



## **A) Objectif du TP : Utilisation d'un crible génétique afin d'étudier la fonction du produit d'un gène SRS2 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae***

### **1) Le crible génétique**

Afin d'identifier des partenaires fonctionnels de la protéine Srs2p, et par là, mieux comprendre son rôle dans la cellule, nous allons effectuer un **crible génétique visant à isoler des mutants colétaux avec la délétion du gène SRS2**.

La notion de **colétalité** (aussi nommée **létalité synthétique**) décrit la relation génétique entre deux mutations, qui seules dans une cellule n'entraînent pas de létalité cellulaire, mais lorsqu'elles sont présentes conjointement au sein d'une même cellule engendrent cette létalité. Lorsque cette combinaison des deux mutations est viable mais présente un phénotype plus marqué que les phénotypes associés à chacune mutation prise individuellement, on parlera non plus de colétalité mais d'aggravation synthétique. La relation de colétalité ou d'aggravation synthétique est une bonne indication de l'implication des gènes concernés dans un même processus ou dans des processus parallèles, voire redondants.

### **2) Le gène SRS2**

*SRS2* est un **gène non essentiel** à la viabilité dont la perte de fonction entraîne, entre autres, 2 phénotypes :

- une **sensibilité aux UV des cellules haploïdes irradiées en phase G1**. Ce phénotype est supprimé par la délétion du gène *RAD51*.

- une **hyper-recombinaison spontanée au cours du cycle mitotique**. Le taux de recombinaison est 5 fois plus élevé dans des cellules *srs2Δ* que dans les cellules *SRS2<sup>+</sup>*.

La protéine Srs2p est une ADN hélicase de polarité 3'-5'. Il a été montré qu'elle a une fonction anti-recombinase par sa propriété de déloger les molécules de Rad51 associées à l'ADN (les nucléofilaments Rad51). La protéine Rad51p est l'homologue eucaryote de la protéine bactérienne RecAp et est conservée de la levure à l'homme contrairement à Srs2p.

L'expression de *SRS2* est régulée, au niveau transcriptionnel, au cours du cycle cellulaire. Il y a peu ou pas d'expression en phase G1, une induction à la transition G1/S en même temps que celle des gènes codant les protéines de réplication et une persistance en phase G2. Elle est aussi régulée en réponse aux dommages de l'ADN avec une induction en phase G2 (et peut-être en phase S ?), mais pas en phase G1.

On soupçonne, par conséquent, un **rôle de la protéine Srs2p durant la phase S**, par le biais d'éventuelles interactions fonctionnelles et/ou physiques avec la machinerie de réplication de l'ADN.

### **3) L'organisme modèle : La levure *Saccharomyces cerevisiae***

#### **a) Le cycle de vie**

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un **eucaryote unicellulaire** (d'une taille allant de 4 à 10 μm, visible au microscope) appartenant à la classe des hémiascomycètes (dans la nature on observe le plus souvent une croissance pseudohyphale associée à des états de carence). Son cycle de développement est dit **haplo-diplobiontique** car elle peut exister sous deux formes végétatives : haploïde et diploïde. Sous l'une ou l'autre de ses deux formes, elle est capable de se multiplier par bourgeonnement (division mitotique) pour donner naissance à une cellule fille génétiquement identique. La cellule « mère » produit un petit bourgeon qui grossit puis se détache avant d'avoir atteint la taille de la cellule mère. La répartition du cytoplasme est donc inégale entre les 2 cellules filles, le bourgeon emporte peu de cytoplasme et des organites qu'il renferme. Ceci a des conséquences sur l'hérédité du génome mitochondrial.

Les cellules haploïdes présentent **deux types sexuels** : soit *MATa* soit *MATα*. La fécondation encore appelée conjugaison ne s'effectue qu'entre deux cellules haploïdes de types sexuels complémentaires et donne naissance à une cellule diploïde appelée zygote de génotype *MATa/MATα*. Les cellules diploïdes formées sont plus grosses et plus ovales que les cellules haploïdes (pas toujours aisément identifiable par le néophyte).

*Techniquement, on procède à une conjugaison en mélangeant des cellules haploïdes de types sexuels opposés, ceci conduit à la formation de cellules diploïdes mais il reste toujours dans le mélange des cellules haploïdes qui ne se sont pas croisées. Il faut donc sélectionner spécifiquement les cellules diploïdes. On utilise généralement pour cela une sélection par complémentation croisée d'auxotrophies.*

Les cellules diploïdes se développent à l'état végétatif en se divisant par mitose. Elles ne rentreront en méiose (processus appelé **sporulation**) que dans des conditions de carence sévère en azote (en présence d'une source de carbone non fermentescible) et si elles sont par conséquent, compétentes pour la respiration. Les quatre produits de la méiose que l'on appelle spores, (2 *a* et 2 *α*) sont contenues dans un **asque** dont la paroi est très résistante. Une fois libérées, les spores germent pour donner naissance à des cellules végétatives haploïdes.

Dans la nature, l'état haploïde n'existe quasiment pas, et ce pour deux raisons. D'une part, les spores sont retenues dans l'asque et donc fusionnent entre elles avant même que la paroi de l'asque ne se déchire, et d'autre part les cellules haploïdes peuvent changer de signe sexuel ce qui conduit à une diploïdisation immédiate au sein d'une même colonie. Les souches trouvées dans la nature sont ainsi dites **pseudo-homothaliques**. Les souches de laboratoires sont quant à elles parfaitement hétérothaliques en raison de l'inactivation du gène *HO* codant une endonucléase nécessaire à la conversion du signe sexuel.

