

## 5.4 Epreuve de travaux pratiques de contre-option du secteur A : Sujet et commentaires

### 5.4.1 Présentation de l'épreuve

L'épreuve pratique de contre-option du secteur A s'intéressait à la multiplication de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le sujet s'articulait autour de plusieurs montages microscopiques simples, de comptages et mesures nécessitant l'élaboration puis la mise en œuvre de protocoles faisant appel à des techniques classiques, et de l'analyse génétique de résultats de tests simples réalisés à partir des souches étudiées et présentés sous forme de photographies.

#### **1<sup>ère</sup> partie :**

Les candidats devaient d'abord rappeler, au moyen d'un schéma, les caractéristiques du cycle de multiplication de la levure *S. cerevisiae*, posant les bases théoriques, ainsi que le vocabulaire indispensable au traitement de l'ensemble du sujet. Des termes scientifiques précis liés à la reproduction sexuée et asexuée étaient attendus. Les événements cellulaires bornant les phases haploïdes et diploïdes devaient être clairement indiqués.

Il s'agissait ensuite de réaliser des montages et observations microscopiques de deux souches fournies en suspension, de façon à déterminer laquelle contenait des asques et était par conséquent diploïde. Le même type de manipulation était ensuite demandé, cette fois afin de déterminer le type sexuel d'une souche haploïde, les critères d'identification, non exigibles, étant fournis. Si cette partie a le plus souvent été correctement traitée, le jury a remarqué plusieurs défauts dans la réalisation et l'observation de montages pourtant basiques. En particulier, le réglage du diaphragme est parfois mal maîtrisé ; l'utilisation d'un objectif à immersion sans huile est inefficace et dangereuse pour le matériel d'optique ; la quantité de liquide placée sous la lamelle est parfois inadaptée ; le fait de laisser une lame très longtemps sur le microscope allumé conduit à une évaporation rapidement nuisible à la qualité de la préparation. L'observation, activité essentielle en biologie, doit être complète et critique. Pour pouvoir déterminer la souche diploïde ou le type sexuel, il était nécessaire de comparer les deux situations proposées. Par ailleurs, un échantillon biologique est par nature diversifié : il ne faut donc pas se contenter du premier objet observé mais parcourir la lame afin d'en choisir un qui soit représentatif. Enfin, le jury accorde une part importante à l'adéquation entre le dessin réalisé et le champ microscopique qui est montré. Il ne s'agit donc pas de coller des connaissances ou attendus sans lien avec la réalité observée.

Les candidats devaient ensuite déterminer la relation entre densité optique à 600 nm et concentration en cellules pour deux souches fournies en phase stationnaire. Cette partie manipulative, plus longue et demandant un peu d'initiative, n'a pas été traitée par tous les candidats, qui ont préféré basculer sur la deuxième partie, plus documentaire. Le jury rappelle que le barème d'une épreuve de travaux pratiques valorise les manipulations et pénalise donc cette stratégie d'évitement.

Si les comptages sur lame Kova, dont l'utilisation était intégralement expliquée, n'ont souvent pas posé de problème, le calcul des concentrations des suspensions a révélé des lacunes surprenantes. De nombreux candidats ne savent pas convertir des microlitres en millilitres et le facteur de dilution initial a souvent été oublié. Il est attendu des candidats qu'ils exercent leur esprit critique sur le résultat obtenu. Ainsi une valeur de quelques cellules par millilitre doit alerter sur une probable erreur de calcul, ou tout du moins donner lieu à un commentaire. La taille des cellules a souvent été correctement estimée, mais la méthode utilisée rarement expliquée.

Les méthodes proposées puis mises en œuvre par les candidats pour diluer les suspensions ont fait perdre un temps précieux à certains, alors que les volumes fournis et le matériel proposé devaient amener à une dilution en série très rapide à réaliser. L'utilisation du colorimètre ne semble pas bien

maîtrisée, alors que les aspects purement techniques, qui dépendent du modèle utilisé, étaient intégralement fournis. Ainsi, de nombreux candidats ont découvert en arrivant au poste de mesure qu'il fallait prévoir de réaliser un « blanc » (valeur de référence). Ce dernier ne peut pas être réalisé sans cuve, ni avec une cuve vide ; le seul facteur variant avec les conditions suivantes devant être la présence des levures. Toutes les mesures nécessitant d'être réalisées dans les mêmes conditions, l'orientation de la cuve n'est pas aléatoire. Le jury rappelle que toute manipulation nécessite de se poser des questions sur son objectif et ses conditions de réalisation. Les candidats qui ont obtenu des valeurs cohérentes ont tracé des courbes dont l'allure globale était classique et qui permettaient, à condition d'être considérées dans leur portion linéaire, de déterminer une relation proportionnelle entre densité optique et nombre de cellules. L'influence de la taille des cellules sur cette relation n'a pas souvent été démontrée.

## **2<sup>ème</sup> partie :**

Bien que découlant largement des bases théoriques mises en place en première partie, la seconde partie pouvait être traitée de façon indépendante. L'utilisation de la levure, organisme à cycle haplodiplophasique, permettait d'exploiter génétiquement les caractéristiques des phases haploïdes et diploïdes pour l'étude de mutants thermosensibles (4 mutants *cdc*) : tests génétiques classiques de dominance/récessivité, allélisme/complémentation et analyse de descendance impliquant la ségrégation d'un ou deux gènes.

Les observations microscopiques des mutants ont donné lieu à des conclusions surprenantes. Les phénotypes des mutants à température non permissive étaient très simples : arrêt homogène en phase non bourgeonnante ou arrêt en phase « gros bourgeon » alors que la souche sauvage (témoin) présentait toutes les étapes du cycle cellulaire. Peu de candidats ont observé et encore moins correctement interprété ces différences alors que leurs mesures de taux de bourgeonnement étaient correctes. Bien qu'il était mentionné que les mutants avaient été obtenus à partir de la souche haploïde de départ, des sur-interprétations grossières des observations microscopiques ont été faites : des figures de division ou des cellules de petite taille comme argument de l'état haploïde de la souche ou l'absence de mitose ou des cellules de grande taille comme argument de l'état diploïde ; la synchronisation en une phase comme un ralentissement de la division alors que le test de croissance montrait une absence de croissance. Il est possible que les résultats inadéquats de ces observations résultent d'observations à un grossissement mal adapté : observation d'un ensemble de cellules vs des cellules isolées étaient nécessaires. De plus, la relation entre niveau de ploïdie et taille montrée en première partie ne devait pas aboutir au raisonnement inverse lors de cette partie.

