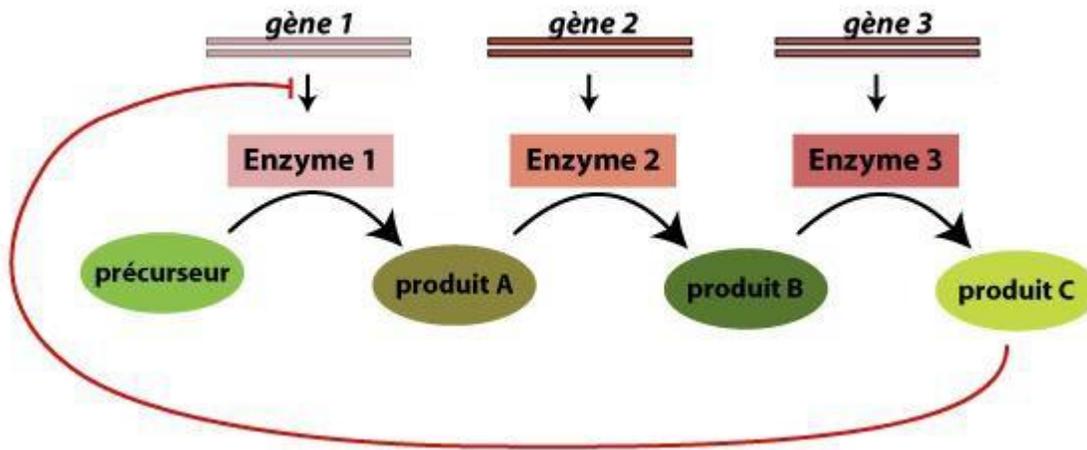


6. La rétroinhibition

Les cellules de bactéries, levures ou mammifères gèrent avec beaucoup de soin leurs dépenses d'énergie. Si un produit synthétisé par la cellule est déjà présent en abondance à l'intérieur de celle-ci ou dans le milieu extérieur, sa production est bloquée. Souvent ce phénomène est dû à l'interaction du produit final avec une molécule servant comme répresseur de l'expression des gènes de biosynthèse. Ce phénomène, dénommé la rétroinhibition, est représenté dans le schéma ci-dessous.



Cette chaîne de biosynthèse est inhibée par son produit C (trait rouge). En présence du produit C dans la cellule ou dans le milieu extérieur, toute la chaîne de biosynthèse sera bloquée. Quand un produit régule négativement sa production, on parle de rétroinhibition.

Thèmes : Régulation de l'expression d'un gène. Voie métabolique. Rétroinhibition.

L'EXPERIENCE

Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la chaîne de biosynthèse de l'adénine contient une douzaine d'enzymes. Les gènes codant pour ces enzymes sont dénommés ADE suivit du numéro correspondant à l'ordre de leurs découverte. Cette chaîne permet la conversion du précurseur, le phosphoribosyl-pyrophosphate (P-ribosyl-PP), en adénine comme schématisé ci-dessous.

