

Didier POL

*Travaux
pratiques de*

*Biologie
des
levures*



ellipses

ate mais

icité des
nt de les
rganismes
Coli des

vent être
border de
ptionnel

présentées
ssi, si l'on
ographie.

SOMMAIRE

1 • UNE INTRODUCTION AUX TECHNIQUES DE LA MICROBIOLOGIE	19
INTRODUCTION	20
I • COMMENT SE PROCURER DES LEVURES	21
1-1 Isoler des levures de l'environnement **	21
1. A partir de végétaux	21
2. A partir de drosophiles	22
3. A partir de fromages	22
1-2 Levures d'origine industrielle	22
1. Levures lyophilisées	22
2. Boulangeries	23
3. Pharmacies	23
1-3 Fournisseurs spécialisés	23
II • UNE NÉCESSITÉ : LE TRAVAIL EN ASEPSIE	25
2-1 Règles générales	25
2-2 Stérilisation des milieux et du matériel	26
1. Autocuiseur (« Cocotte-minute »)	26
2. Four à micro-ondes	26
3. Matériels à usage unique	27
III • UNE APPROCHE ÉLÉMENTAIRE POUR OBTENIR DES COLONIES *	28
IV • REPIQUAGE ET ISOLEMENT DE COLONIES	29
4-1 Repiquage par stries d'épuisement **	29
4-2 Isolement par dilutions en série et étalement **	31
4-3 Technique des répliqués	34
V • MISE EN CULTURE DANS UN MILIEU LIQUIDE ET MESURE DE CROISSANCE PAR TURBIDIMÉTRIE **	35
VI • CONSERVATION DES SOUCHES	38
6-1 Sur milieu solide	38
6-2 En milieu liquide	38
6-3 Au congélateur	38
6-4 Envoyer des levures par la poste	38

2 • OBSERVER LES LEVURES AU MICROSCOPE.**Techniques cytologiques, colorations, numération..... 41**

INTRODUCTION	42
I • ÉTUDIER LES CELLULES AU MICROSCOPE OPTIQUE	43
1-1 Observation vitale sans coloration *	43
* 1. A partir de colonies sur milieu solide.....	43
2. A partir d'une culture en milieu liquide.....	43
3. A partir de levure de boulangerie	43
1-2 Observations vitales avec coloration *	44
1. Rouge neutre	44
2. Vert Janus	44
1-3 Colorations de frottis fixés *	45
1. Lugol (eau iodée)	46
2. Bleu de méthylène	46
3. Noir Soudan	47
4. Bleu de Nil	47
II • MESURES DIVERSES SUR LES CELLULES **	48
2-1 Dénombrement des cellules avec une lame à numération	48
2-2 Dimensions des cellules	49
III • OBTENIR DES PROTOPLASTES **	51
IV • CYCLE BIOLOGIQUE DES LEVURES	53
4-1 Reproduction asexuée	53
1. Bourgeonnement *	53
2. Fission *	55
4-2 Reproduction sexuée **	55
1. Fécondation	55
2. Sporulation.....	57
3. Coloration des spores sur frottis *	57
V • ÉTUDIER LES LEVURES AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE.....	57

3 • EXPÉRIMENTER SUR LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE.**Respiration, fermentation, contrôle métabolique 59**

41		
42	INTRODUCTION	61
43	I • MESURES SUR LA RESPIRATION.....	63
43	1-1 Précautions et informations.....	63
43	1. Lavage des levures	63
43	2. Effet Crabtree	63
43	3. Mutants RD	63
44	4. Efficacité des différents sucres	64
44	1-2 Mesures de l'intensité et du quotient respiratoires avec un microrespiromètre **	64
44	Intensité respiratoire	64
44	Quotient respiratoire	65
45	1-3 Mesures avec une électrode de Clark **	66
46	1. Effet de la concentration en substrat	67
46	2. Effet de différents substrats	68
47	II • MESURES SUR LA FERMENTATION ALCOOLIQUE.....	69
47	2-1 Précautions et informations.....	69
48	1. Lavage des levures	69
48	2. Démarrage d'une fermentation	69
49	3. Précautions.....	69
51	2-2 Manipulation élémentaire *	70
53	2-3 Comparaison de l'efficacité de différents sucres avec batterie de tubes à essai *	71
53	2-4 Mesure de l'intensité de fermentation et caractérisation des produits formés *	71
53	Caractérisation du gaz produit	72
53	Mise en évidence de l'éthanol	72
55	2-5 Mesure indirecte du volume de gaz dégagé et effet de l'addition	
55	de phosphate *	73
55	2-6 Microrespiromètre. Influence de la température **	74
57	2-7 Expérimentation assistée par ordinateur **	74
57	1. Cinétique de la fermentation (capteur de produits volatils)	74
57	2. Utilisation d'un pH mètre.....	76
	III • SUBSTRATS ET MÉTABOLISME : MÉTHODES BIOCHIMIQUES	78
	3-1 Détection de la fermentation d'un sucre par un indicateur de pH.....	78
	1. Fermentation du maltose	78
	2. Fermentation du galactose.....	78
	3-2 Mise en évidence de la respiration par le triphényl tétrazolium **	79
	3-3 Auxanogrammes	80
	1. Méthode des disques *	80
	2. Galeries de détermination *	80

