



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Identification et caractérisation de mutants de la levure *saccharomyces cerevisiae* thermosensibles pour la croissance

Zeippen, Benoît

Award date:
1985

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1985



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

IDENTIFICATION ET CARACTERISATION
DE MUTANTS DE LA LEVURE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE
THERMOSENSIBLES POUR LA CROISSANCE

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

Benoît ZEIPPEN

Ce mémoire n'a pu être réalisé qu'avec le concours d'un certain nombre de personnes auxquelles j'exprime ma reconnaissance.

Je tiens toutefois à remercier particulièrement

le Professeur J. Delcour qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a conseillé tout au long de ce travail,

le Docteur J. Van den Haute qui a guidé mes pas au jour le jour,

tous les membres du laboratoire
Mesdames M. Dewez, R.M. Wilmet et M. Libion,
Mesdemoiselles G. Renauld et A. Van Roosbroeck,
ainsi que Monsieur P. Verdonck, pour leur aide
et la bonne entente qu'ils ont créée,

Madame S. Wattiaux-De Coninck, Messieurs F. Hilger,
J. Mengeot et J. Van den Haute, qui ont
accepté de lire ce mémoire,

Madame A. Vanrenterghem qui a eu la gentillesse de
dactylographier ce travail,

ma fiancée Bénédicte, enfin, pour sa grande patience
et son soutien tout au long de l'année.

ABBREVIATIONS.

ARN_{hn}: Acide ribonucléique hétéronucléaire.

ARN_m: Acide ribonucléique messenger.

CoQ: Coenzyme Q.

DNA: Acide désoxyribonucléique.

DO: Densité Optique.

EMS: Ethyle méthane sulfonate.

NAD: Nicotinamide adénine dinucléotide.

NG: N-méthyl- N'-nitro-N-nitosoguanidine.

SAdoMet: S-adénosine-L-méthionine.

tRNA: Acide ribonucléique de transfert.

t^S: thermosensible.

W: Watts.

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	PAGE
1. -La relation structure - fonction: une clé pour la compréhension des mécanismes de la vie.	I
2. -Comment résoudre le problème.	3
2.1. Approche biochimique	4
2.2. Approche génétique	5
3. -L' organisme utilisé: <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .	7
3.1. Exigences dues à l' approche génétique	7
3.2. L' organisme utilisé: <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	9
4. -L' approche suivie: une approche génétique classique.	10
4.1. Qu' est-ce qu' une approche génétique classique	10
5. -Gènes essentiels et mutants conditionnels.	11
5.1. Le problème posé par les gènes essentiels	11
5.2. La solution: les mutations conditionnelles	11
5.2.1. Notion de mutation conditionnelle	11
5.2.2. Mutants thermosensibles	12
5.2.3. Mutants cryosensibles	13
5.2.4. Mutants osmosensibles	14
6. -La banque de mutants	14
6.1. Induction de mutants	14
6.2. Isolement des mutants	15
6.2.1. Choix des températures permissives et restrictives	15
6.2.2. Isolement des mutants	15
6.3. Gènes et thermosensibilité	16
7. -Criblage de la banque	17
7.1. Principe du criblage	17
7.2. Le métabolisme énergétique	18
7.2.1. Energie: une nécessité pour l'organisme	18
7.2.2. La glycolyse: le tronc central du métabolisme énergétique	19

7.2.3. La fermentation	20
7.2.4. La respiration	20
7.2.5. Autres rôles du métabolisme énergétiques	23
7.2.6. La gluconéogenèse	23
7.2.7. Effets particuliers du glucose	25
7.3. Le cycle de division cellulaire	25
7.3.1. La nécessité de sauvegarder l'espèce	25
7.3.2. Description du cycle de division de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	26
7.3.3. La coordination des événements: les modèles possibles	28
7.3.4. Les mutants cdc	29
7.3.5. La séquence des événements répond à un modèle mixte	29

MATERIEL ET METHODES

1. -Souche utilisée	32
2. -Milieux de culture utilisés	32
2.1. Préparation des milieux	32
2.2. Composition des milieux	32
2.2.1. Milieu YPD	32
2.2.2. Milieu YPM	32
2.2.3. Milieu YPGL	33
2.2.4. Milieu YPGE	33
2.2.5. Milieu YPG	33
3. culture en milieu liquide	33
-Courbe de croissance	33
4. -Culture en milieu solide	34
-Techniques de répliation utilisées	34
5. -Protocole de la mutagenèse	35
6. -Conservation de la banque	37
6.1. A long terme	38
6.2. A court terme	38

7. -Criblage de la banque	39
7.1. Mutants de fermentation	39
7.2. Mutants de préhension du glucose	39
7.3. Mutants de respiration	40
7.4. Mutants du cycle de division cellulaire	40

RESULTATS ET DISCUSSION

1. -Réveil de la banque	42
2. -Courbe de croissance	43
2.1. Principe de la courbe de croissance	43
2.2. Résultats et interprétation	45
3. -Variations de thermosensibilité	45
4. -Tests de thermosensibilité	49
5. -Identification des mutants de fermentation	51
5.1. Principe de sauvetage des mutants	51
5.2. Mutants identifiables	53
5.3. Résultats obtenus	54
6. -Identification des mutants cdc	56
6.1. Phénotypes caractéristiques et techniques d'identification	57
6.2. Technique d'identification utilisée	60
6.3. Mise au point de la sonication	62
6.4. Résultats obtenus	63
7.- Identification des mutants de respiration	81
7.1. Principe	81
7.2. Résultats obtenus	81

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. -Considérations sur le criblage d' une banque de mutants thermosensibles	85
2. -Mutants identifiés	85

3.- Perspectives d'utilisation de la banque dans le cas particulier de la méthylation de la coiffe des ARNm eucaryotiques	86
ANNEXE 1 -Tableau synthétique des résultats obtenus	94
ANNEXE 2 -Liste des symboles utilisés pour le métabolisme énergétique	103
BIBLIOGRAPHIE	105

INTRODUCTION

1. - LA RELATION STRUCTURE-FONCTION : UNE CLEF POUR LA COMPREHENSION DES MECANISMES DE LA VIE.