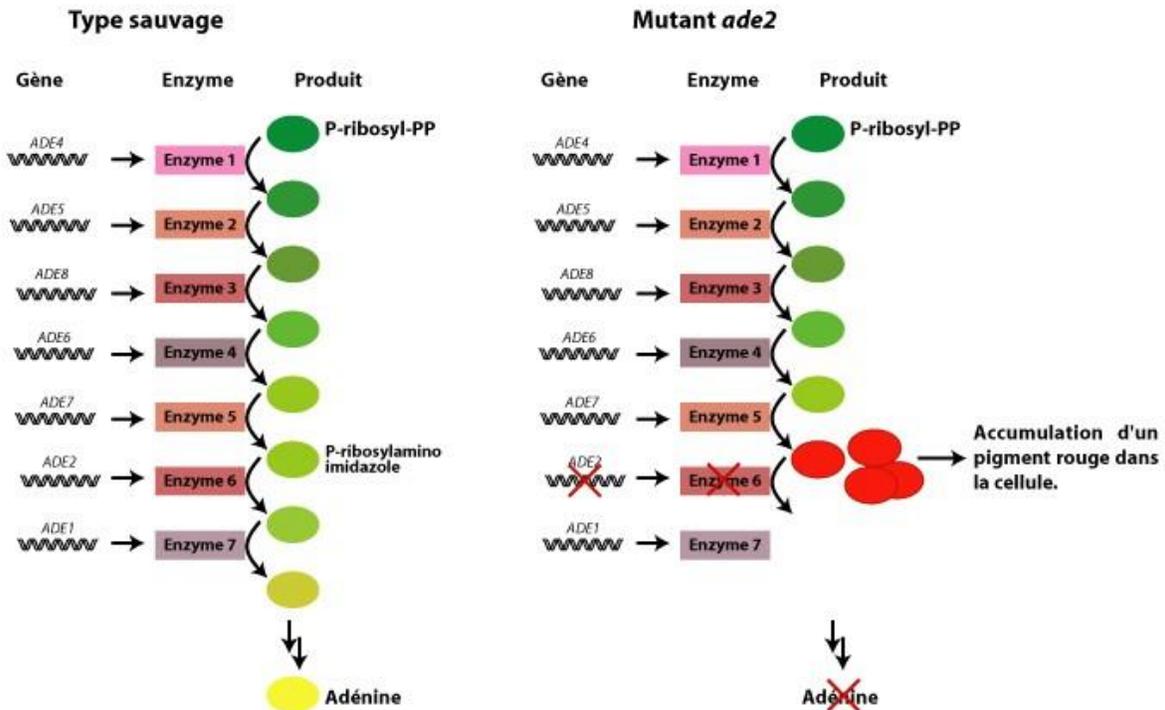


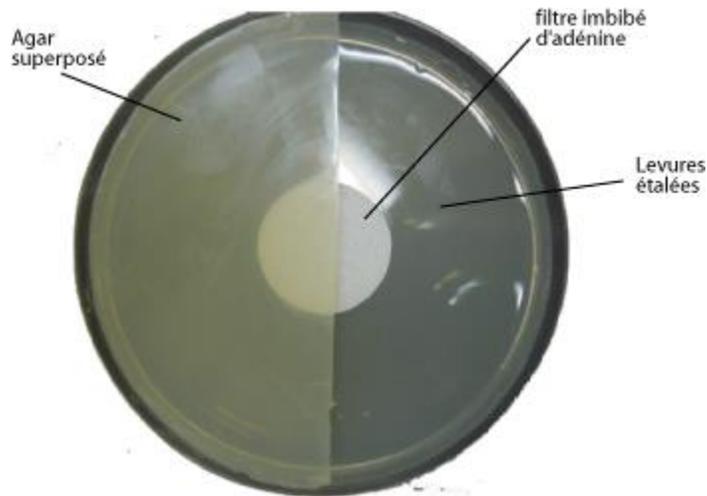
Schéma simplifié représentant la chaîne de biosynthèse de l'adénine chez la levure *Sacharomyces cerevisiae*. A gauche, le type sauvage active l'expression de cette chaîne lorsque l'adénine vient à manquer. L'enzyme 6 n'étant pas fonctionnelle chez le mutant *ade2* (à droite), il n'y a pas de conversion d'un produit. Celui-ci s'accumule dans la cellule où il est oxydé en un pigment rougeâtre. Les colonies prennent alors un aspect rouge en condition limitante d'adénine. Un excès d'adénine dans le milieu bloquera cette chaîne de biosynthèse (rétroinhibition) et le mutant *ade2* restera blanc. En absence complète d'adénine dans le milieu, le mutant *ade2* ne pourra pas pousser (auxotrophie pour l'adénine). L'oxydation du produit accumulé chez le mutant *ade2* est un processus qui dépend de la respiration cellulaire. En absence d'oxygène, la levure peut croître par fermentation mais il n'y aura pas apparition de pigments rouge.

Une levure ayant une mutation dans un de ces gènes ne peut pas croître en absence d'adénine dans le milieu. Elle devient alors auxotrophe. Lorsqu'une mutation dans le gène *ade2* rend non-fonctionnelle sa protéine, le produit intermédiaire (le P-ribosylamino imidazole) ne peut pas être transformé en produit suivant. Le P-ribosylamino imidazole s'accumule alors dans la cellule où il est oxydé en un pigment rouge par un processus dépendant de la respiration cellulaire. L'accumulation de ce pigment est visible dans les mutants *ade2* lorsque l'adénine fournie dans le milieu devient limitante. Dans ce cas, la cellule enclenche la voie de synthèse de l'adénine qui aboutit à l'accumulation du pigment rouge comme représenté dans le schéma ci-dessus. En absence d'oxygène, la levure est capable de pousser par fermentation. Dans ce cas, le produit intermédiaire, l'amino-imidazol-ribotide, n'est pas oxydé et les levures restent blanches.