Figure 1 : Cycle de vie et images de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

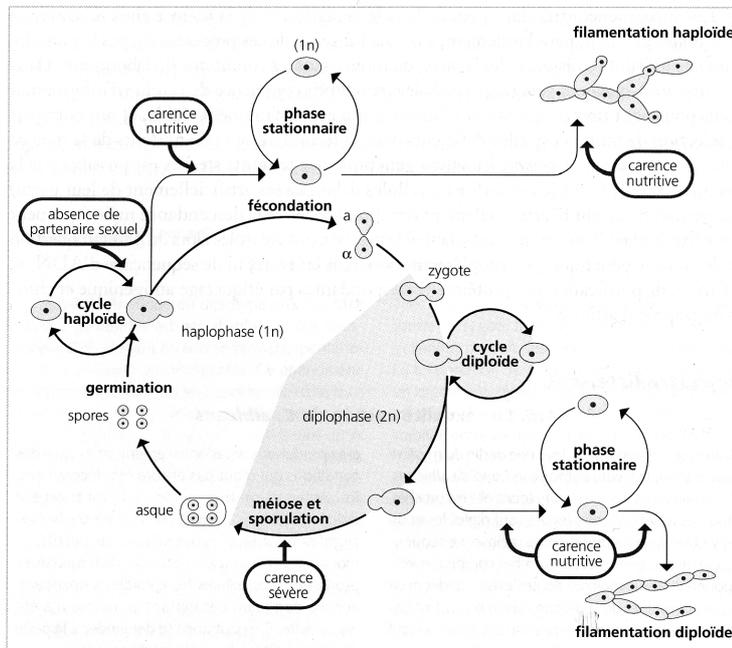
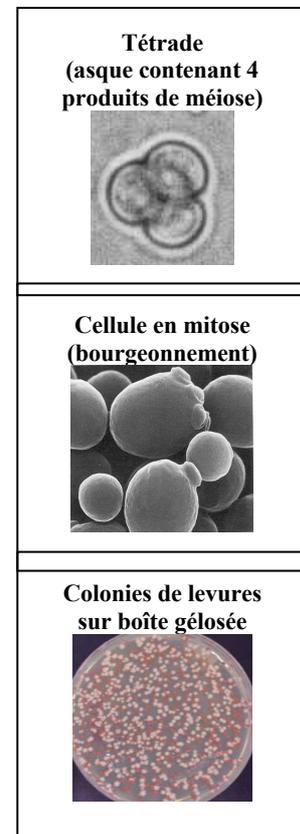


Fig. 1.17. Le cycle biologique de *S. cerevisiae*. Les spores haploïdes issues d'une méiose germent et se reproduisent par divisions mitotiques, tout en produisant un faible niveau de phéromone sexuelle. En présence de partenaire sexuel, elles conjuguent via la formation d'un « shmoo » (voir section 3.5) puis d'un zygote  $a/\alpha$  qui ne synthétise pas de phéromone. Les cellules diploïdes poursuivent leur reproduction végétative jusqu'à ce qu'une carence nutritive légère induise soit l'entrée en phase stationnaire, soit une croissance filantaire qui permet aux cellules d'explorer les ressources nutritionnelles du milieu avoisinant. Un phénomène équivalent se produit dans les cellules haploïdes. Seule une carence sévère (absence complète de source de carbone et d'azote) induit la méiose dans les cellules diploïdes, qui retournent alors à l'haplophase.



### b) La structure du génome

Le **génom nucléaire** a pour taille 12,5 Mb et contient un peu moins de 6000 gènes qui se répartissent sur 16 chromosomes.

Le **génom mitochondrial** est constitué d'une molécule d'**ADN circulaire** dont la taille varie, selon les souches, de 75 à 85 Kb. Il contient 55 gènes. Il est présent en multiples copies (10 à 50 copies dans le compartiment mitochondrial selon les conditions physiologiques et environnementales). Les génomes, nucléaire et mitochondrial, ont été entièrement séquencés.

La **nomenclature** utilisée pour les gènes et les protéines est la suivante :

#### Génotype

Les gènes de levure sont désignés en italique par 3 lettres suivies d'un chiffre arabe

a- allèle sauvage *ADE2*<sup>+</sup>

b- allèle récessif *ade2* en minuscule et dominant *ADE2* en majuscule

c- gène inactivé par l'insertion (d'un autre gène) *ade2* :: *HIS3*<sup>+</sup>

Le numéro ou l'indication qui suit un gène caractérise l'allèle du gène considéré avec sa mutation particulière, ex : *ade2-1* ou *ade2Δ* ( $\Delta$  symbolisant une délétion).

Un génotype diploïde s'écrit en indiquant les deux allèles du gène, ex : *ADE2*<sup>+</sup>/*ade2-1*

**Phénotype :** [Ade<sup>+</sup>] ou [Ade<sup>-</sup>]

**Protéine :** Ade2p (ou Ade2)

### c) Le métabolisme

La levure *S. cerevisiae* est un organisme dit aérobie facultatif (rare dans le monde eucaryote) car son métabolisme énergétique (production d'ATP intracellulaire) peut prendre deux voies alternatives : soit celle de la **respiration (aérobiose)** soit celle de la **fermentation (anaérobiose)**. Certaines sources de carbone ne sont pas fermentescibles (ex : glycérol, éthanol, lactate). Leur utilisation comme seules sources de carbone dans un milieu de culture permet d'imposer une croissance aérobie. Dans un milieu de culture où la source de carbone et d'énergie

est le glucose, les cellules commencent par fermenter le glucose fourni, puis elles respirent l'éthanol qu'elles ont produit par la fermentation (alcoolique chez la levure). Ainsi, il est possible d'obtenir des mutants de respiration ([Resp<sup>-</sup>]) qui vont vivre grâce à la fermentation. Du fait du déficit énergétique, ces mutants forment des colonies plus petites. Ces mutants peuvent être d'origine nucléaire ou mitochondriale. La plupart des mutants mitochondriaux présentent des délétions d'assez grandes tailles du génome mitochondrial associées à des répétitions des séquences résiduelles (mutants *rho*<sup>-</sup>). **Ces mutants mitochondriaux *rho*<sup>-</sup> apparaissent spontanément à forte fréquence (de l'ordre du %).**

souche	milieu glucose (boite)	milieu glycérol (boite)
Sauvage [Resp <sup>+</sup> ]	+ (grande colonie)	+
mutante [Resp <sup>-</sup> ]	+ (petite colonie)	-

#### d) Les milieux et conditions de culture

Les levures peuvent être cultivées aussi bien en **milieu nutritif liquide** (sous agitation) qu'en **milieu solide** (boite de pétri contenant du milieu nutritif gélosé). Sur ce dernier, elles apparaissent sous la forme de colonies rondes (population clonale de cellules) d'aspect blanc mat. La température optimale de croissance se situe entre 26°C et 30°C. On utilise néanmoins des gammes de températures allant de 16°C à 37°C voire au delà. On peut ainsi déterminer des caractéristiques phénotypiques de cryo- et thermo-sensibilité.