Qu'est-ce que la vie ? D'où vient-elle ? Comment expliquer qu'un assemblage particulier d'atomes de matière inerte puisse donner naissance à des phénomènes aussi extraordinairement mouvants et complexes que l'on appelle la vie ? Ce contraste apparemment si mystérieux entre le monde inerte et le monde vivant est expliqué par ce que l'on appelle le principe d'émergence. Ce principe prédit l'apparition de propriétés nouvelles dans un système en voie de structuration en affirmant qu'une qualité n'appartenant pas aux composants peut apparaître dans le composé.

La structure est donc génératrice de la fonction.

De très nombreux exemples illustrent cette relation stricte existant entre la structure et la fonction.

Ainsi, comment une chaîne d'acides aminés (c'est-à-dire la séquence primaire) d'une protéine ayant un rôle enzymatique peut-elle induire chez celle-ci les possibilités de réaliser un "travail" sur un substrat déterminé et souvent très spécifique ?

Au cours de la biosynthèse de la protéine, les chaînes latérales des acides aminés constitutifs interagissent entre elles, ou avec des molécules d'eau, formant des liaisons non covalentes faibles.

En fonction des types de chaînes latérales en présence et de leur position dans la protéine, une force est ainsi créée qui donne à la protéine sa conformation particulière et une stabilité accrue (1).

Un des facteurs les plus importants gouvernant le repliement de la protéine, est la polarité des chaînes latérales. Ainsi, lors de la biosynthèse de la protéine, les chaînes hydrophobes (non polaires) tendent à se regrouper à l'intérieur de la molécule (pour éviter le contact avec l'environnement aqueux), tandis que les groupements polaires tendent à s'organiser à la périphérie de la molécule (fig. 1).

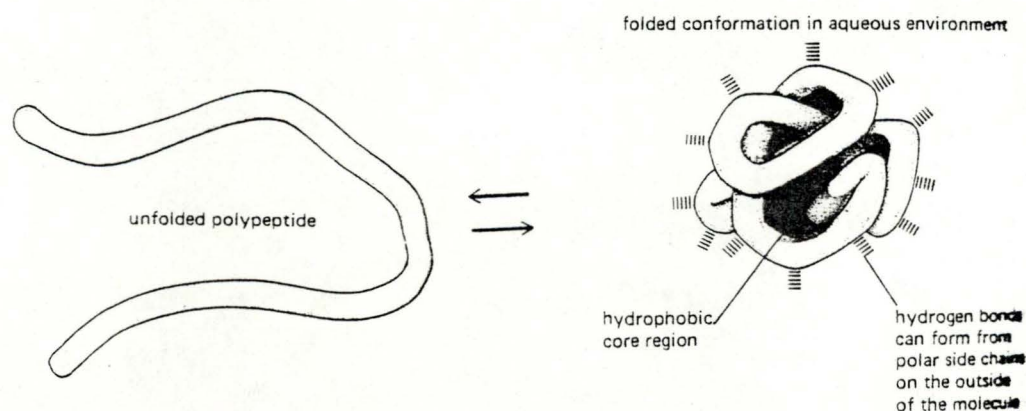


Fig.1: Repliement de la protéine avec organisation des groupes hydrophobes vers l'intérieur et des groupes polaires à la périphérie(2).

Les ponts hydrogène existant entre les chaînes latérales polaires, et même entre les liaisons peptidiques liant les acides aminés entre eux, jouent un rôle fondamental dans le maintien de la structure (fig. 2).

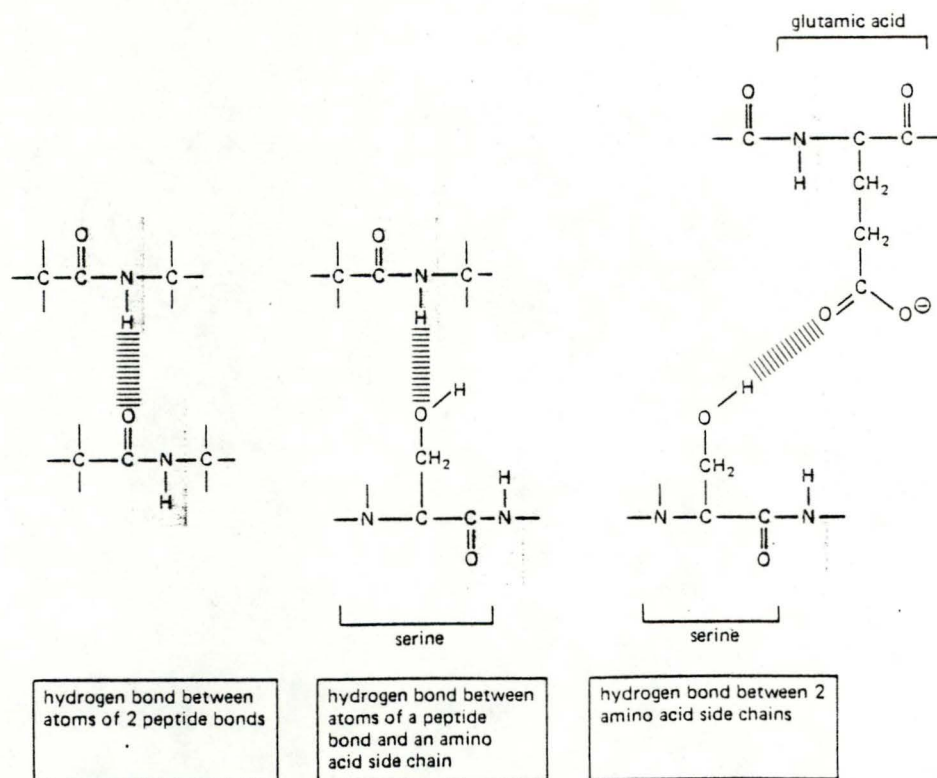


Fig.2: Types de ponts hydrogène existant au sein d'une protéine(2).