Pour l'analyse génétique, des confusions ont été relevées : entre thermosensibilité et récessivité des phénotypes observés, entre tests de complémentation et de dominance, entre ségrégation allélique (notion de déterminisme monogénique d'une différence phénotypique) et indépendance génétique, entre exploitation d'asques non ordonnés et ordonnés. Ces difficultés dans la maîtrise de l'analyse génétique classique semblent provenir la plupart du temps d'un défaut de raisonnement portant sur le fait que les cellules dont on observe le phénotype sont haploïdes ou diploïdes. Néanmoins, plusieurs candidats ont su traiter de façon pertinente l'ensemble du sujet.

Le sujet ne nécessitait pas de connaissances particulières hormis le mécanisme fondamental de l'alternance de phases haploïde/diploïde lors de la reproduction sexuée, mais devait s'appuyer entièrement sur des observations, d'où découlaient des conclusions directes. Il était important de prendre en compte le déroulé logique du sujet.

En conclusion, le jury tient à rappeler que pour s'inscrire dans une démarche scientifique, il convient d'observer et d'analyser avec rigueur les résultats obtenus avant d'en tirer des conclusions. Modifier la réalité observée pour la faire correspondre à ses *a priori* va à l'encontre d'une démarche scientifique que les enseignants de SVT doivent transmettre à leurs élèves.

#### 5.4.2 [Sujet commenté](#)

Les informations qui suivent constituent des indications mais en aucun cas un corrigé complet.

NOM :

Prénom :

Salle :

**AGRÉGATION DE SCIENCES DE LA VIE -  
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS**

**CONCOURS EXTERNE – ÉPREUVES D'ADMISSION – session 2017**

**TRAVAUX PRATIQUES DE CONTRE-OPTION DU SECTEUR A**

**CANDIDATS DES SECTEURS B ET C**

**Durée totale : 2 heures**

**Caractérisation du cycle de multiplication de la levure**

***Saccharomyces cerevisiae***

L'objectif de ce travail est de caractériser certains aspects du cycle de multiplication de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi que quelques souches porteuses de mutations.

Les deux parties peuvent être traitées de façon indépendante.

La liste des cultures fournies est donnée en annexe.

**Partie I : Quelques aspects du cycle de multiplication de *S. cerevisiae***

page 1

*Durée conseillée : 1h15 – barème : 60/100*

**Partie II : Caractérisation génétique de différentes souches mutantes**

page 9

*Durée conseillée : 45min – barème : 40/100*

Les réponses aux questions figureront dans les cadres réservés à cet effet.

**N'oubliez pas d'appeler un examinateur lorsque cela est demandé.**

**AVANT DE REMETTRE VOTRE DOSSIER, VÉRIFIEZ QUE VOUS AVEZ BIEN INDIQUÉ VOS  
NOM, PRÉNOM ET NUMÉRO DE SALLE EN TÊTE DE TOUS LES DOCUMENTS.**

**Vous devez rendre la totalité des feuilles du dossier**

NOM :

Prénom :

Salle :

**Partie I : Quelques aspects du cycle de multiplication de *S. cerevisiae***

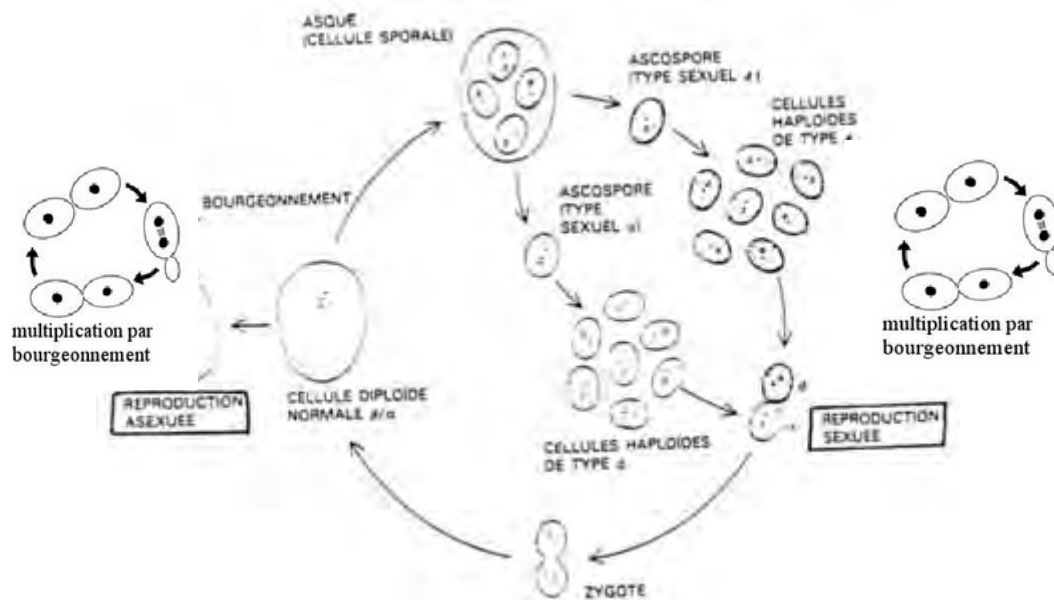
Vous disposez de deux souches de levures, l'une haploïde et l'autre diploïde. Le généticien qui a réalisé l'ensemencement a appelé ces échantillons A et B, ce qui ne permet pas de savoir quelle souche est la diploïde ou l'haploïde. Par ailleurs, il n'a pas noté le signe sexuel de la souche haploïde.