Il existe **deux grands types de milieux de culture** pour *Saccharomyces cerevisiae* : les milieux **riches** et les milieux **synthétiques**.

Les milieux **riches** sont tous à base **d'extraits de levure** (yeast extract) 1%, et de **peptone** 2% (produits d'hydrolyse de protéines). Seule la **source de carbone** change. Ces milieux sont désignés par 3 lettres. Les deux premières sont YP (Yeast extract et Peptone) et la troisième indique la source de carbone utilisée généralement à 2%. Dans notre cas, il s'agira de **YPG** (G pour Glucose).

Les **milieux synthétiques** sont des milieux où l'on contrôle parfaitement les différents ingrédients : la source de carbone, la source d'azote mais aussi les différents nutriments tels que les **acides aminés** et les **bases azotées**. Ces milieux sont indispensables lorsque l'on souhaite maintenir une pression de sélection pour le maintien d'un plasmide par exemple. Ces milieux sont composés d'un mélange d'éléments indispensables (vitamines sels minéraux, oligo-éléments), d'une ou plusieurs sources de carbone et d'une source d'azote, le plus généralement du sulfate d'ammonium à 0,5%.

Nous utiliserons ici un milieu synthétique (2% glucose) supplémenté par les nutriments (acides aminés et bases azotées) correspondant aux marqueurs d'auxotrophies de nos souches (adénine, lysine, uracile, leucine tryptophane, histidine). Il sera symbolisé par le sigle MMC (Milieu minimum supplémenté par TOUS les métabolites pour lesquels la souche étudiée est auxotrophe, nous l'appellerons Milieu Minimum Complet). Lorsqu'un des nutriments essentiels sera omis (milieu d'omission), cela sera indiqué sous la forme suivante **MMC-Ade** (minimum complet sans adénine).

Le milieu « 5FOA » est un milieu synthétique supplémenté pour tous les nutriments correspondants aux auxotrophies de la souche auquel on a ajouté de l'acide 5-fluoroorotique (5FOA) à 1g/L. Le 5FOA est un analogue toxique de l'un des intermédiaires de la chaîne de biosynthèse de l'uracile. Ainsi, lorsque le 5FOA est métabolisé par l'orotidine 5'-phosphate decarboxylase, codée par le gène *URA3*, il tue les cellules de levure. Ce milieu permet donc de sélectionner positivement les cellules *ura3*<sup>-</sup>.

Le temps de division est de l'ordre de 90 minutes pour les cellules des souches de référence dites sauvages cultivées en laboratoire en milieu liquide riche et aéré à 28°C.

### B) Les outils moléculaires et génétiques chez *S. cerevisiae*

#### 1) Les outils moléculaires

Une batterie de **vecteurs de transformation** possédant différents **marqueurs de sélection** est à la disposition de l'expérimentateur.

##### a) Les marqueurs de sélection

La plupart correspondent à des gènes de levure impliqués dans les voies de biosynthèse d'acides aminés ou de bases azotées. Ils constituent ce que l'on appelle des **marqueurs d'auxotrophie**. Ils sont utilisés pour des sélections positives mais certains peuvent aussi faire l'objet de sélection négative. Les plus couramment utilisés sont présentés dans le tableau suivant. Les souches de référence de levure portent des mutations récessives dans certains des gènes mentionnés ci-dessous.

## Marqueurs d'auxotrophies

Nom du gène	Phénotype associé à la perte de fonction	Sélection négative de l'allèle sauvage / sélection positive de sa perte de fonction
<i>URA3</i>	[Ura <sup>-</sup> ]	Sensibilité / résistance au 5-fluoro-orotate (5FOA)
<i>LYS2</i>	[Lys <sup>-</sup> ]	Sensibilité / résistance à l'α-amino-adipate
<i>ADE2</i>	[Ade <sup>-</sup> ; colonie rouge]	
<i>ADE3</i>	[Ade <sup>-</sup> ; His <sup>-</sup> ]	
<i>HIS3</i>	[His <sup>-</sup> ]	
<i>TRP1</i>	[Trp <sup>-</sup> ]	Sensibilité / résistance au 5-fluoro-anthranilate (5-FAA)
<i>LEU2</i>	[Leu <sup>-</sup> ]	

D'autres marqueurs de sélection couramment utilisés sont des gènes bactériens conférant à la levure une résistance à une drogue à laquelle elle est normalement sensible. On les qualifie de **marqueurs de résistance**

Nom	Phénotype conféré
KanMX4	Résistance au G418
Nat <sup>R</sup>	Résistance à la nourséothricine

### b) Les vecteurs de transformation

Certains des vecteurs de transformations sont dits « vecteurs **navette** », c'est à dire qu'ils peuvent se multiplier aussi bien dans la cellule bactérienne (*E. coli*) que dans la levure. Ce sont des **molécules d'ADN circulaires**. Ils possèdent, outre les éléments de maintenance chez la levure, une origine de réplication bactérienne (ori) et un marqueur de sélection des bactéries qui le contiennent (gène de résistance à un antibiotique, Amp<sup>R</sup> par exemple).

Le marqueur de sélection chez la levure est le plus fréquemment l'allèle sauvage dominant d'un des marqueurs d'autotrophies cités ci-dessus. Ces plasmides contiennent en outre une séquence comportant plusieurs sites de restriction uniques (MCS, multiple cloning sites) permettant un clonage aisé de fragments d'ADN exogène.