3-4 Suivi de la consommation de glucose en aérobiose et en anaérobiose avec bandelettes enzymatiques et lecteur *	82
3-5 Transformations métaboliques des sucres : chromatographie sur couche mince **	83
IV • CONTRÔLE MÉTABOLIQUE	85
4-1 Mise en évidence de l'effet Crabtree ***	85
4-2 Mise en évidence de l'effet Pasteur (glucose oxydase-peroxydase) **	87
4-3 Répression catabolique : manipulation élémentaire *	88
4-4 Répression catabolique : métabolisme du galactose **	89
4-5 Répression et induction du métabolisme du maltose **	91
V • CYTOCHROMES : SPECTRES D'ABSORPTION DES CYTOCHROMES OXYDÉS ET RÉDUITS **	92
VI • CONTENU EN ATP DE CELLULES CULTIVÉES EN AÉROBIOSE ET EN ANAÉROBIOSE ***	93
ANNEXE 1 : quelques données sur le métabolisme de <i>S. cerevisiae</i>	95
ANNEXE 2 : quelques mécanismes de contrôle métabolique dans la glycolyse	95
4 • EXPÉRIMENTER SUR LES ENZYMES ET AUTRES PROTÉINES.	
Des biosynthèses actives	97
INTRODUCTION	98
I • DÉTERMINATION DU RÉPERTOIRE ENZYMATIQUE ET APPLICATIONS	99
1-1 Enzymes endogènes et enzymes exportées *	99
1-2 Induction enzymatique *	101
1. Maltase	101
2. Phosphatases	101
II • ENZYMES EXPORTÉES	103
2-1 Saccharase : mise en évidence d'une protéine exportée *	103
2-2 Saccharase : cinétique enzymatique *	104
Préparation de l'enzyme	104
Mesures	104
2-3 Catalase	105
1. Manipulation élémentaire : mise en évidence de la catalase *	105
2. Cinétique de la catalase avec une méthode simple *	106
3. Cinétique de la catalase avec une électrode de Clark **	107
4. Cinétique de la catalase par colorimétrie **	108
2-4 Phosphatase acide	109
1. Mise en évidence de la sécrétion de phosphatase acide *	109
2. Inhibition de la phosphatase acide par les phosphates **	110
2-5 Mise en évidence d'une amylase *	111

III • ENZYMES EXPORTÉES	
3-1 Maltase *	
3-2 Saccharase *	
3-3 Amylase *	
IV • PHOSPHATASES	
4-1 Maltase *	
4-2 Amylase *	
ANNEXE : quelques données sur le métabolisme de <i>S. cerevisiae</i>	
5 • EXPLORER LA GÉNÉTIQUE	
Les organismes modèles	
INTRODUCTION	
I • COMPARTIMENTATION	
1-1 Tapis de levures	
1-2 Maltose	
II • MUTATION GÉNÉTIQUE	
2-1 Maltose	
2-2 Maltose	
III • ACIDIFICATION	
3-1 Maltose	
3-2 Maltose	
3-3 Maltose	
IV • NÉOCLIVAGE	
4-1 Maltose	
4-2 Maltose	
V • MANIPULATION GÉNÉTIQUE	
5-1 Maltose	
5-2 Maltose	
5-3 Maltose	
5-4 Maltose	
ANNEXE : quelques données sur le métabolisme de <i>S. cerevisiae</i>	

82	III • ENZYMES INTRACELLULAIRES.....	112
	3-1 Maltase *	112
83	3-2 Succinodéshydrogénase : souche sauvage et mutants petite**	113
85	3-3 Les enzymes de la fermentation : expérience de Büchner **	
85	(fermentation par un extrait acellulaire)	114
87	IV • PHÉROMONES SEXUELLES	115
88	4-1 Mise en évidence de la sécrétion d'une phéromone sur milieu solide *	115
89	4-2 Action d'une phéromone <i>in vitro</i> **	116
91	ANNEXE : quelques protéines de <i>S. cerevisiae</i> en rapport avec l'utilisation des sucres	117
92	**	
93	5 • EXPLORER LA GÉNÉTIQUE DES LEVURES.	
	Un organisme modèle en génétique	119
95	INTRODUCTION	120
95	I • COMPLÉMENTATION FONCTIONNELLE	122
	1-1 Test de complémentation fonctionnelle dominance et récessivité **	122
97	1-2 Utiliser la technique des répliques pour déterminer le type sexuel ***	123
98	II • MUTATIONS SPONTANÉES	124
99	2-1 Mise en évidence de mutants « petite » par la morphologie des colonies *	124
99	2-2 Mise en évidence de mutants « petite » par le triphényl tétrazolium **	125
101	III • ACTION DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET SUR L'ADN	126
101	3-1 Détermination de la DL ₅₀ ***	126
101	3-2 Mutagenèse par les UV ***	129
103	3-3 Détermination de la nature des mutations obtenues ***	131
103	IV • INTERACTIONS ENTRE EXPRESSION DES GÈNES ET ENVIRONNEMENT	132
104	4-1 Nécessité de l'aérobiose pour la synthèse du pigment **	132
104	4-2 Répression de la voie de biosynthèse en présence d'adénine	134
104	V • MANIPULATIONS SUR L'ADN	135
105	5-1 Extraction de l'ADN total ***	135
105	5-2 Isolement d'ADN plasmidique ***	136
106	5-3 Électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose ***	137
107	Préparation des gels	137
108	Coloration des gels	137
109	5-4 Transformation ***	138
110	ANNEXE : carte simplifiée des chromosomes de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	140
111		