Il s'agira d'identifier les souches A et B fournies, et de préciser le signe sexuel de la souche haploïde.

**I-A Schématisation du cycle**

**Question Q-IA : Représenter sous forme de schéma le cycle de multiplication de *S. cerevisiae*.**

Réponse à la question Q-IA



NOM :

Prénom :

Salle :

### I-B Observation de la sporulation

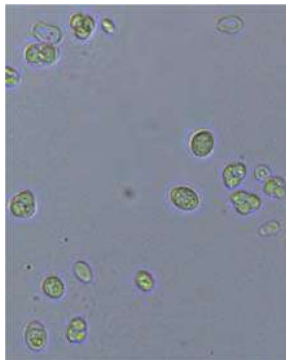
Des cellules des souches A et B ont été incubées 72h sur un milieu AcK, conditions qui induisent la sporulation et la formation d'asques chez un diploïde. L'objectif est d'identifier, à partir de ces cellules en milieu AcK, laquelle des souches A et B est la souche diploïde.

**Question QI-B : A partir des suspensions de chacune des souches A (tube 1) et B (tube 2), réaliser un montage entre lame et lamelle (sur la même lame, à l'aide d'une pipette automatique P200). Réaliser un dessin légendé de l'observation pour la souche diploïde. Présenter à un examinateur un champ qui permette de conclure, en parallèle du dessin légendé et de l'identification de la souche diploïde.**

Réponse à la question QI-B

Dessin d'observation uniquement pour la souche diploïde :

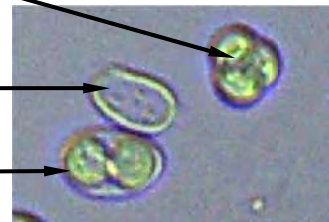
Seule la souche B laisse voir des asques en tétrade, et pas la souche A. Elle est donc capable de réaliser la méiose et est la diploïde.



Une ascospore (ou spore)  
d'une tétrade (méiose achevée)

Paroi d'un asque (vidé)

Deux cellules issues de la  
première division de méiose



Identité de la souche diploïde (entourer la réponse) :    A    ou    **B**

### I-C Détermination du signe sexuel



Le signe sexuel d'une souche peut être déterminé en la croisant avec deux souches de référence de signe connu, a et alpha. En présence du signe sexuel opposé, les cellules se déforment (*shmoo*), avant de fusionner et donner des zygotes en forme d'haltère puis en trèfle. L'objectif est d'identifier le signe sexuel de la souche haploïde.

La souche haploïde a été incubée en présence de chacune des souches de référence de signe a et alpha . Vous disposez de chacun de ces mélanges dans les tubes 3 et 4 :

| Croisement (mélange) | Référence a | Référence alpha |
|----------------------|-------------|-----------------|
| Souche haploïde      | tube 3      | tube 4          |

|       |          |         |
|-------|----------|---------|
| NOM : | Prénom : | Salle : |
|-------|----------|---------|

**Question QI-C :** A partir des suspensions des croisements (tube 3 et 4), réaliser un montage entre lame et lamelle (sur la même lame). Réaliser un dessin légendé de l'observation pour les souches qui croisent. Présenter à un examinateur un champ qui permette de conclure, en parallèle du dessin légendé et du tableau indiquant par un « + » si les souches croisent et un « - » si elles ne croisent pas. Identifier le signe sexuel de la souche à tester.

|  |                    |                        |
|--|--------------------|------------------------|
| Réponse à la question QI-C   |                    |                        |
| <b>Croisement</b>  | <b>Référence a</b> | <b>Référence alpha</b> |
| <b>Souche haploïde à tester</b>  | -                  | +                      |
| <p>Dessin d'observation uniquement pour les souches qui croisent :</p> <p><i>Seules les levures du tube 4 présentent des formes en haltère (à gauche) et en trèfle (à droite) : elles sont donc capables de croiser avec la référence alpha et sont de signe a.</i></p> <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 20px;">   </div> <p>Signe sexuel de la souche haploïde (entourer la réponse) : <input checked="" type="checkbox"/> a ou <input type="checkbox"/> alpha</p> |                    |                        |

**I-D Caractérisation de cultures des souches A et B**

La concentration en cellules d'une culture peut être déterminée de plusieurs façons. L'objectif est de déterminer la relation entre densité optique à 600 nm et concentration en cellules pour chacune des cultures des souches A et B en phase stationnaire.

A partir de chacune des suspensions fournies, la concentration en cellules sera déterminée après dénombrement sur lame de numération Kova. Une gamme de dilution sera réalisée et la densité optique (DO) mesurée à 600 nm. La courbe  $DO_{600} = f(\text{concentration en cellules})$  sera alors construite.

Matériel fourni : cultures en phase stationnaire de cellules des souches A (tube 5) et B (tube 6). Les manipulations des questions I-D-1 et I-D-2 peuvent être traitées dans l'ordre au choix du candidat.

NOM :

Prénom :

Salle :

### I-D-1 Numération sur lame Kova

Attention, les tubes 5 et 6 sont à utiliser dans les questions I-D-1 et I-D-2. Isoler au maximum 100µL du contenu des tubes 5 et 6 dans un tube Eppendorf pour la numération sur lame de Kova.

Réaliser une numération des cultures des souches A (tube 5) et B (tube 6) sur lame Kova. La notice d'utilisation de la lame est donnée en annexe 2.

#### Question QI-D-1A : Donner le résultat des comptages en explicitant les calculs.

Réponse à la question QI-D-1A

Souche A (tube 5) :

Dilution effectuée (entourer la réponse correspondant à votre protocole) :  Oui  Non

Si oui, quelle dilution ? de 20 à 50 (ici 50) Faire un schéma précis de votre protocole de dilution :

*Dilution en deux fois après évaluation globale de la concentration sur lame Kova.*

Nombre de cellules totales comptées : 110 Nombre de carrés élémentaires concernés : 3

Concentration cellulaire de la suspension du tube 5 (en nombre de cellules par mL) :  $1,84 \cdot 10^8$  cellules/mL

Souche B (tube 6) :

Dilution effectuée (entourer la réponse correspondant à votre protocole) :  Oui  Non

Si oui, quelle dilution ? 20 Faire un schéma précis de votre protocole de dilution :

*Idem*

Nombre de cellules totales comptées : 144 Nombre de carrés élémentaires concernés : 3

Concentration cellulaire de la suspension du tube 6 (en nombre de cellules par mL) :  $0,96 \cdot 10^8$  cellules/mL

#### Question I-D-1B : Déterminer, en indiquant la démarche utilisée grâce à l'annexe 2, la taille des cellules pour les souches A et B. Conclure.