C'est ainsi que la protéine acquiert sa configuration propre, qui conditionne la fonction, la spécificité et la régulation.

Cela est tellement vrai que, dans certains cas, tout ce bel édifice fonctionnel peut s'écrouler si un seul des acides aminés (un acide aminé occupant une place majeure dans la protéine) est remplacé par un autre n'ayant plus les caractéristiques requises.

Ainsi, une maladie humaine telle que l'anémie falciforme, caractérisée par la présence de globules rouges en forme de faucille, est une maladie génétique due au changement d'un seul acide aminé dans la séquence primaire de l'hémoglobine. La structure tridimensionnelle de l'hémoglobine est ainsi changée, ce qui diminue l'affinité pour l'oxygène (d'où l'anémie) et explique la forme anormale des globules rouges (3,4,5).

Il a également été démontré en 1982, que le changement d'un

seul nucléotide (une mutation ponctuelle), dans un gène humain normal de 5.000 nucléotides de long, convertit ce dernier en oncogène (c'est-à-dire un gène susceptible de provoquer une tumeur maligne). Cette mutation ponctuelle se traduit par le remplacement d'un acide aminé par un autre dans la protéine correspondante, ce qui lui confère des propriétés nouvelles modifiant considérablement le métabolisme cellulaire (6).

Toutes les mutations ne sont cependant pas aussi catastrophiques : de faibles modifications de la structure peuvent au contraire améliorer la fonction qui subit dès lors une pression de sélection positive.

L'évolution d'une molécule s'explique de cette façon par "essais et erreurs" (7).

Mais les protéines ne constituent pas le seul exemple illustrant la relation structure-fonction.

Ainsi, les ARN de transfert dont la structure primaire est une séquence de nucléotides adoptent une configuration spatiale en boomerang, suite à des ponts hydrogène entre les nucléotides.

Cette forme particulière s'adapte particulièrement bien à l'aminocyl-tRNA synthétase, l'enzyme qui va réaliser le couplage tRNA-acide aminé (8).

Cependant, la nature intime du mécanisme moléculaire par lequel la structure conditionne la fonction, est lui-même trop rarement compris dans le détail. La tâche de la biologie moléculaire est donc d'identifier les effecteurs des fonctions, de préciser la nature de leurs attributs structuraux spécifiques, et de découvrir enfin les mécanismes souvent dynamiques qui permettent les interactions intra- et intermoléculaires présidant à l'exécution de leur rôle. L'acquisition de connaissances dans ce domaine est un préalable à la compréhension des processus moléculaires du vivant, et à fortiori, à tout essai d'interventions directes dans ceux-ci.

2. - COMMENT RESOUDRE LE PROBLEME ?

Pour tenter d'établir une relation entre une structure moléculaire et une fonction, deux types d'approche s'offrent au chercheur.

2.1. -Approche biochimique.

Sa principale caractéristique est de se réaliser in vitro.

Quel en est le principe ? La structure à étudier (une enzyme par exemple) est extraite de l'organisme utilisé, purifiée, puis soumise à un test in vitro (une mesure de l'activité enzymatique, par exemple).

Ce test permet de caractériser la fonction dans les conditions expérimentales définies. On pourra également étudier la variation de fonction par rapport à un changement de structure imposé artificiellement.

Le gros avantage de cette approche biochimique est de permettre une simplification du problème, souvent très complexe à traiter in vivo, par l'utilisation de conditions connues et contrôlées.

Cette simplification constitue cependant le point vulnérable de l'approche.

En effet, la structure étudiée ne fonctionne pas ici dans son environnement biologique naturel, mais dans un milieu artificiel considérablement simplifié, qui ne garantit dès lors pas le bien fondé de l'extrapolation à la situation in vivo. La fonction observée dans cet environnement restreint ne constitue pas nécessairement la fonction vérifiable au sein de la cellule.

L'étude des polymérases de Escherichia coli (enzymes de transcription de l'ADN), constitue un exemple classique illustrant ce problème.

En 1958, Kornberg et al (9) ont pu mettre en évidence, in vitro, une activité de polymérisation du DNA à partir de précurseurs et d'un extrait purifié de Escherichia coli. Cette approche a donc permis de purifier une DNA polymérase (dite de Kornberg ou Pol I), dont on pouvait raisonnablement penser qu'elle constituait l'enzyme de répllication in vivo. Par la suite, ce n'est que la découverte de mutants déficients pour cette enzyme et à croissance normale d'une part (10), et celle de mutants déficients pour une autre enzyme biochimiquement différente et incapables de croître d'autre part, qui a permis d'identifier et d'attribuer avec exactitude les rôles in vivo de ces deux enzymes distinctes. La Pol I de Kornberg avait en fait comme fonction biologique la réparation du DNA (11).

Une étude de la fonction in vivo est donc souhaitable, car elle complète l'approche biochimique en déterminant avec sûreté le rôle biologique.

Une autre difficulté, de nature plus technique, moins importante, existe dans l'approche biochimique : la purification de la structure, souhaitable pour éviter des effets dus à des contaminants, n'est pas toujours aisée et doit répondre à des nécessités contradictoires. Le traitement doit en effet être suffisamment énergique pour arriver à une purification la plus parfaite possible, mais doit à la fois être assez doux pour limiter les dangers d'altérer la structure étudiée.

D'autres effets secondaires dus à la structure elle-même peuvent exister et s'avérer très gênants pour l'interprétation. Soit par exemple une protéine ribosomique. Elle peut assurer au sein du ribosome deux fonctions importantes distinctes : un rôle dans la traduction des protéines et un rôle de coopération lors de l'assemblage du ribosome (une fois mise en place, la protéine facilite l'assemblage des éléments restants) (12).

Pour étudier le rôle traductionnel de cette protéine, un test biochimique de traduction acellulaire peut être réalisé avec des ribosomes normaux d'une part, et des ribosomes déficients pour cette protéine d'autre part (l'assemblage du ribosome pouvant se réaliser in vitro - (12, 13) -). Mais les différences de traduction obtenues peuvent être dues au défaut du rôle traductionnel (c'est bien ce qu'on espère), mais aussi au défaut de conformation du ribosome, provoqué par l'absence de l'effet coopératif de la protéine.