*Les plasmides sont construits in vitro, introduits, sélectionnés et amplifiés dans E. coli, puis introduits dans la levure.*

On distingue deux grandes catégories de vecteurs chez la levure :

- **Les vecteurs intégratifs (YIp)** : Les vecteurs intégratifs ne peuvent se maintenir dans la cellule de levure qu'en s'intégrant au génome par recombinaison homologue. Ceci est dû au fait qu'ils ne contiennent aucune origine de réplication de levure. Ils peuvent par contre être multipliés dans *E.coli* (présence de *ORI*).

- **Les vecteurs réplicatifs (ou autonomes)** : Ils sont capables de se maintenir dans la cellule sans s'intégrer au génome. On en distingue deux types :

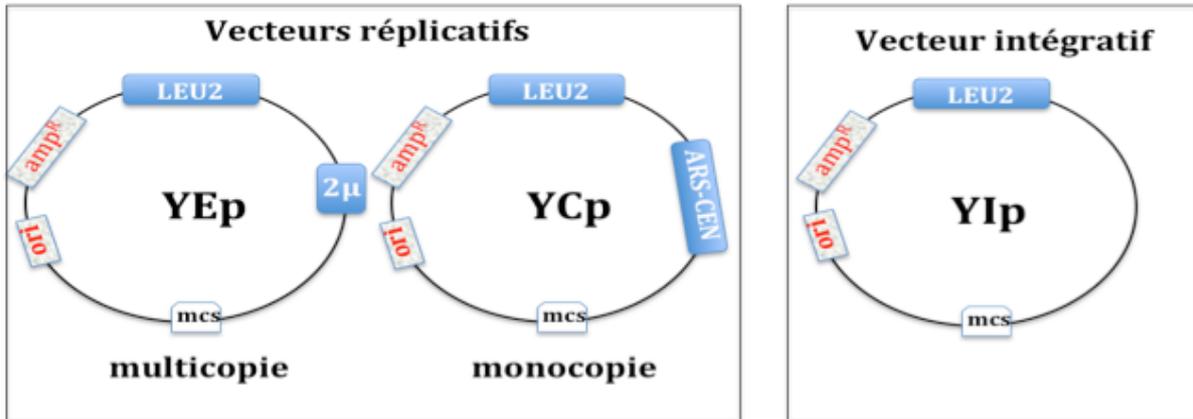
#### ➤ Les vecteurs épisomiques (ou multicopies) YE<sub>p</sub>

Ils contiennent l'origine de réplication du seul plasmide naturel connu de la levure, le plasmide 2μ (en référence à sa taille). Le plasmide 2μ se réplique de façon autonome et contient les gènes nécessaires à sa réplication et au contrôle de son nombre de copies (jusqu'à 100 copies/cellule).

Les plasmides artificiels contenant l'**origine de réplication 2μ** sont eux aussi présents en nombre élevé de copies (de 10 à 40 copies/cellule) d'où leur appellation de plasmides multicopies. Ils ne sont cependant pas répartis équitablement entre les cellules lors des divisions mitotiques et sont assez instables (on observe fréquemment 10 à 30% de cellules ayant perdu le plasmide dans des cultures réalisées en absence de sélection).

#### ➤ Les vecteurs centromériques (ou monocopies) YC<sub>p</sub>

Ils contiennent une **origine de réplication chromosomique (ARS, autonomous replicating sequence)** couplée à une **séquence centromérique (CEN)**. De ce fait, ils sont relativement stables (on observe fréquemment 1 à 5% de cellules ayant perdu le plasmide dans des cultures réalisées en absence de sélection) et présents à 1, 2, voire 3 copies par cellule d'où l'appellation plasmide monocopie par opposition aux plasmides multicopies.

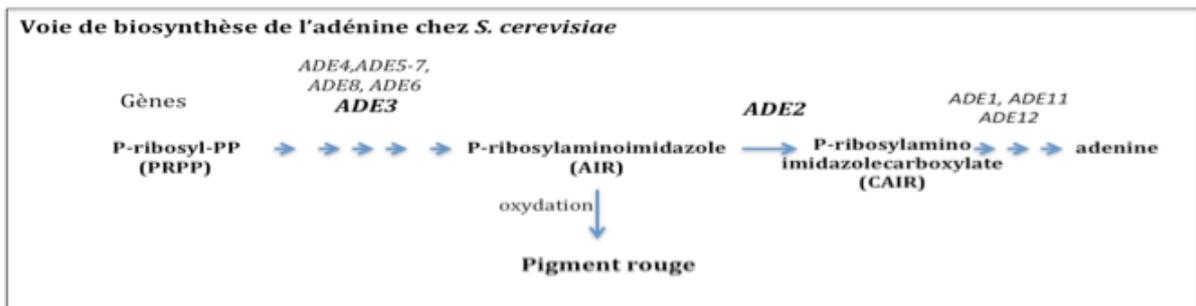


Les premières transformations de levure ont été effectuées dès la fin des années 70

**c) Les outils génétiques utilisés dans le crible de colétalité : les marqueurs *ade2* et *ade3***

La **mutation *ade2*** confère deux phénotypes (elle est dite **pléiotrope**) : une auxotrophie vis-à-vis de l'adénine [**Ade<sup>-</sup>**] et une **coloration rouge des colonies** lorsque l'adénine du milieu est épuisée [Rouge]. Cette coloration est due à l'accumulation d'un précurseur de l'adénine (AIR) qui a la propriété de s'oxyder à l'air pour donner un produit coloré en rouge. Les cultures de cellules *ade2* en milieu liquide rougissent en phase stationnaire si elles sont bien agitées ; **les colonies issues des mêmes cellules sont rouges sur milieu complet solide**, uniquement en surface car l'intérieur de la colonie est à l'abri de l'air et le précurseur accumulé ne s'oxyde pas. La coloration rouge n'apparaît pas sur un milieu minimum supplémenté avec de l'adénine en excès. La couleur rouge apparaît bien en phase stationnaire sur un **milieu complet YPG**.