Réponse à la question QI-D-1B

*On utilise la référence de l'épaisseur d'un trait fin de la lame Kova (ou l'échelle indiquée sur la photo).*

Pour A : 5-6 µm

Pour B : 8-9 µm

NOM :

Prénom :

Salle :

**I-D-2 Mesures de la densité optique à 600 nm**

Attention, les tubes 5 et 6 sont à utiliser dans les questions I-D-1 et I-D-2. Utiliser au maximum 500µL du contenu des tubes 5 et 6 pour les mesures de densité optique.

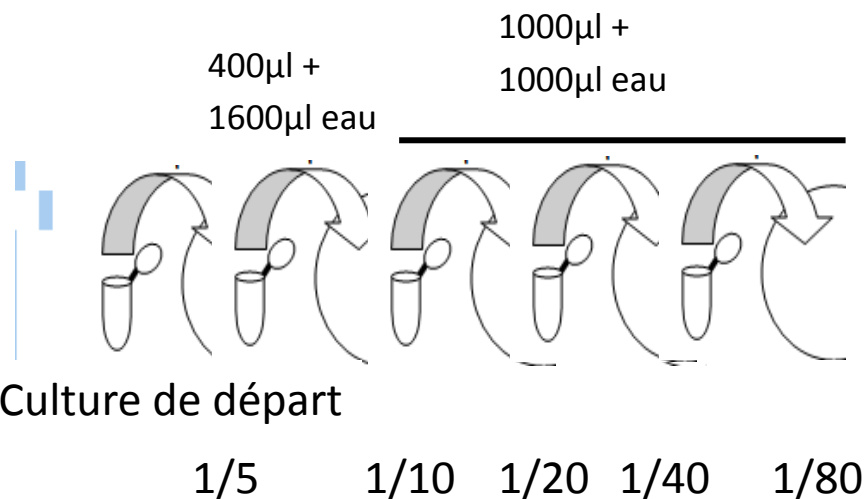
Etape 1 : Réaliser une série de dilutions des suspensions initiales (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80) des souches A (tubes 5) et B (tube 6). Les dilutions seront effectuées dans de l'eau et directement dans les cuves (carrés de parafilm fournis). On précise que le volume minimal permettant la mesure est de 1 mL et que le volume maximal tenant dans une cuve est de 3 mL. Toutes les dilutions seront préparées à votre poste, avant d'aller réaliser les mesures de densité optique à 600nm (DO).

Etape 2 : Faire le zéro de DO à 600 nm avec une cuve remplie d'eau.

Etape 3 : Mesurer la densité optique de chaque dilution pour chaque souche.

**Question I-D-2A : Faire un schéma précis de votre protocole de dilution.**

Réponse à la question I-D-2A



**Question QI-D-2B: Au poste de mesure, remplir les lignes grisées du tableau, et appeler un examinateur pour la vérification des mesures de DO.**

Réponse à la question I-D-2B

| Dilution                        | 1/5                        | 1/10                      | 1/20                     | 1/40                     | 1/80                     |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| DO mesurée pour la souche A     | 1,68                       | 1,23                      | 0,79                     | 0,43                     | 0,23                     |
| Concentration cellulaire pour A | 36,8.10 <sup>6</sup> c/mL  | 18,4.10 <sup>6</sup> c/mL | 9,2.10 <sup>6</sup> c/mL | 4,6.10 <sup>6</sup> c/mL | 2,3.10 <sup>6</sup> c/mL |
| DO mesurée pour la souche B     | 1,42                       | 0,96                      | 0,57                     | 0,3                      | 0,15                     |
| Concentration cellulaire pour B | 19,2. 10 <sup>6</sup> c/mL | 9,6.10 <sup>6</sup> c/mL  | 4,8.10 <sup>6</sup> c/mL | 2,4.10 <sup>6</sup> c/mL | 1,2.10 <sup>6</sup> c/mL |

NOM :

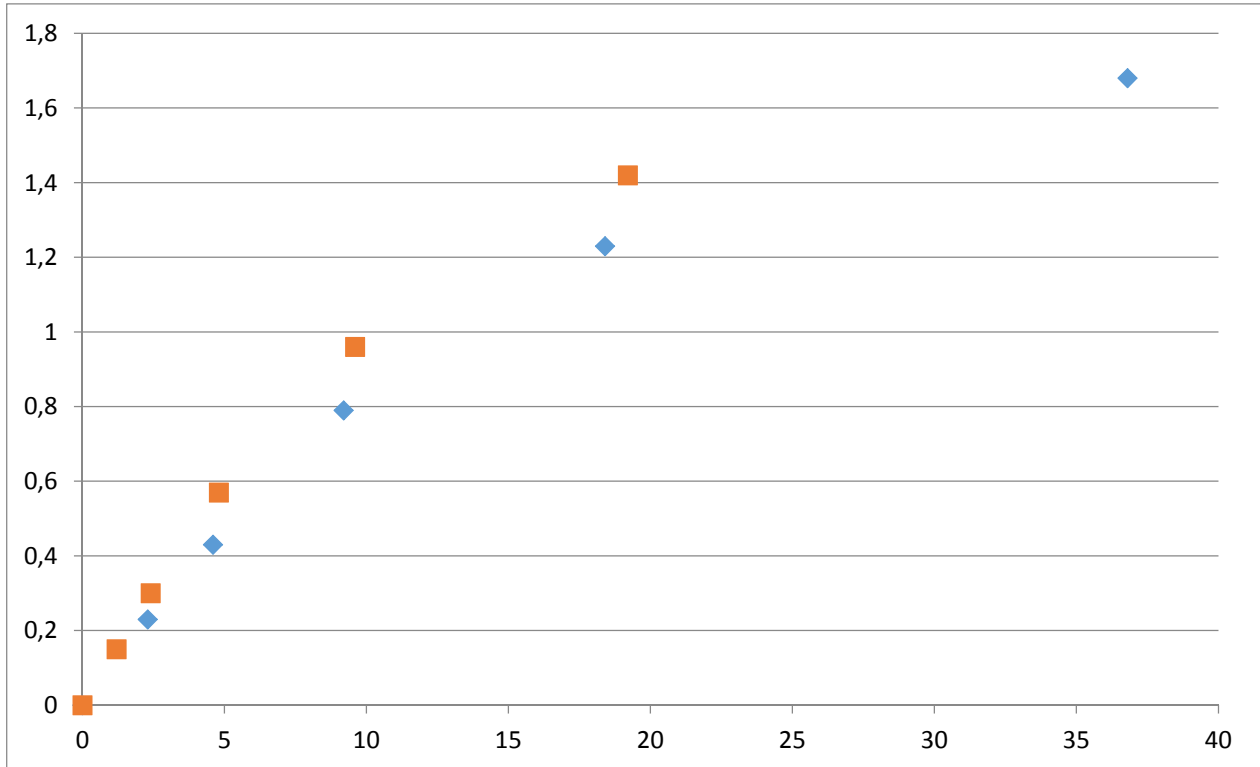
Prénom :