De tels effets secondaires peuvent être difficiles à distinguer de l'effet primaire recherché.

Quoi qu'il en soit, l'approche biochimique reste une technique de base très puissante, d'autant plus qu'elle sera complétée par le second type d'approche, tournée vers la fonction in vivo.

2.2. -Approche génétique.

Cette seconde approche vise donc l'étude des fonctions in vivo et a pour but de déterminer les mécanismes précis par lesquels elles sont assurées.

Sa combinaison avec l'approche biochimique permet une étude détaillée et opérationnelle d'une fonction.

L'étude génétique consiste en la comparaison d'un organisme mutant pour la fonction visée, avec l'organisme isogénique sauvage (c'est-à-dire possédant un patrimoine génétique identique, mise à part la mutation en question).

Suite à cette mutation, l'organisme mutant possède un trait phénotypique qui le caractérise et permet au chercheur de le reconnaître parmi les autres mutants. Ainsi par exemple, un mutant pour une enzyme nécessaire à la synthèse d'un acide aminé, présentera comme phénotype particulier sa non viabilité dans un milieu ne contenant pas cet acide aminé : on dira que le mutant est auxotrophe pour cet acide aminé.

Ces traits phénotypiques sont variables et plus ou moins faciles à repérer : cela va du trait morphologique visible par simple observation au microscope, jusqu'au trait biochimique ou physiologique nécessitant des dosages enzymatiques, par exemple (14).

Un trait phénotypique n'est cependant pas nécessairement lié à un seul type de mutation : un phénotype d'auxotrophie pour un acide aminé caractérisera l'ensemble des mutants pour une étape quelconque de la synthèse de cet acide aminé. Un trait phénotypique limite donc souvent une classe de mutants.

La recherche du trait phénotypique constitue l'identification d'un mutant.

La recherche du site précis de mutation (quel est le gène touché ?) constitue la caractérisation du mutant.

L'approche génétique permet de couvrir un champ d'investigations très vaste, puisqu'en principe chaque gène de l'organisme est susceptible de subir une mutation (15).

D'autre part, sa spécificité est très grande. En effet, une mutation unique affecte directement, en général, la synthèse ou la fonction d'une seule protéine ou d'un seul RNA. Le disfonctionnement primaire introduit par la mutation est par conséquent limité à un seul processus cellulaire (15).

Ces deux caractéristiques donnent à cette approche le pouvoir de définir les rôles biologiques précis joués par des molécules ou des structures particulières.

Des conséquences d'une carence spécifique d'une fonction quelconque sur la biochimie, la physiologie ou le développement cellulaire pourront être observées (15).

C'est ainsi que l'approche génétique a permis et permet d'élucider de nombreux pathways métaboliques et de comprendre les interactions possibles entre ceux-ci, soit par l'intermédiaire de substrats ou de produits communs, soit par des effets de régulation croisée (16).

Dans un organisme, la grande complexité des voies métaboliques, et la nécessité de s'adapter le mieux possible aux conditions changeantes de l'environnement, nécessitent la mise en place de mécanismes de régulation efficaces, visant à moduler l'activité métabolique en fonction des circonstances. De tels mécanismes sont difficiles à étudier *in vitro*, car ils dépendent généralement d'un milieu cellulaire complexe.

L'utilisation de mutants a permis l'étude de tels mécanismes régulateurs (16).

La principale faiblesse de l'approche génétique vient certainement de son côté aléatoire. En effet, l'approche génétique habituelle se base sur une mutagenèse aveugle, c'est-à-dire que la mutation peut toucher n'importe quelle partie du génome. On n'a donc jamais la certitude d'obtenir le mutant désiré, mais seulement une certaine probabilité.

Cependant, les techniques nouvelles du génie génétique permettent à présent de réaliser une mutation sur commande dans un gène choisi. On crée en quelque sorte le mutant de toute pièce, ce qui élimine le côté aléatoire, mais nécessite une connaissance du gène, et la possibilité de le manipuler (17).

Par rapport à l'approche génétique "classique" (mutagenèse → mutant → gène), cette approche constitue une sorte de génétique "à l'envers" (gène → mutant).

Outre cet aspect aléatoire, l'approche génétique présente l'inconvénient de n'être réalisable que sur des organismes possédant certaines caractéristiques, ce qui limite les possibilités d'utilisation.

L'étude de mutants constituant une des deux phases de l'étude de la relation structure-fonction, il est donc intéressant de réaliser une "banque" de mutants qui pourront servir à diverses études.

C'est dans ce cadre de travail que se situe ce mémoire, qui constitue en fait une étape de la réalisation de cette banque.

3. - L'ORGANISME UTILISE : SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

3.1. - Exigences dues à l'approche génétique.

Certaines conditions sont nécessaires pour que l'approche génétique soit réalisable.