La **mutation *ade3*** confère elle aussi deux phénotypes [**Ade<sup>-</sup> ; His<sup>-</sup>**] mais elle n'affecte pas la couleur des colonies [Blanc]. Le gène *ADE3* code une protéine (enzyme) catalysant une des étapes de la voie de biosynthèse de l'adénine. Cette étape est antérieure à l'étape catalysée par l'enzyme codée par le gène *ADE2*, par conséquent la voie de biosynthèse sera bloquée en amont de la formation du précurseur AIR. Ainsi un double mutant *ade2 ade3* aura pour phénotypes [**Ade<sup>-</sup> ; His<sup>-</sup> ; Blanc**]. On dit alors que **le gène muté *ade3* est épistatique sur le gène muté *ade2* pour le phénotype de coloration des colonies**. Nous utiliserons cette particularité pour effectuer la recherche de mutants colétaux.



Par ailleurs, l'auxotrophie pour l'histidine d'un mutant *ade3* est dû à l'accumulation d'un produit, le méthylène tétrahydrofolate, qui inhibe la voie de biosynthèse de l'histidine.

### C) Déroulement du TP

#### Partie I : Isolation de candidats après mutagenèse UV

Nous avons pour objectif d'isoler des mutations induites par les UV, colétales avec la délétion du gène *SRS2* présente dans la souche MH2083, ceci nous conduira à mettre en œuvre un crible visuel d'identification des candidats potentiels. *Cette partie sera l'occasion de discuter des différents types de crible et de sélection ainsi que de la mutagenèse et de son intérêt.*

La souche **MH2083** a pour génotype :

*MATalpha srs2::LEU2<sup>+</sup>, leu2-3,112, ura3-52 trp1-289, ade2Δ, ade3Δ, lys2-1 + YCp50-SRS2<sup>+</sup>-ADE3<sup>+</sup>*

- ✓ *srs2::LEU2<sup>+</sup>* : allèle perte de fonction récessif où la phase codante de *SRS2* est remplacée par le gène *LEU2<sup>+</sup>*.
- ✓ *leu2-3,112* : allèle récessif portant les 2 mutations ponctuelles notées 3 et 112, réversion rarissime. Confère un phénotype [Leu<sup>-</sup>].
- ✓ *ura3-52* : allèle récessif dû à l'insertion d'un transposon, réversion rarissime. Confère un phénotype [Ura<sup>-</sup>].
- ✓ *trp1-289* : allèle récessif portant 1 mutation ponctuelle, réverse à faible fréquence. Confère un phénotype [Trp<sup>-</sup>].
- ✓ *lys2-1* : allèle récessif conférant un phénotype [Lys<sup>-</sup>].
- ✓ *ade2Δ* : allèle récessif, confère un phénotype [Ade<sup>-</sup>] et une coloration rouge [rouge] aux colonies.
- ✓ *ade3Δ* : allèle récessif confère un phénotype [Ade<sup>-</sup> ; His<sup>-</sup> ; Blanche].

*L'allèle muté *ade3Δ* est épistatique sur l'allèle muté *ade2Δ* pour le phénotype couleur des colonies. Quelle sera, par conséquent, la couleur des colonies d'une souche *ade2Δ ade3Δ* ?*

Elle possède aussi un **plasmide répliatif centromérique**, **YCp50-SRS2<sup>+</sup>-ADE3**, dont le marqueur de sélection est l'allèle sauvage *URA3<sup>+</sup>*. Il porte de plus les allèles sauvages *SRS2<sup>+</sup>* et *ADE3<sup>+</sup>*.

*D'après les informations qui vous sont données, écrivez les phénotypes de la souche MH2083 en terme d'auxotrophies et de coloration de colonies.*

En culture sur milieu riche YPG, la souche MH2083 donne des colonies de coloration hétérogène comme dans l'image ci-dessous : colonies blanches, colonies rouges et colonies à secteurs rouges et à secteurs blancs.

Colonies de la souche MH2083 sur milieu YPG



*Expliquez ce phénomène, à quoi est-il dû ? Indiquez le génotype ou les génotypes associés à chacun des types de colonies. En vous basant sur cette observation et sur votre réponse, explicitez comment ceci peut être utilisé pour isoler des mutations colétales avec la délétion du gène *SRS2*. Vous présenterez votre réponse sous la forme d'un schéma explicitant les différentes étapes du crible.*

#### Etude de la ségrégation mitotique du plasmide

Vous vérifierez si l'interprétation que vous avez proposée pour expliquer ce phénomène est valide en étudiant la ségrégation mitotique du plasmide et la coségrégation de certains phénotypes en procédant à des répliques sur différents milieux (YPG, MMC-ura, MMC-his), de boîtes de milieu riche contenant des colonies issues de l'étalement de cultures de la souche MH2083 réalisées en milieu riche.

Définissez la composition du milieu MMC pour cette analyse.  
 Vous préparerez un tableau prédictif des résultats attendus

### Isolement de 14 candidats

Nous allons vous fournir des boîtes YPG contenant la souche **MH2083 irradiée à une dose de 30J/m<sup>2</sup>**. Vous isolerez **14 candidats potentiels** (boîtes irradiées) et **1 clone de la souche MH2083 issu de la boîte YPG non irradiée**, en observant soigneusement les colonies à la loupe binoculaire et effectuerez un sous-clonage (strie 1) en les striant sur boîte à raison de 3 par boîte de façon à obtenir, pour chacun d'eux, plusieurs colonies isolées. Un deuxième sous-clonage (strie 2) sera effectué après lecture des stries 1, ainsi qu'un test de résistance/sensibilité au 5-FOA. La méthode du sous-clonage par stries vous sera expliquée en salle.

#### Exemple de candidat colétal

Absence de colonie sectorée ou blanche  
 Remarquer la présence d'un clone abortif



Chaque candidat sous-cloné recevra un identifiant (n° de groupe/initiales du binôme/n° de candidat) et ses caractéristiques seront clairement indiquées sur une fiche d'identité comme décrit ci-dessous, celle-ci sera complétée au fur et à mesure de la progression de l'étude.