Salle :

I-D-3 Courbes  $DO_{600} = f$  (concentration en cellules)

**Question QI-D-3A : Construire le graphique  $DO = f$  [concentration en cellules] pour chacune des souches A et B sur le papier millimétré. Les deux courbes seront construites sur le même graphique.**

Réponse à la question QI-D-3A



Losanges bleus : B

Carrés rouges : A

Abscisses : nombre de cellules par mL ( $10^6$ )

Ordonnées : DO

NOM :

Prénom :

Salle :

**Question QI-D-3B : Déterminer en le justifiant la correspondance entre unité de DO et concentration en cellules (en nombre de cellules par mL), dans la zone permettant une mesure directe.**

Réponse à la question QI-D-3B

Calcul possible dans la zone linéaire (3 premiers points).

Souche A : 1 unité  $DO_{600} = 1,07 \cdot 10^7$  cellules / mL

Souche B : 1 unité  $DO_{600} = 0,80 \cdot 10^7$  cellules / mL

**Question QI-D-3C : Comparer les résultats pour les souches A et B et conclure sur le paramètre qui peut faire varier la relation entre DO et concentration cellulaire.**

Réponse à la question QI-D-3C

La relation dépend de la souche, dont on a vu que la taille des cellules varie. La taille influence donc la relation entre DO et concentration cellulaire.

NOM :

Prénom :

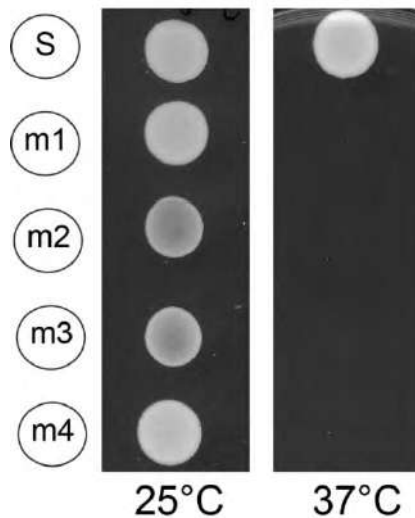
Salle :

## Partie II : Caractérisation génétique de différentes souches mutantes

### II-A Phénotype de croissance à différentes températures

On s'intéresse à quatre souches mutantes (m1 à 4) obtenues par mutagenèse de la souche de référence S et sélectionnées selon un même critère décrit ci-après. La souche S est la souche haploïde identifiée dans la partie I.

La croissance des différentes souches a été testée en déposant une goutte de suspension cellulaire sur milieu complet solide, et testée à différentes températures. Les photographies ci-dessous montrent le résultat de cette expérience à 25°C et 37°C. Le schéma de dépôt est indiqué à gauche des photographies.



**Question QII-A : Comment nomme-t-on ce phénotype ? Interpréter ces résultats.**

Réponse à la question QII-A

Les levures se développent à 25 °C mais pas à 37°C. Le phénotype des 4 mutants est donc thermosensible. Les produits protéiques des gènes sont non fonctionnels à 37°C (structure 3D instable)

### II-B Phénotype cellulaire

On se propose de déterminer le phénotype de croissance des différents mutants par observation microscopique de la morphologie cellulaire et détermination du pourcentage de cellules bourgeonnantes. A 25°C, les cinq souches (S et m1 à 4) ont les mêmes caractéristiques de croissance, en particulier le pourcentage de cellules bourgeonnantes.


Pour chacune des suspensions des souches S, m1 et m3 (respectivement tubes 7, 8 et 9), réaliser une préparation sur lame Kova (notice d'utilisation de la lame en annexe 2) ou entre lame et lamelle. Compter sur environ 50 cellules le nombre de cellules présentant un bourgeon.

|       |          |         |
|-------|----------|---------|
| NOM : | Prénom : | Salle : |
|-------|----------|---------|

**Question QII-B-1 : Indiquer les valeurs dans le tableau ci-dessous.**

| <i>Réponse à la question QII-B-1</i> |                                   |                                   |  |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|
|                                      | Nombre total de cellules comptées | Nombre de cellules bourgeonnantes | Pourcentage de cellules bourgeonnantes |
| Souche S (Tube 7)                    | > 50                              |                                   | <i>Environ 70 %</i>                    |
| m1 (Tube 8)                          | > 50                              |                                   | <i>Environ 100 %</i>                   |
| m2                                   |                                   |                                   | Même phénotype que m1                  |
| m3 (Tube 9)                          | > 50                              |                                   | <i>Environ 0 %</i>                     |
| m4                                   |                                   |                                   | Même phénotype que m3                  |