Cycle de vie de *Saccharomyces cerevisiae*

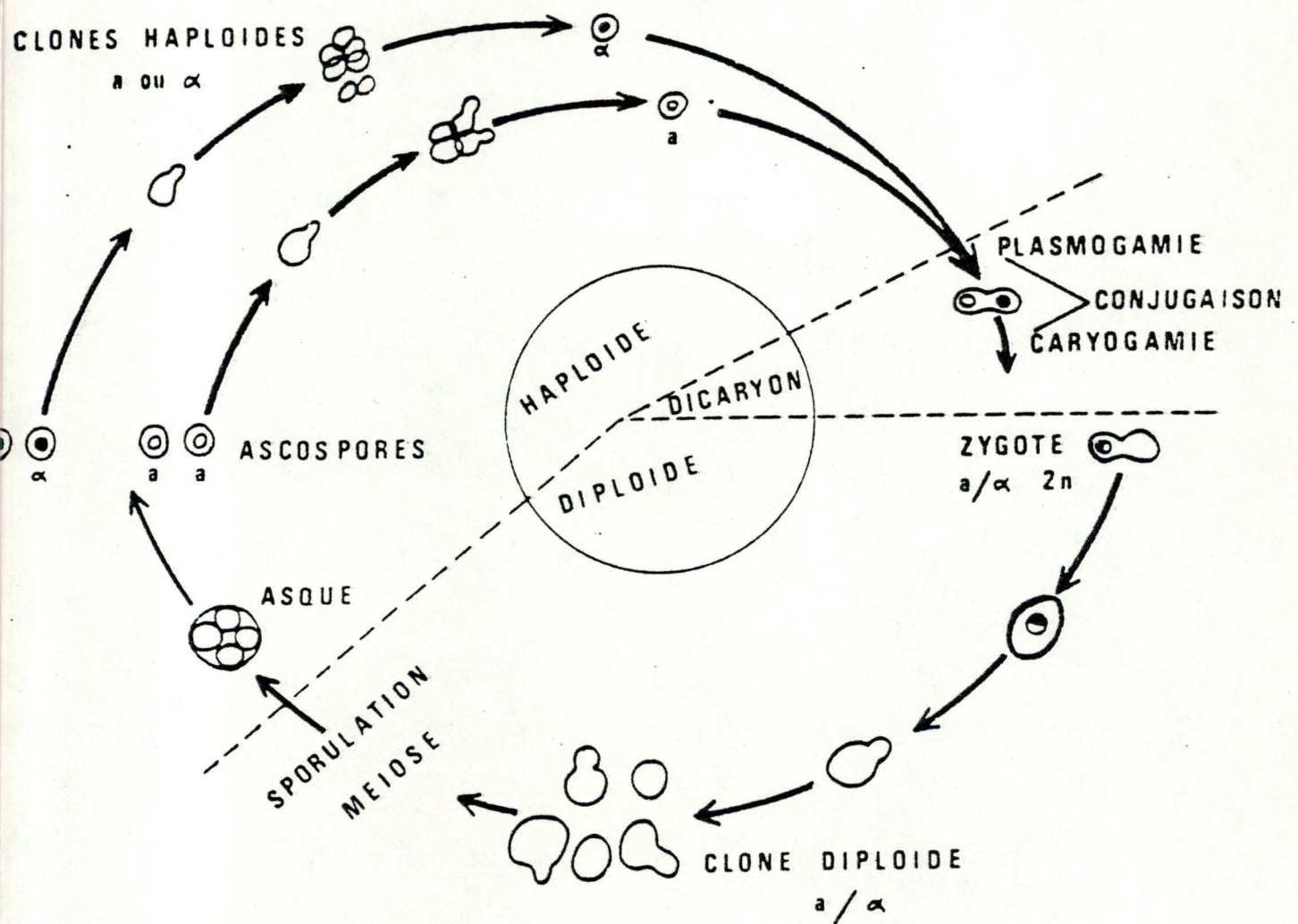


Fig. 3: cycle de vie de *Saccharomyces cerevisiae*.

- La plupart des mutations étant récessives, l'organisme doit nécessairement passer par une phase haploïde, au moins pendant une partie de son cycle de vie.
- Il doit s'agir d'un microorganisme, à cycle de division relativement court. Il est nécessaire en effet, à partir d'une seule cellule ayant subi une mutation, d'obtenir relativement rapidement une lignée de cellules toutes identiques génétiquement (un clone). Les techniques de microbiologie mises au point sur des bactéries telles que Escherichia coli sont aussi utilisables (répliques sur velours, cultures en milieux solides ou liquides...).
- Etant donné le côté aléatoire de l'approche génétique, il est souhaitable de posséder un organisme génétiquement le plus simple possible : plus le nombre de gènes sera petit, plus la probabilité d'obtenir un mutant déterminé sera élevée.

3.2. -L'organisme : Saccharomyces cerevisiae.

La levure de brasserie, ou de boulangerie, Saccharomyces cerevisiae, est un champignon unicellulaire Eumycète Endomycétale de la famille des Saccharomycétacées.

De par ses caractères, cet organisme constitue un matériel de choix pour la génétique (14, 18, 19)

- c'est un eucaryote simple
- c'est un organisme unicellulaire non différencié
- son temps de génération est relativement court (2 à 4 heures)
- l'existence de phases haploïdes et diploïdes stables dans son cycle cellulaire facilite l'étude génétique (fig. 3). L'existence d'un mode de reproduction sexuée par conjugaison permet l'étude des disjonctions des caractères associés dans le zygote
- sa carte génétique est de mieux en mieux connue (20)
- la levure se prête très bien à l'induction de mutations aussi bien par irradiation UV ou X que par traitement par des agents chimiques divers
- son utilisation en laboratoire est pratique
 - . organisme de petite taille et non mobile
 - . croissance rapide sur milieu adéquat en conditions d'aérobiose, et donc non limitation du nombre d'individus observés
 - . cultures aisées en milieux gélosés, complexes et définis
 - . repiquage aisé en milieux stériles divers; réplification facile sur velours stérile

- Saccharomyces cerevisiae présente la particularité étonnante pour un eucaryote de posséder un plasmide nucléaire appelé le plasmide 2 μ (brin d'ADN circulaire extrachromosomique) permettant la réalisation de génie génétique sur eucaryote (17, 19).

4. - L'APPROCHE SUIVIE : UNE APPROCHE GENETIQUE CLASSIQUE.

4.1. - Qu'est-ce qu'une approche génétique classique ?

Nous trouvant en possession d'une souche de Saccharomyces cerevisiae, comment obtenir les mutants désirés ?

Nous avons à présent que, dans le cadre d'une fonction particulière dont le gène est connu, il est possible de réaliser une mutagenèse dirigée, sur mesure. C'est ainsi que l'étude de la fonction assurée par l'actine chez Saccharomyces cerevisiae a été réalisée grâce à une telle méthode (21, 22).

Mais l'approche la plus utilisée jusqu'à présent est l'approche génétique classique, basée sur une mutagenèse aveugle, et qui permet d'obtenir un nombre voulu de mutants très divers. C'est ce type d'approche que nous allons suivre.