#### **Exemple de résultats expérimentaux :**

N°	Aspect des colonies, sensibilité/résistance au 5-FOA			TDR	TCF	Plasmid shuffling / ségrégation
	Boîte initiale	Strie 1	Strie 2			
M1	Rouge petit	Rouge petite, clone blanc abortif	Rouge petite, clone blanc abortif, [5-FOA <sup>S</sup> ]	recessif	Appartient groupe 3	YCBL1/non YCBL1-SRS2 <sup>+</sup> /oui
2MCM2	rouge	Apparition de sectorées	abandon			

### **Partie II. Dernière étape du crible des mutants colétaux : test du « Plasmid shuffling ».**

Chaque binôme choisira **ses deux candidats colétaux les plus convaincants à l'issue des stries 2** et du test de sensibilité/résistance au 5-FOA. Les expériences de la partie 3 seront menées sur ces mêmes candidats.

Au cours de cette deuxième partie, nous allons effectuer le test ultime de la présence d'une mutation colétale dans les candidats colétaux choisis. Vous effectuerez des expériences de transformation de ces candidats pour la première étape de ce test.

L'objectif est de vérifier que l'absence apparente de ségrégation plasmidique des candidats sélectionnés est bien liée à la présence d'une mutation colétale. Nous utiliserons pour cela deux ADN transformants, le plasmide répliquatif **YCBL1** (plasmide centromérique porteur du marqueur de sélection **TRP1<sup>+</sup>**) et le même plasmide contenant en plus l'allèle sauvage **SRS2<sup>+</sup>**, **YCBL1-SRS2<sup>+</sup>**.

Compte tenu des caractéristiques des différents ADN, sur quel milieu sélectionnerez-vous les transformants ?  
 Indiquez sa composition précise.  
 Quels phénotypes présenteront les transformants YCBL1 et YCBL1-SRS2<sup>+</sup> si votre candidat porte effectivement une mutation colétale ? si non ? Comment le tester ?

## Protocole de transformation de levure rapide :

### Plasmides répliatifs

YCBL1 : plasmide centromérique portant le marqueur de sélection *TRP1*<sup>+</sup>, noté pV pour plasmide vide.

YCBL1-*SRS2*<sup>+</sup> : plasmide YCBL1 portant le gène *SRS2*<sup>+</sup>, noté pSRS2.

### 1. Mise en culture des deux candidats (1 boîte YPGA)

Pour chaque candidat, strier une ½ boîte YPGA. Les boîtes seront placées dans l'étuve à 30°C jusqu'à leur utilisation pour la transformation.

### 2. Préparation des cellules

Pour chaque souche, prélever avec un cure dent l'équivalent d'un volume de 50 µL de cellules et les resuspendre (au pipetman ou en vortexant à petite vitesse) dans 2 mL d'une solution d'acétate de Lithium 0,1M. Conserver cette suspension cellulaire pendant 1H à 25°C.

A ce stade, les cellules sont fragilisées. Centrifuger à 3000 tour/min pendant 5 min. Eliminer le surnageant, puis reprendre doucement le culot avec la pipette P1000 dans 350 µL de solution P.

### 3. Transformation

1) Pour chaque candidat, préparez un tube contenant 5µL du plasmide pV et un tube contenant 5 µL du plasmide pSRS2 préparés en séance 3. Annoter les tubes en conséquence et distribuer 100 µL de la suspension cellulaire dans chaque tube (avec la pipette P1000). Le reste de la suspension cellulaire (environ 100 µL) correspond au tube témoin de réversion de l'auxotrophie pour le tryptophane. Mélanger soigneusement et délicatement (pas de vortex). Vous avez 6 tubes en tout (3 pour chaque souche).

2) Incuber les tubes 20 min à 25°C.

3) Incuber les tubes 30 min à 42°C.

4) A la fin de l'incubation à 42°C, centrifuger les cellules 5 min à 3000 rpm. Eliminer le surnageant à la pipette en faisant attention à éliminer toute la solution P visqueuse. Resuspendre les cellules délicatement à la pipette P200 dans 100 µL d'eau stérile.

5) Etaler l'intégralité de la suspension sur une boîte de milieu sélectif MMC –Trp. Incuber les boîtes à 30°C.

Solution P : 33% PEG4000 ; 0,22M LiAc ; 90 mM DTT ; 30µg/mL ADN sperme de hareng

### Partie III. Analyse génétique des mutants colétaux : TDR et TCF

Chaque candidat colétal sera croisé avec 10 souches de références. La méthode vous sera communiquée en salle.

La souche **MH982** : *MATa srs2::LEU2<sup>+</sup>, leu2-3,112, ura3-52 trp1-289, ade2Δ, ade3Δ, LYS2<sup>+</sup>, lys1::kanMX4 +YCp50-SRS2<sup>+</sup>-ADE3<sup>+</sup>*

Les souches **A1 à A11** : *MATa srs2::LEU2<sup>+</sup>, leu2-3,112, ura3-52 trp1-289, ade2Δ, ade3Δ, LYS2<sup>+</sup>, lys1::kanMX4, col X<sup>(1 à 11)</sup> + YCp50-SRS2<sup>+</sup>-ADE3<sup>+</sup>*

Les souches A1 à A11 portent chacune une mutation colétale récessive et appartiennent à 9 groupes de complémentation différents.

*Sur quel principe et quel milieu allez-vous sélectionner les diploïdes ? Sur quel milieu et sur quel critère phénotypique allez-vous lire vos tests ?*

*Pourquoi les souches A doivent-elles porter une délétion du gène SRS2 ?*

*Quel croisement vous permet de déterminer la dominance ou la récessivité des mutations colétales isolées ?*

*Quel phénotype indiquera la dominance ? la récessivité ?*

*Quelles sont les conditions requises pour effectuer un TCF ? Quel phénotype indiquera une complémentation ? une non-complémentation ?*

### Partie IV. Analyse informatique des candidats

L'identification des gènes porteurs de la mutation colétale avec la délétion du gène *SRS2* se fait par sauvetage fonctionnel. Cette stratégie consiste à transformer le candidat colétal par une banque d'ADN génomique fabriquée à partir de l'ADN d'une souche de levure sauvage et d'un vecteur centromérique porteur du marqueur de sélection *TRP<sup>+</sup>*. Parmi les transformants capables de perdre le plasmide *YCp50-SRS2<sup>+</sup>-ADE3*, certains possèdent un plasmide dont l'insert contient l'allèle sauvage *COL<sup>+</sup>*.