**Question QII-B-2 : Dessiner l'aspect des cellules pour chaque souche (S, m1 et m3), commenter les observations et interpréter les résultats en termes de cycle cellulaire pour les différents mutants.**

| <i>Réponse à la question QII-B-2</i>   |   |    |    |
|--|---|----|----|
| Dessin   | S   | m1 | m3 |
|  |  |    |    |
| <p><i>Objectif 40. Sur lame Kova ou entre lame et lamelle (moins dense).</i></p> <p><i>S : culture en phase exponentielle présentant toutes les tailles de bourgeons et avec la plupart des cellules bourgeonnantes. Sert de témoin.</i></p> <p><i>m1 : toutes les cellules ont la même morphologie (gros bourgeon non séparé). Elles sont stoppées en phase G2.</i></p> <p><i>m2 : toutes les cellules ont la même morphologie (sans bourgeon). Elles sont stoppées en phase G1.</i></p> <p><i>Les gènes mutés sont donc impliqués dans des étapes du cycle cellulaire.</i></p> |   |    |    |

NOM :

Prénom :

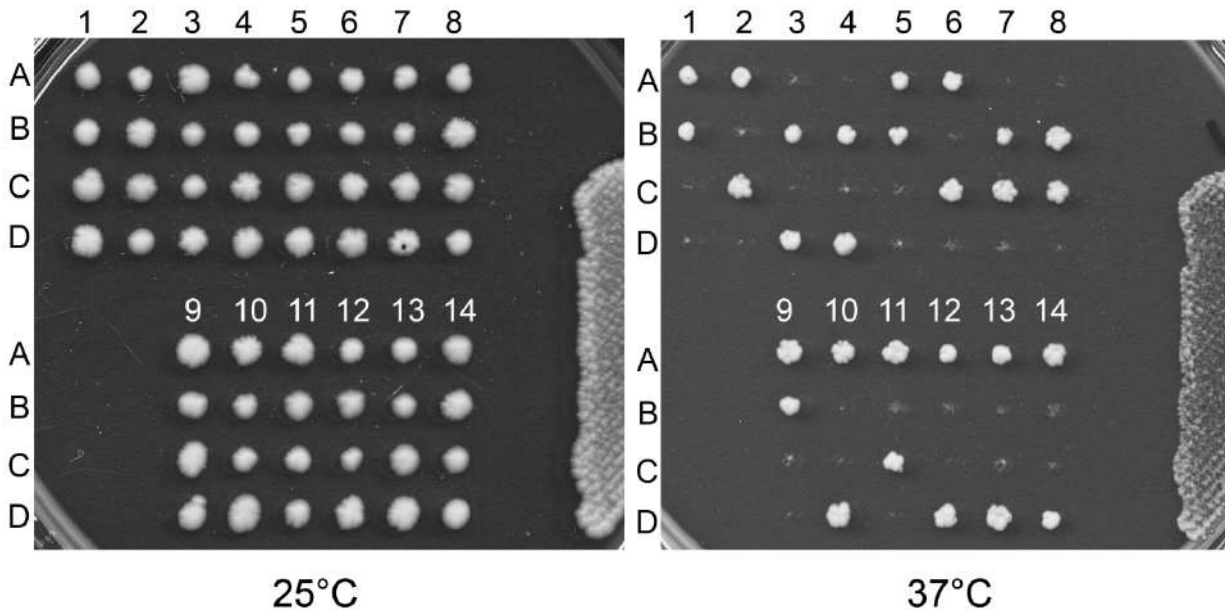
Salle :

## II-C Analyse génétique

Cette partie ne comporte pas de travail pratique et est basée sur l'analyse de photographies de résultats.

### II-C-1 Analyse de la descendance des croisements mutants x sauvage

La souche m1 a été croisée avec la souche sauvage S de signe opposé, et la descendance de ce croisement (m1 x S) analysée : 14 asques ont été disséqués par micromanipulation. Pour chacun, les 4 spores de l'asque ont été isolées et mises en germination sur un milieu complet. Les colonies obtenues ont ensuite été répliquées sur boîtes de milieu complet, qui ont été incubées à 25°C ou à 37°C.



Les numéros 1 à 14 indiquent le numéro de l'asque et les lettres identifient les spores de chaque asque.

**Question II-C-1 : Interpréter les résultats obtenus : quelle conclusion peut-on tirer de ces résultats pour la souche m1 sur le plan génétique ?**

Réponse à la question II-C-1

Ségrégation 2 :2 dans chaque asque.

Déterminisme monogénique de la thermosensibilité : un seul gène (ou couple d'allèle) est impliqué dans la différence phénotypique entre m1 et S.

On précise pour la suite que les souches m2 à 4 présentent le même résultat que m1 pour cette analyse.

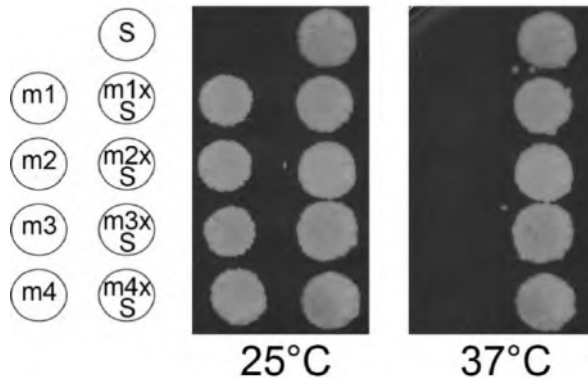
NOM :

Prénom :

Salle :

### II-C-2 Analyse du phénotype des diploïdes issus des croisements mutants x sauvage

Les cellules diploïdes obtenues par croisement de la souche sauvage avec les différents mutants ont été répliquées en déposant une goutte sur milieu complet, et incubées à 25°C ou à 37°C. Le schéma de dépôt est indiqué à gauche des photographies.