6 • PRÉPARATION DES MILIEUX, RÉACTIFS ET SOLUTIONS DIVERSES.

Formulaire	141
-------------------------	-----

I • MILIEUX DE CULTURE	141
1-1 Préparation des boîtes de culture	141
1-2 Milieux complets	142
1-3 Milieu minimum	142
1-4 Milieu de sporulation	142
1-5 Milieu sélectif pour la respiration	142
1-6 Milieu pour l'étude du contrôle métabolique	143
II • SUPPLÉMENTS	144
2-1 Antibiotiques	144
2-2 Autres suppléments	144
2-3 Préparation des rondelles de papier pour auxanogrammes	144
1. Sucres	144
2. Adénine	145
III • COLORANTS CYTOLOGIQUES	146
3-1 Bleu de méthylène	146
3-2 Bleu de Nil	146
3-3 Lugol	146
3-4 Noir Soudan	146
3-5 Rouge neutre pour coloration vitale	146
3-6 Safranine	146
3-7 Vert Janus pour coloration vitale	146
3-8 Vert malachite	146
IV • SOLUTIONS ET RÉACTIFS DIVERS	147
4-1 Indicateurs de pH pour révélation de la fermentation sur milieu solide	147
1. Indicateur au pourpre de bromocrésol	147
2. Indicateur au bleu de bromothymol	147
4-2 Réactif des alcools	147
4-3 Solution d'extraction pour isolement de plasmide	147
4-4 Solution de révélation pour chromatographie des sucres	147
4-5 Solutions pour transformation	147
1. Solutions mères	147
2. Solutions de travail	148
4-6 Solutions pour l'obtention de protoplastes	148
1. Prétraitement	148
2. Solution pour protoplastes	149

..... 141
 141
 141
 142
 142
 142
 142
 142
 143
 144
 144
 144
 144
 144
 145
 146
 146
 146
 146
 146
 146
 146
 146
 146
 146
 147
 147
 147
 147
 147
 147
 147
 147
 147
 147
 148
 148
 148
 149

4-7 Solvant de développement pour chromatographie des sucres 149
 4-8 Triphényl tétrazolium (détection de la respiration) 149
 4-9 Colorant de charge pour électrophorèse de l'ADN 149
 V • TAMPONS 150
 5-1 Tampon phosphate 150
 5-2 Tampon acide acétique-acétate de sodium 150
 5-3 Tampon tris-borate-EDTA (TBE) pour électrophorèse de l'ADN 151
 5-4 Tampon tris-EDTA pour mise en solution de l'ADN 151

FOURNISSEURS 153

BIBLIOGRAPHIE 155

INDEX 157

L'enseignement de la biologie depuis l'école élémentaire jusqu'à l'université fait une large place aux activités pratiques comme le soulignent les textes officiels, et les enseignants sont attachés à cette dimension pratique car elle permet d'éveiller et de stimuler l'intérêt des jeunes tout en donnant une image concrète de la science.

A cet égard, les levures constituent un organisme de choix aux avantages multiples : peu onéreuses, sans danger, faciles à cultiver et à conserver, elles se prêtent à une multitude d'activités pratiques en relation avec les principaux problèmes biologiques. En outre, les levures sont utilisées depuis des milliers d'années comme auxiliaires dans l'alimentation humaine et c'est par leurs travaux sur ces organismes que Büchner et Pasteur ont fondé respectivement la biochimie et la microbiologie modernes. Elles sont aussi de plus en plus utilisées dans le domaine biomédical. Enfin, le séquençage complet du génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ayant été terminé en avril 1996, ce sont désormais les organismes eucaryotes les mieux connus.

Cet ouvrage présente de façon détaillée des activités pratiques permettant d'aborder les notions fondamentales de la biologie à tous les niveaux d'enseignement. Il devrait donc constituer une aide précieuse pour toutes les personnes chargées de les mettre en œuvre : enseignants et candidats aux concours de recrutement de l'enseignement, personnels de laboratoire, étudiants, animateurs de clubs scientifiques.

Illustration de couverture :

Principaux contaminants microbiens de la bière et du moût de malt,
Pasteur, *Etudes sur la bière*, 1876.



ISBN 2-7298-5668-4