Nous n'avons pas le temps de faire cette expérience en TP mais vous travaillerez en salle informatique sur plusieurs gènes dont la mutation est colétale avec la délétion de *SRS2*. Pour cela, les séquences nucléotidiques des deux extrémités de plusieurs inserts correspondant à plusieurs candidats vous sont fournies et vous aurez en charge d'identifier le gène *COL<sup>+</sup>* concerné en utilisant le site Internet *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org>) et le logiciel de traitement des séquences nucléotidiques APE. Vous devrez ensuite rechercher la fonction du produit de ce gène et en faire un petit exposé en salle. Des hypothèses concernant la colétalité entre les deux gènes vous seront demandées.

#### Insert A1

Borne 5' plasmide banque

```
GATCCAATATGAAGAAAATTGCTATTCAGGATTTGAATTTGAAAATTGGGTAACCGAAAATTC  
AAAGTCGCTGATTTAACTGGCTCTAAATGTCTATTTTTCTCTTGTAGAGAGTAACTTTCAGAAG  
AAATTGGTCTTTTAA
```

Borne 3' plasmide banque

```
TGATAGGGATGACGTAGAACAAAACCTGAAAAACAAGCCTATTTGGAAAAGACTGTGGGCTAAGA  
GCCAAAAGGTTGTTATAAGCTATGTAAGAATTTGTTAGAGTAAATAGTAAAATAAAGCCCTAGC  
GTTATAGCGTTTTACTGATG
```

#### Insert A2

Borne 5' plasmide banque

```
GATCAAGTGCCTAAGTGGTTAGTTTCTTAATACGAGAACCTGAAATACCAGATTTCAAATCTTTGA  
ATGATTCCAAGGTAGCTACAAAATTTGAAAATCGTCGTCCTGCTGCATTATGGGATGTTTAGTAT  
GTTTGTGCTTTCCGGT
```

Borne 3' plasmide banque

```
GATCAAAGGATCGCTCCTATTTTCATTGACCCACAAAATGAAGATAAAATCTTATGCTACATCTTGG  
CAATCATAATGCATTTGGATAACTTCATTGTTGAAATCACACCCTTAGCACACGAATTGAACTTGA  
AACCTTCAAAGTTGTCAGTTT
```

Insert A3

Borne 5' plasmide banque

GATCAGTATCATTAAGCGCTTATAACCTGACCGACGAAGGTTACCAATGGGGTGAAGAAAATAAG  
GATATAATGAACGTGCTATCGGAAGGGTTTGAGCCTACTTTCAGCACGCATGCCAATTACTTCTC  
TCTGACCGTATC

Borne 3' plasmide banque

GATCTTGGTAGCACCTTTTACCAACTTGAAATATGTTGTCATCTCGCCTCAATCGAAATTTATACTC  
TAGTATCTGCGATATCGAACAGTCCCTTTATATTTACGAGACAGGTTTTGTCCTTCTCCCCACCA  
AAAAGACGCTATAAAATACTAAA

Insert A4

Borne 5' plasmide banque

GATCCTTTAATCGAGTATGAGGTACGATTACCATATTGAATGGATTTTTGGAAAGCCTATCTTCA  
AACACATCAAAATTTAAAGATAATATCATTCTTTTGAGAAAGGAAATTCAACACTTGCAAGCATAT  
ATATATATATATACATATAGTTAATTAGTAC

Borne 3' plasmide banque

GATCTTGTCTTATTGGACTAATTCGCAATTTGACATATATGACATATATTACGGAGAATTTTTAA  
ATATGCTTATATTACATGTGTATAATTTACGTATTCTTGAAGGTTTTGAAAGGTTTCAGACGCCTCAA  
TTTTTCTATATTACTTTC

Insert A5

Borne 5' plasmide banque

GATCATCATAATGATGTTCCCTGAAGCACCTGTGTAAAATATTGTTTAATTTAACGAACCCTGTAA  
AACATCAGTATAAAATGCGATTAAGTATAGTAAAATAACAATATTCATTTGGTGACT

Borne 3' plasmide banque

GATCTGTTGGCCTATGTATATTTCTTTTTGACTTTGTTTTGCGGAGTATGGGCTTATAGAACCCTACT  
TAAAAAGATTAAGTCTTATTAAGGTAGAAGTGGTAAGCATTTGGATGCACCTGTGGGACCTATTT  
TGTTTGCAGTTGTATTAA

Insert A6

Borne 5' plasmide banque

GATCAAGCCAATTTATAATAACAAGCGATTGATAAACAGAGTATACATAGCTACTATGCGACTGA  
GAGATCAATCGGTTATCGTGAGCACCTACCTTTAAGGTTTAACAGATCTGGACGTGATTTTTTTTT  
TTTTTTTTGACG

Borne 3' plasmide banque

GATCCAGGATATGGTATCATTGCAGGAGTTGGTGCATTCATCGGATGGTAGTAATAGTAATAAGG  
CATATATGGAGCGGGCATTGCACTTGCATTAACATTCGCAGTCGCATTTGCAGTCGCATTTGCAGT  
CGCATTTGCAGTCGCATCTCC

Insert A8

Borne 5' plasmide banque

GATCCTACCTGGAAAGCAAAGGTGAAAATCATCGTAAACGTGTGTTAATCCCTGTATCCGCTCATG  
GTACAAATCCGGCTTCTGCCGCTATGGCGGGTTTAAAAGTTGTTCTGTCAACTGTTTGCAGGATG  
GCTCATTAGATCTGGTTGACTTAAAGAATAAG