**Question II-C-2 : Quel est l'objectif de ce test ? Interpréter les résultats obtenus pour les différents mutants.**

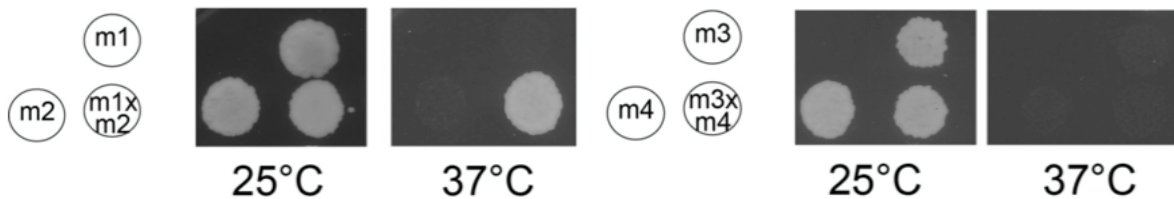
Réponse à la question II-C-2

Définir les relations de dominance / récessivité.

La thermosensibilité est récessive par rapport au phénotype sauvage pour les 4 souches mutantes.

### II-C-3 Analyse du phénotype des diploïdes issus des croisements mutants x mutants

De la même façon, les colonies des souches diploïdes obtenues par croisement entre m1 et m2 d'une part (m1xm2) et entre m3 et m4 d'autre part (m3xm4) ont été répliquées en déposant une goutte sur milieu complet et incubées à 25°C ou à 37°C. Le schéma de dépôt est indiqué à gauche des photographies.



**Question II-C-3-A : Quel est le nom du test réalisé ? Quel en est l'intérêt ? En quoi les résultats du II-C-2 sont-ils importants pour l'interprétation de ce test ?**

Réponse à la question II-C-3-A

Test de complémentation.

Déterminer si deux mutants sont touchés sur un même gène ou non. Ici, la question se pose d'une part pour m1 et m2 qui ont le même phénotype de blocage dans le cycle, et d'autre part pour m3 et m4 (idem).

Le test ne peut s'interpréter que si les phénotypes des mutants sont récessifs (c'est le cas ici).

|       |          |         |
|-------|----------|---------|
| NOM : | Prénom : | Salle : |
|-------|----------|---------|

**Question II-C-3-B : Interpréter les résultats obtenus pour chacun des croisements m1 x m2 et m3 x m4 sous forme d'un schéma. Conclure.**

Réponse à la question II-C-3-B

Pour m1 x m2 :

*Se développe à 37°C : complémentation, indique que les mutations touchent des gènes (ou des unités fonctionnelles) différents.*

*On attend un schéma montrant que chaque souche apporte l'allèle fonctionnel du gène muté chez l'autre, et que la fonction peut être assurée.*

Pour m3 x m4 :

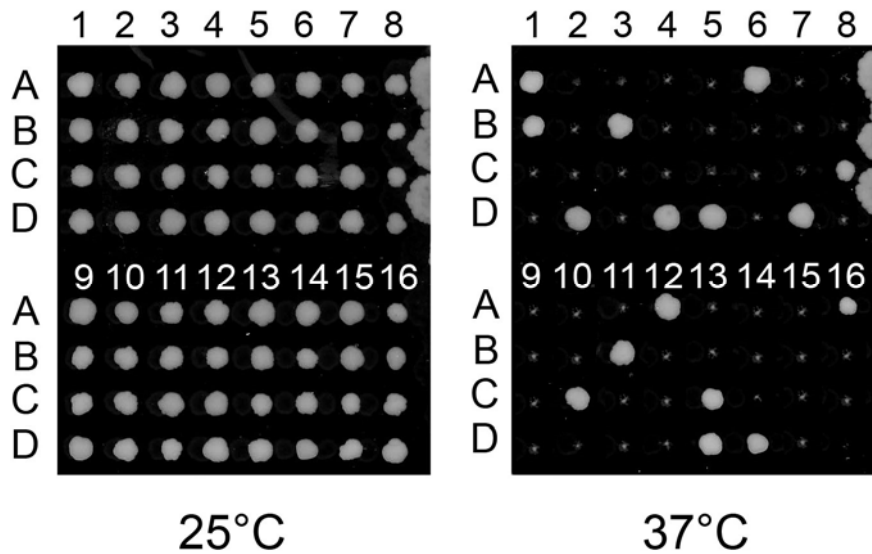
*Ne se développe pas à 37°C : absence de complémentation, indique que les mutations touchent le même gène.*

*On attend un schéma montrant que les deux souches apportent un allèle muté du même gène, et que la fonction ne peut pas être assurée.*

|       |          |         |
|-------|----------|---------|
| NOM : | Prénom : | Salle : |
|-------|----------|---------|

**II-C-4 Analyse de la descendance de croisements mutant x mutant**

Les diploïdes issus du croisement m1 x m2 ont ensuite été mis en sporulation et la descendance du croisement m1 x m2 analysée en asque.



**Question II-C-4 :** Dans le tableau ci-dessous, proposer un génotype pour les spores contenues dans chacun des types d'asques (colonne A), nommer les types d'asques (nomenclature conventionnelle, colonne B), et indiquer leur nombre (colonne C).

| <i>Réponse à la question II-C-4</i> |                  |  |                       |                 |
|-------------------------------------|------------------|--|-----------------------|-----------------|
|                                     |                  | Colonne A  | Colonne B             | Colonne C       |
| Type d'asque                        | Asques concernés | Génotype des spores                                  | Nom du type d'asque   | Nombre d'asques |
| <i>I</i>                            | 1, ...           | 1A (a+,b+)<br>1B (a+,b+)<br>1C (a-,b-)<br>1D (a-,b-) | Ditype recombiné (DR) | 2               |
| <i>II</i>                           | 2, 3, ...        | 2A (a+,b-)<br>2B (a-,b+)<br>2C (a-,b-)<br>2D (a+,b+) | Tétratype (TT)        | 12              |
| <i>III</i>                          | 9, ...           | 9A (a-,b+)<br>9B (a-,b+)<br>9C (a+,b-)<br>9D (a+,b-) | Ditype parental (DP)  | 2               |

NOM :