PROTOCOLE

- Prélever plusieurs colonies de levures *ade2* bien rouges à partir de la boîte que l'on vous a fournie et les mettre en suspension dans 5 ml d'H₂O stérile.
- Vortexer la suspension pour bien resuspendre les levures.
- Etaler 100 µl sur une boîte SD sans adénine.
- Placer un petit papier filtre sur la boîte à l'aide de brucelles stériles.
- Déposer doucement 200 µl de sulfate d'adénine (à 4 g/l) sur le filtre

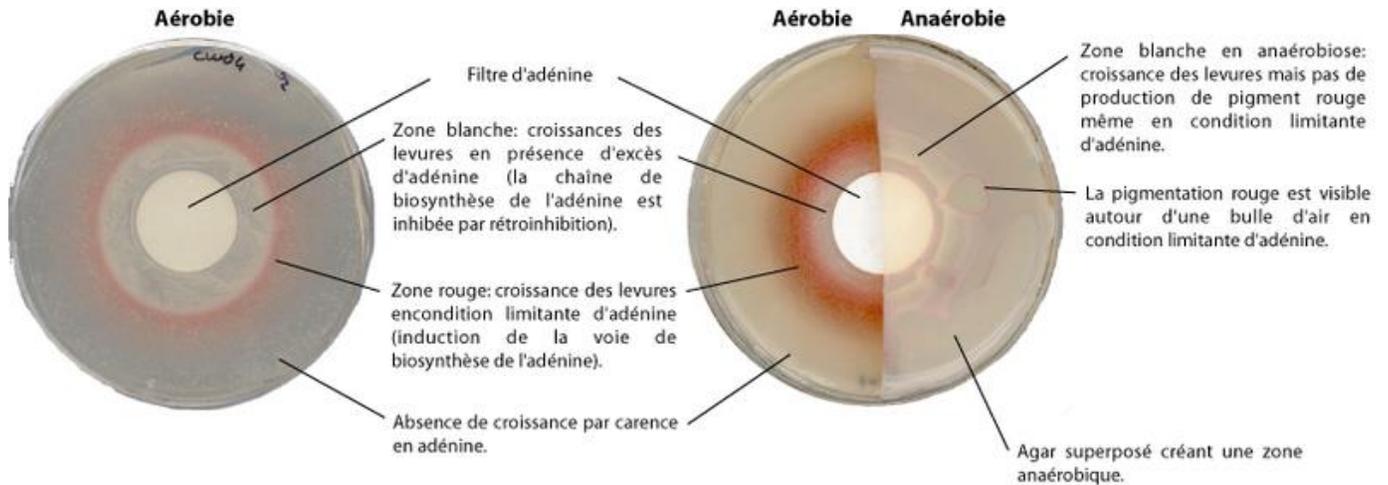
- Afin de créer une zone dépourvue d'oxygène il est possible de découper la gélose d'une deuxième boîte en 2 parties puis de déposer une moitié délicatement sur votre boîte contenant les levures comme représenté ci- dessous. Essayez d'éviter les bulles d'air entre les deux couches d'agar.



- Incuber la boîte à l'envers à 30°C pendant 2 jours.

Résultats

Autour du disque les levures arrivent à pousser normalement grâce à l'adénine ajoutée sur le filtre. Autour de cette zone, il y a un cercle de levure rouge. Ici, la concentration de l'adénine est encore assez élevée pour permettre la croissance des cellules, mais l'adénine présente est rapidement épuisée et les cellules enclenchent la voie de synthèse de l'adénine. Comme nous avons utilisé une souche déficiente pour le gène *ade2*, les cellules accumulent le pigment rouge. En dehors de cette zone il n'y a pas de croissance des cellules en raison de l'absence d'adénine. Dans la partie couverte par l'agar superposé, il n'y a pas d'accumulation du pigment rouge. Ceci est dû à l'absence de la respiration dans des conditions d'anaérobies. Il s'avère que la respiration est nécessaire à la synthèse du pigment rouge par un mécanisme non déterminé.



Matériel

- Souche de levure *ade2* (CW04)
- 2 boîtes SD sans adénine
- Solution stock d'adénine (4g/l)
- Filtre rond
- P200 et pointes jaunes
- Pipettes pasteur pour étalement

Non fourni:

- Spatule ou scalpel
- Pincette
- Etuve 30°C