Borne 3' plasmide banque

GATCTTCTATACGGCGTGGTGGTAAGGTTGGAGGGGTCGATGAAGAAGAATTACCTACAGCACTC  
GTTGGTGATTTGGAGGGAGTCGATTACCATGGGGCGCCTTCAAATGAAGAGTTTCCGCATTAAC  
ACCTGCCTCGGAGGTAAGTGT

Insert A10

Borne 5' plasmide banque

GATCTAAACAAAATGCTGTCACCTAACCGTAGTATTAATGACACACTTTGGTGACTTTTCGTTAATG  
GGGATGTGGTAGTGGCCATTGCCAATAAACAAAAAGAACAGGGAAAGAAGTAGAAAGTGATATA  
AGTTTGCTTGCCACTTTTCGTTTTTCACGAAAAAACAGGC

Borne 3' plasmide banque

GATCTATACAAGGAAATTATACCTGAAAAACAATGCATAAGGTTGCTAATGGCCAGCACTACTT  
TTTGAAATTGTATAAAAAGGATTTAGAATCTGAATACTGGCCACGTTTGACAAAGGAAAAGGTGA  
AGTACCCTTACATCAAAACTGATT

Insert A11

Borne 5' plasmide banque

GATCATGATGGGAAAGCGGGGATTCGGCGAAGAACGAGACTGGAAAGGGAAAAAGAGAAATACT  
GGTGGAAGTATTCGGACCTTTGGCGAAGTCCGAACCCTTGAAACCCAAAGATGATCGAT

Borne 3' plasmide banque

GATCCGCTTGAGCAAAGCCCTAGTATATCTATGGAACCTGTTAGTATCAATGAAACAGGAAGCGC  
ATATACAACACTACGAACACAGCACTAAACGATATTGACATTCCATTCTCCATCAATGAGTTGAACGA  
GCTATACAAACAAGTATC

Informations complémentaires

Taille minimum retenue pour une ORF : 300 pb

Taille médiane des régions intergéniques correspondant aux promoteurs chez *Sc* : 455 pb

Taille médiane des régions intergéniques correspondant aux terminateurs chez *Sc* : 275 pb

Source : « Properties of untranslated regions of the *S. cerevisiae* genome » Tamir Tuller ; Eytan Rupp and Martin Kupiec. BMC Genomics 2009, 10:391 doi:10.1186/1471-2164-10-391

<b>CODE COULEUR DES MILIEUX</b>
---------------------------------

MILIEU	CODE COULEUR
YPG 8	AUCUN
MC + 5 FOA	2 traits ROUGES :
MC - URA	1 trait NOIR :
YPG A	2 traits VERTS :
MC - LYS	1 trait BLEU :
MC - HIS	1 trait VERT
MC - TRP	1 trait ROUGE :

<b>CONSIGNES À RESPECTER</b>
------------------------------

**PORT DE LA BLOUSE OBLIGATOIRE. CHEVEUX LONGS ATTACHES**

- 1) Mettre dans la bassine se situant sur la paillasse latérale, les velours sales.
- 2) Sur la charrette se situant dans votre salle de TP :
  - mettre la verrerie sale dans la bassine (étaloirs, erlens vidés et couchés...)
  - dans le panier, mettre les pots entamés ou vides d'ependorf et les boites entamées ou vides de cônes.
- 3) Sur chaque poste vous disposez d'une bouteille pour jeter vos eppendorfs, cures-dents plats et cônes contaminés.
- 4) Sur la paillasse latérale, dans un panier métallique, vous trouverez des sacs à autoclaves pour mettre les boîtes « ratées » ou contaminées ainsi que les tubes en plastique ou les pipettes qui sont trop volumineux pour les bouteilles.

### Planning TP génétique 2024-2025

Semaine	Séance A <b>LUNDI</b>	Séance B <b>MERCREDI</b>
Semaine 1		<b>TP1 : 5 mars</b> Intro TP Présentation du <b>CRIBLE et des INTERACTIONS GENETIQUES</b> Souche MH2083 (colonies sur boites) Sélection sur boites des <b>candidats</b> (14 + témoin) <b>Ségrégation mitotique</b>
Semaine 2	<b>TP2 : 10 mars</b> Analyse <b>ségrégation mitotique</b> du plasmide <b>Sous sélection de 5 candidats</b> Présentation du crible 5FOA (sélection du caractère absence de croissance). repiquage 5FOA	<b>TP3 : 12 mars</b> <b>Préparation du plasmid scuffling</b>
Semaine 3	<b>TP4 : 17 mars</b> Choix définitif de <b>deux candidats</b> Boite stock Culture solide pour <b>Plasmid shuffling</b> <b>TCF/TDR</b> Matrice croisement	<b>TP5 : 19 mars</b> <b>Plasmid shuffling</b> : transformation plasmidique <b>TCF/TDR</b> : Croisements
Semaine 4	<b>TP6 : 24 mars</b> <b>TCF/TDR</b> : 1 <sup>ère</sup> réplique sur MC-lys <b>INFORMATIQUE</b> 1 <sup>ère</sup> séance : banque d'ADN génomique. Clonage par complémentarité fonctionnelle	<b>TP7 : 26 mars</b> <b>TCF/TDR</b> : 2 <sup>ème</sup> réplique sur MC-lys <b>Plasmid shuffling</b> : lecture des transformations et purification sur MC-trp Feuille questionnaire étudiant à remplir
Semaine 5	<b>TP8 : 31 mars</b> <b>INFORMATIQUE</b> 2 <sup>ème</sup> séance. Analyse bibliographique sur un candidat	<b>TP9 : 2 avril</b> <b>Plasmid shuffling</b> : strie des transformants + témoins sur YPG <b>TDR-TCF</b> strie 2n + témoin sur YPG et spot 5FOA <b>Correction croisée des questionnaires</b>
Semaine 6	<b>TP10 : 7 avril</b> <b>TCF/TDR</b> : lecture <b>Plasmid shuffling</b> : lecture <b>Bilan global</b> <b>Présentation des synthèses sur les gènes par les étudiants</b>	

10 séances de 3H avec 2 séances par semaine sauf semaine 1 et 6.