Prénom :

Salle :

**Question II-C-5 : Exploiter les proportions des types d'asques obtenus. Expliquer l'obtention des génotypes des spores des asques de type II à l'aide d'un schéma.**

*Réponse à la question II-C-5*

*On observe autant de DR que de DP. Les gènes sont donc indépendants (deux chromosomes différents ou même chromosome mais éloignés de plus de 50 cM).*

*Partir par exemple d'un schéma avec deux gènes sur deux chromosomes différents. Les asques tétratypiques proviennent d'une recombinaison entre un des deux gènes et le centromère du chromosome qui le porte.*

**Question II-C-6 : Quel(s) résultat(s) peut-on attendre du même type de manipulation réalisée à partir du diploïde  $m_3 \times m_4$  ? Préciser.**

*Réponse à la question II-C-6*

*Même gène donc loci mutés identiques ou très proches. On attend donc uniquement des spores de phénotype mutant ou très peu dans des asques tétratypiques (recombinaison intragénique).*

|       |          |         |
|-------|----------|---------|
| NOM : | Prénom : | Salle : |
|-------|----------|---------|

ANNEXE 1 : Liste des cultures fournies

Conserver les tubes dans la glace.

Un seul de chaque tube par candidat (pas de remplacement possible).

| Numéro Tube | Contenu   | Questions          | Volume | Objectif          |
|-------------|---|--------------------|--------|-------------------|
| Tube 1      | Souche A en milieu Ack  | <i>QI-B</i>        | 50 µL  | Sporulation       |
| Tube 2      | Souche B en milieu Ack  | <i>QI-B</i>        | 50 µL  | Sporulation       |
| Tube 3      | Souche haploïde croisée avec souche de référence de signe a     | <i>QI-C</i>        | 50 µL  | Type sexuel       |
| Tube 4      | Souche haploïde croisée avec souche de référence de signe alpha | <i>QI-C</i>        | 50 µL  | Type sexuel       |
| Tube 5      | Souche A en phase stationnaire                                  | <i>QI-D-1 et 2</i> | 600 µL | Concentration     |
| Tube 6      | Souche B en phase stationnaire                                  | <i>QI-D-1 et 2</i> | 600 µL | Concentration     |
| Tube 7      | Souche sauvage S après passage à 37°C                           | <i>QII-B-1</i>     | 50 µL  | Analyse génétique |
| Tube 8      | m1 après passage à 37°C   | <i>QII-B-1</i>     | 50 µL  | génétique         |
| Tube 9      | m3 après passage à 37°C   | <i>QII-B-1</i>     | 50 µL  | génétique         |

NOM :

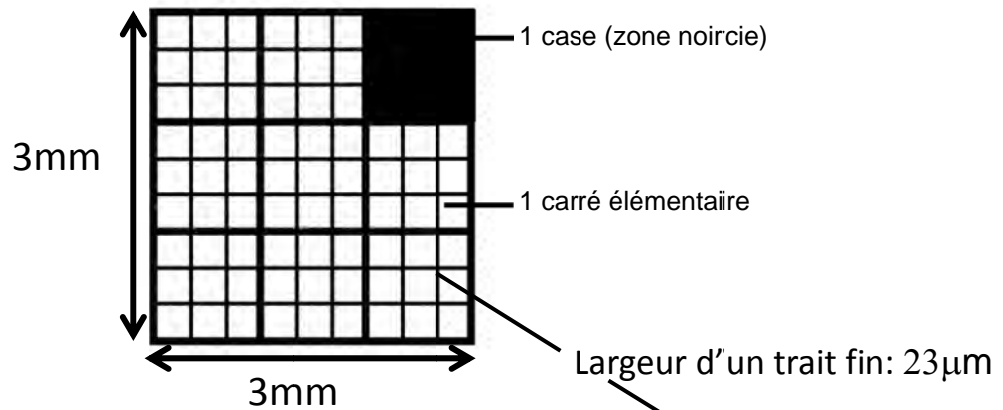
Prénom :

Salle :

## ANNEXE 2 : Notice d'utilisation de la lame Kova

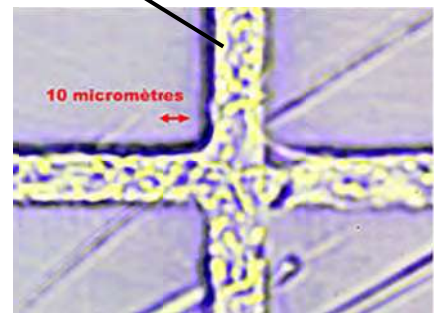
Les lames Kova sont à usage unique et peuvent être annotées à votre convenance. 10 compartiments sont disponibles, ils seront utilisés pour les questions QI-D-1 et éventuellement QII-B-1.

Chaque compartiment comprend une grille de comptage quadrillée (3x3 mm) constituée de 9 cases, chacune subdivisée en 9 carrés élémentaires.



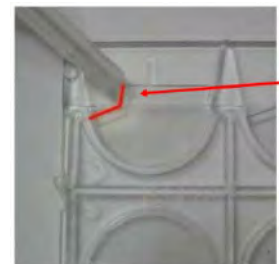
Volume au dessus

- d'un carré élémentaire:  $0,01\mu\text{L}$
- d'une case :  $0,1\mu\text{L}$



### Protocole :

Etape 1 : Prélever un échantillon de la suspension avec une P200 et remplir une cupule de la lame, par capillarité au niveau de l'encoche (flèche). Attention de ne pas déborder !



Etape 2 : Faire la mise au point sur la grille. Pour la numération, se placer dans des conditions de concentration d'environ 10 à 40 cellules par carré élémentaire. Si la concentration est trop élevée, faire une (ou des) dilution(s) dans de l'eau (7 compartiments disponibles). Pour un carré élémentaire, ne pas prendre en compte les cellules qui se trouvent sur les bordures. Compter les cellules bourgeonnantes comme une seule cellule. Compter jusqu'à une centaine de cellules en tout.

Etape 3 : Déterminer le nombre de cellules par unité de volume de la suspension étudiée.