Les mutations apparaissent spontanément dans la nature, mais pour obtenir rapidement un nombre relativement important de mutants, il est préférable d'augmenter la fréquence de ces mutations par l'utilisation d'un agent mutagène (radiations UV ou X, agents chimiques).

Cette mutagenèse permettra de récupérer une quantité plus ou moins élevée de mutants qui constituera ce que l'on appelle une "banque de mutants".

Ces mutants doivent ensuite être identifiés, c'est-à-dire soumis à divers examens morphologiques, tests de croissance sur certains milieux... (14, 15).

Si, dans le cadre d'une étude précise, un mutant ou une classe de mutants s'avère intéressant, il est souhaitable de caractériser ces mutants, de manière à connaître le site précis de mutation (18).

Le mutant intéressant est alors comparé à la souche isogénique sauvage (la souche de base ayant servi à la mutagenèse), ce qui permet, par des études biochimiques, morphologiques ou physiologiques, de déterminer les effets de la mutation, toutes autres conditions étant égales.

Diverses fonctions peuvent ainsi être étudiées, mais un problème se pose lorsqu'il s'agit de fonctions essentielles.

5. - GENES ESSENTIELS ET MUTANTS CONDITIONNELS.

5.1. -Le problème posé par les gènes essentiels.

Un gène essentiel est un gène nécessaire pour la croissance végétative, c'est-à-dire un gène qui code pour une fonction essentielle pour la survie et la multiplication de l'organisme.

Cette notion est toutefois relative car indissociable du contexte dans lequel se trouve l'organisme. Ainsi, un gène intervenant dans la synthèse d'un acide aminé se révélera essentiel dans un milieu ne contenant pas cet acide aminé. Par contre, si le milieu contient cet acide aminé, le gène devient non essentiel car l'organisme peut puiser l'acide aminé dans le milieu et ne doit donc plus le synthétiser.

Un gène essentiel se définit donc par rapport au milieu utilisé.

Pour notre part, nous utiliserons un milieu riche, c'est-à-dire contenant les éléments essentiels à la cellule tels que les acides aminés par exemple. La source d'énergie est le glucose (milieu YPD).

Les gènes non essentiels, quant à eux, constituent le reste du génome et assurent des fonctions telles que la reproduction sexuée, la sporulation, diverses synthèses ...

Pourquoi cette distinction : parce qu'une mutation aura des effets très différents sur la cellule selon qu'elle touche un gène essentiel ou non.

En effet, si une mutation touchant un gène non essentiel ne pose pas de problème particulier, une mutation touchant un gène essentiel, en empêchant la fonction de se réaliser, va provoquer la mort du mutant, interdisant ainsi l'étude de celui-ci (15, 23).

Ce problème important de létalité semble donc restreindre l'étude génétique aux gènes et aux fonctions non essentielles.

5.2. -La solution : les mutations conditionnelles.

5.2.1.-Notion de mutation conditionnelle.

Ce problème important, diminuant considérablement la puissance de l'approche génétique, a trouvé sa solution en 1948 lorsque Horowitz découvrit des mutants dits thermosensibles, qui présentent le phénotype mutant à certaines températures et pas à d'autres (24, 25, 26).

De cette découverte a découlé la notion de mutation conditionnelle.

Par mutant conditionnel, on entend un organisme présentant le type sauvage sous certaines conditions de l'environnement appelées conditions permissives (température, pression osmotique par exemple), mais présentant le phénotype mutant caractéristique sous des conditions différentes appelées conditions non permissives ou restrictives (température différente, pression osmotique différente par exemple) (15).

Si le gène muté est essentiel, le mutant conditionnel meurt en conditions restrictives, alors qu'au contraire, il survit en conditions permissives : on parle de mutation létale conditionnelle.

Ces mutants perdent leur viabilité (c'est-à-dire leur capacité de reprendre leur vie végétative après retour de conditions restrictives à des conditions permissives) après des temps d'exposition variables aux conditions restrictives (15).

Ces mutants présentent évidemment un grand intérêt : un mutant pour un gène essentiel peut ainsi être maintenu en vie, multiplié, répliqué, avec la possibilité de lui faire exprimer sa mutation à l'instant voulu, simplement en changeant les conditions de l'environnement.

D'après le type de conditions de l'environnement qui influence l'expression de la mutation, on distingue plusieurs types de mutants.

5.2.2.-Les mutants thermosensibles (mutants t^s).

Ce sont de loin les plus utilisés jusqu'à présent. Les conditions permissives et restrictives sont respectivement constituées par des températures relativement basses et relativement hautes, choisies dans la fourchette des températures permettant la croissance de l'organisme sauvage.

Si ces mutations thermosensibles provoquent des effets importants de la température, elles ne permettent cependant pas nécessairement à l'organisme d'élargir sa gamme normale de températures viables (15).

Quelle est la base moléculaire d'un tel phénomène ? Comment expliquer de tels effets aussi drastiques de la température ?

Dans la majeure partie des cas, les mutations qui donnent lieu à la thermosensibilité sont des mutations conduisant à la substitution d'un acide aminé par un autre dans la structure primaire de la protéine (15). Or, nous savons que la structure de la protéine dépend fortement des interactions entre groupements latéraux des acides aminés constitutifs, notamment au point de vue polarité (voir 1). Le nouvel acide aminé peut bien sûr posséder des groupes latéraux n'ayant pas les mêmes caractéristiques que celles de l'acide aminé originel. Il s'ensuit, en fonction du rôle

plus ou moins important joué par l'acide aminé originel dans le maintien de la structure, et en fonction de l'importance de la différence entre les groupements latéraux des deux acides aminés, une déstabilisation de la protéine qui peut aller jusqu'à la destruction de la structure, et par conséquent de la fonction.

Si une mutation produit une déstabilisation partielle de la structure, on observera le phénomène de thermosensibilité (15).

En effet, si la température ambiante reste assez basse, la protéine mutée pourra maintenir sa structure tridimensionnelle et donc sa fonction. Par contre, une élévation de température, en provoquant une augmentation de l'énergie cinétique au sein de la molécule, induit une modification plus ou moins importante de la configuration, avec perte de la fonction et expression du phénotype mutant (15).

