les lignes en cliquant d'abord devant « traitement ».

Attention : les pourcentages obtenus portent soit sur des différences soit sur des ressemblances.

#### Créer des séquences

Menu «Fichier / créer». Choisir le type de séquence et le nommer. Taper ou choisir dans la fenêtre d'«édition de séquences», votre séquence.

### Comparer des séquences

**ATTENTION : pour comparer, la séquence de référence est toujours celle qui est placée en premier.**

Menu «traiter / comparer les séquences» ou «convertir ces séquences».

Pour traiter une séquence, elle doit être au préalable sélectionnée.

La comparaison des séquences ne peut se faire que sur des séquences de même nature. Les flèches grises haut-bas permettent de placer la séquence de référence.

Deux comparaisons possibles :

- La comparaison par alignement permet de comparer avec discontinuité, en éliminant les décalages résultant de délétion(s) ou d'insertion(s), les valeurs affichées sont des ressemblances (identités),
- La comparaison simple permet de comparer point par point des séquences sans aucun alignement, les valeurs affichées sont des différences.