

# 1 SPORULATION DE LEVURES, DISSECTION DES TETRADES ET VERIFICATION DES SPORES PAR REPLIQUES AU VELOURS

## PRINCIPE

Les levures diploïdes sporulent spontanément dans des milieux pauvres. Après sporulation on obtient des asques (la levure est un Ascomycète) contenant 4 spores haploïdes qui sont les produits directs de la méiose (tétrades). Pour disséquer des tétrades, il est nécessaire de les libérer par digestion partielle de la paroi des asques à l'aide de la zymolyase. La zymolyase digère les liaisons  $\beta$  1-3 glucane des protéines glycosylées de la paroi. On effectue une digestion partielle de façon à éviter la lyse des spores et pour que les 4 spores d'une tétrade restent ensemble et ne se dispersent pas sur le milieu.

Afin de vérifier les spores, on effectue des répliques au velours. Ces répliques permettent de transférer des cellules à partir des colonies d'une boîte sur d'autres boîtes vierges. Ceci s'effectue dans différents buts : i- étudier la croissance de ces colonies; ii- obtenir des colonies fraîches; iii- vérifier la ségrégation des marqueurs sur différents milieux sélectifs afin de sélectionner les spores possédant les marqueurs d'intérêt; iii- vérifier le signe sexuel des spores.

## MATERIEL

- Tubes de culture stériles
- Micromanipulateur
- Tambours
- Velours : la laitère contenant les velours sales est autoclavée pour décontamination à 120°C pendant 30 min. Ensuite les velours sont mis à tremper dans de l'eau chaude, puis ils sont rincés à l'eau déminéralisée un par un et mis dans un panier au four afin de sécher. Une fois sec, ils sont disposés dans une grande boîte de Petri ronde en verre et stériliser à 120°C pendant 30 min.

## SOLUTIONS

### **pour sporulation liquide**

- Milieu YPA :

Bacto peptone Difco	10 g	
Bacto yeast extract Difco	10 g	
Acétate de Potassium	20 g	
H <sub>2</sub> O	qsp 1 litre	----> autoclaver

- Milieu A :

Acétate de Potassium	20 g	
H <sub>2</sub> O	qsp 1 litre	----> autoclaver

### **pour sporulation sur boîte**

- Milieu GNA (milieu riche)
- Milieu SPO (milieu pauvre)

### **pour dissection**

- Solution de dissection : Zymolyase 100 T à 1 mg/ml dans du sorbitol 1 M
- Boîte de milieu YPglu de 15 ml. On utilise des boîtes de milieu de 15 ml (donc peu épaisses), afin de voir facilement les spores à disséquer à travers ce milieu.

### *PROTOCOLE DE SPORULATION LIQUIDE*

- Répartir à la pipette 2 ml de milieu YPglu dans des tubes de culture.
- Inoculer un clone à partir d'une boîte YPglu fraîche (ou ayant séjourné moins d'une semaine à 4°C) dans les tubes de culture.
- Incuber une nuit à 30°C sous agitation (sur une roue).
- Transférer 1 ml de la culture dans un tube Eppendorf stérile et centrifuger rapidement.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot de cellules dans 1 ml de milieu YPA et transférer dans un tube de culture.
- Incuber au moins 6 h à 30°C avec agitation (sur une roue).
- Transférer les cellules dans un tube Eppendorf stérile et centrifuger rapidement.
- Éliminer le surnageant et resuspendre le culot de cellules dans 0,5 ml de milieu A puis transférer dans un tube de culture.
- Incuber à 30°C pendant au moins 4 jours avec agitation latérale (sur un portoir incliné).

### *PROTOCOLE DE SPORULATION SUR BOITE*

- Faire un "patch" de la souche sur milieu solide GNA à l'aide d'une anse.
- Incuber à 30°C pendant 24 h.
- Répliquer sur milieu solide SPO.
- Incuber à 30°C pendant au moins 4 jours.

### *PROTOCOLE DE DISSECTION DES TETRADES*

- Observer au microscope entre lame et lamelle la formation des tétrades. Si le pourcentage de tétrades est correcte, prélever une anse de cellules et les resuspendre dans 50  $\mu$ l de la solution de dissection.
- Incuber 10 min à 37°C puis mettre dans la glace.
- Rajouter de l'eau distillée stérile et faire une strie (à l'emplacement prévu montré sur le schéma ci-dessous) sur une boîte de milieu YPglu de 15 ml.
- Utiliser le micro manipulateur (voir le cd-rom).
- Les ascospores provenant d'une même tétrade sont placées à intervalles réguliers (voir le schéma) en évitant de déposer aux emplacements 5 et 10.