Des mutations thermosensibles peuvent en outre toucher non plus des protéines, mais des RNA : il y a alors substitution d'un nucléotide par un autre, qui produit une déstabilisation du RNA.

Au vu du mécanisme moléculaire, il apparaît que ce phénomène n'est pas un phénomène "tout ou rien", mais plutôt une gradation dans la déstabilisation de la structure. La fonction affectée n'est d'ailleurs pas tout à fait normale à température permissive, ni tout à fait absente à température restrictive, dans beaucoup de cas.

5.2.3.-Les mutants cryosensibles.

Au contraire des mutants thermosensibles, ces mutants expriment leur mutation à des températures relativement basses et ne l'expriment pas à des températures relativement hautes ou moyennes de la gamme de survie.

Des mutants cryosensibles ont été isolés à plusieurs reprises chez Saccharomyces cerevisiae (27, 28, 29, 30), mais sont beaucoup moins utilisés que les thermosensibles.

Quel est le mécanisme moléculaire de la cryosensibilité ?

Nous savons que les forces hydrophobes sont importantes pour maintenir une protéine correctement repliée. Or, de telles forces diminuent si la température décroît. Si une mutation induit une substitution d'un acide aminé se traduisant par une déstabilisation de la structure (comme pour les t^s), il peut arriver que des basses températures provoquent la destruction de la structure, d'où cryosensibilité.

Certains mutants peuvent d'ailleurs être à la fois cryosensibles et thermosensibles : ils survivent à des températures

moyennes mais l'abaissement ou l'élévation de la température provoque leur mort (31).

Il semblerait toutefois que certains gènes soient plus facilement touchés par des mutations cryosensibles que par des mutations thermosensibles.

L'étude des mutants cryosensibles pourrait donc révéler des gènes restés cachés par l'étude des thermosensibles, d'où l'intérêt de ces mutants (32).

5.2.4.-Les mutants osmosensibles.

La mutation est exprimée dans un milieu normal, alors qu'on observe le type sauvage dans un milieu dont l'osmolarité est supérieure à la normale. Ces mutants sont relativement fréquents chez Saccharomyces cerevisiae (33, 34, 35).

Cette osmosensibilité s'explique dans certains cas par une défection dans la synthèse d'un composant de la membrane ou de la paroi qui entoure la levure, ce qui fragilise l'organisme et provoque une perte de matériel cytoplasmique ou même la lyse, en absence d'une pression osmotique élevée dans le milieu (35).

Mais dans la plupart des cas, la mutation provoque une déstabilisation de la protéine entraînant une perte de fonction.

L'augmentation de la pression osmotique provoque une plasmolyse cellulaire : dans ces conditions, la protéine est confortée dans sa conformation active (33).

Ce mécanisme explique que de nombreux mutants t^S sont également osmosensibles : à haute température et à pression osmotique élevée, l'effet déstabilisateur de la température est compensé par l'effet stabilisateur de l'osmolarité du milieu.

Il semble que les mutations osmosensibles soient plus fréquentes que les mutations t^S (34, 36). Il serait dès lors possible que certains gènes ne puissent donner lieu à la thermosensibilité, alors qu'ils pourraient donner lieu à l'osmosensibilité.

6. - LA BANQUE DE MUTANTS.

6.1. -Induction de mutants.

Bien que des mutants thermosensibles puissent apparaître spontanément, il est souhaitable d'utiliser un agent mutagène

de manière à obtenir assez rapidement un nombre suffisant de mutants.

Puisque la thermosensibilité résulte d'une déstabilisation partielle de la structure, il est nécessaire d'employer un agent mutagène qui provoque des mutations ponctuelles, c'est-à-dire des mutations induisant la substitution d'un acide aminé par un autre dans une protéine, ou d'un nucléotide par un autre dans les ARN (15).

Des agents tels que les radiations UV, le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NG), l'éthyl méthane sulfonate (EMS) ou l'acide nitreux sont généralement utilisés (15).

Les conditions de mutagenèse doivent être étudiées de façon à obtenir une mutation par génome (intensité et durée d'exposition à l'agent mutagène). En effet, la présence de plus d'une mutation par génome rendrait difficile l'identification des mutants et l'interprétation des résultats.

6.2. -Isolement des mutants.

6.2.1.-Choix des températures permissives et restrictives.

La température restrictive doit être la plus élevée possible, de manière à augmenter les chances d'obtenir des mutants t^s pour des gènes dont les produits sont normalement relativement thermostables (15).

Cependant, la souche sauvage doit être le moins possible affectée par cette haute température, de manière à ne pas introduire d'effets secondaires dangereux à interpréter lors de la comparaison sauvage-mutant.

Un compromis doit donc être trouvé : il semble qu'une température de 36°C soit raisonnable pour des mutants de croissance (15, 36).

La température permissive doit être suffisamment élevée pour que le taux de croissance ne soit pas trop diminué. Une température de 23°C est généralement utilisée (15, 36).

6.2.2.-Isolement des mutants.

Après la mutagenèse, de nombreuses cellules sont mortes, mais il reste un certain pourcentage de survivants. Ceux-ci sont repérés en étalant la culture mutagenisée sur boîtes de Petri à 23°C . A partir de chaque cellule survivante va se former une colonie. Chacune des colonies est alors testée pour la thermosensibilité : celles qui poussent à 23°C mais non à 36°C sont retenues comme thermosensibles.

Ceci constitue l'approche classique non sélective d'isolement de mutants t^s .

Certaines méthodes d'isolement sélectif ont été employées qui permettent d'augmenter la fréquence des mutants t^s parmi les survivants.

Le principe en est le suivant : la culture mutagenisée est placée en conditions restrictives (à 36°C) et on y ajoute une substance toxique pour l'organisme - uridine tritiée (37) bromodeoxyuridine (38), nystatine, amphotéricine B (18, 37). Seules les cellules qui continuent leur croissance incorporent ces substances et sont tuées alors que les mutants t^s qui stoppent leur croissance n'incorporent pas et, si le passage à 36°C est suffisamment court, peuvent reprendre leur croissance à 23°C (15).

En ce qui concerne la réalisation de notre banque, un isolement non sélectif a été suivi.

Au cours de la mutagenèse et de l'isolement des mutants, certaines précautions doivent être prises. En effet, juste après la mutagenèse, les cellules sont lavées et mises en culture pour leur permettre d'évacuer l'EMS complètement. Il faut prendre garde à ce que ce temps de culture soit assez court pour ne pas permettre aux cellules de se diviser complètement.

En effet, si les cellules se divisent, on obtiendra, lors de l'isolement, des colonies venant de cellules soeurs : ces colonies seront donc semblables.

Il faut s'assurer que ceci ne peut pas arriver, sinon, parmi les mutants t^s sélectionnés, nous aurons plusieurs colonies identiques.

Nous verrons donc (voir Matériel et Méthodes) comment le protocole de réalisation de la banque évite ce problème.

6.3. -Gènes et thermosensibilité.

Tous les gènes essentiels peuvent-ils donner lieu à des mutations thermosensibles ? C'est une question que le chercheur qui désire étudier une fonction essentielle par l'intermédiaire d'un mutant thermosensible doit se poser.

Nous avons vu que certains gènes étaient plus sensibles à des mutations cryosensibles qu'à des mutations thermosensibles. Nous avons vu également que les mutations osmosensibles semblaient toucher plus de gènes que les mutations thermosensibles. Ceci tend à montrer que tous les gènes ne peuvent pas donner lieu à la thermosensibilité ou en tout cas qu'un certain nombre de gènes n'est pas très sensible à ce phénomène (44).

Un autre point important est à considérer. Il est assez clair maintenant qu'un certain nombre de gènes de Saccharomyces cerevisiae codant pour des protéines sont présents en 2 ou 3 copies par génome haploïde (existence d'isoenzymes) (44).

Dans ce cas, la probabilité de trouver un mutant pour tous les isoenzymes peut être considérée comme nulle.

Si au-delà de ces considérations, on suppose qu'un gène particulier peut donner une mutation thermosensible, la question qui se pose dans une approche génétique classique (mutagenèse aveugle) est de savoir quelle est la probabilité d'obtenir ce mutant dans une banque de taille X. Cela revient à peu près à se demander combien de gènes essentiels susceptibles de donner des mutants thermosensibles le génome de Saccharomyces cerevisiae contient. L'estimation du nombre de gènes essentiels est difficile car certains résultats s'opposent.

Ainsi, des études génétiques de différents organismes donnent l'impression que le nombre de gènes essentiels est en général assez peu élevé. Par contre, les études biochimiques montrent un grand nombre de molécules différentes (protéines ou acides nucléiques) chez ces mêmes organismes, ce qui donne l'impression que de très nombreux gènes essentiels sont impliqués (44).

En 1983, Kaback et al ont réalisé une étude originale sur Saccharomyces cerevisiae (44), utilisant une souche haploïde pour le chromosome I et diploïde pour les autres chromosomes. Etant donné la récessivité de nombreuses mutations thermosensibles, la plupart des mutants t^s isolés portaient leur mutation sur le chromosome I.

Ce petit chromosome ($1/50$ du génome total), après caractérisation de 32 mutants t^s , semblait contenir seulement 3 gènes essentiels. Ce nombre très faible est incompatible avec les analyses biochimiques.

Ce paradoxe du nombre de gènes essentiels n'est pas encore résolu, si bien qu'il est difficile à l'heure actuelle d'estimer le nombre de gènes susceptibles de conduire à des mutations thermosensibles.

7. - CRIBLAGE DE LA BANQUE.

7.1. - Principe du criblage.

Nous savons qu'un mutant est identifiable par le trait phénotypique qui le caractérise et qu'on peut regrouper un certain nombre de mutants présentant un trait phénotypique

commun (suite à des mutations touchant le même processus cellulaire), pour former ainsi une classe d'identification.

Le criblage consiste à former des classes d'identification avec les mutants de la banque, obtenant ainsi une première classification.

Le but poursuivi est de mettre au point une technique relativement simple et rapide, réalisable sur un grand nombre de mutants, qui met en évidence un trait phénotypique et permet ainsi de discriminer parmi tous les mutants ceux appartenant à la classe correspondante.

La taille d'une classe dépend évidemment de la complexité du processus cellulaire auquel elle est liée : plus le nombre de gènes impliqués est élevé, plus le nombre de mutants dans la classe sera élevé statistiquement.

Il est intéressant de commencer le criblage de la banque par les classes les plus importantes en taille, de manière à réduire d'autant le travail par la suite.

Il s'agit donc pour nous de découvrir des processus cellulaires essentiels, les plus complexes possibles, donnant lieu à un trait phénotypique permettant la mise au point d'une technique d'identification simple et rapide.

7.2. -Le métabolisme énergétique.

Tout être vivant est un agencement précis de molécules dites organiques.

Ces molécules organiques ont ceci de particulier et de commun qu'elles sont constituées d'un squelette d'atomes de carbone liés entre eux et formant une chaîne plus ou moins longue et plus ou moins ramifiée, sur laquelle viennent se greffer des groupements divers.

Pour fabriquer ces molécules indispensables à sa survie, l'organisme doit disposer de deux choses : les matières premières (c'est-à-dire en grande partie du carbone) et de l'énergie.

7.2.1.-L'énergie : une nécessité pour l'organisme.

Pour maintenir sa structure organisée, tout être vivant a besoin d'énergie. Il puise celle-ci dans son environnement, sous forme d'énergie lumineuse pour certains (plantes, quelques bactéries), sous forme d'énergie chimique pour d'autres (animaux, champignons, bactéries) (39).

Cette énergie chimique contenue dans les liaisons atomiques, ou sous forme de potentiel d'oxydo-réduction (capacité de transférer des électrons), n'est cependant pas directement accessible à l'organisme : la molécule source d'énergie doit subir des transformations au cours desquelles l'énergie sera transférée sur des molécules spécialisées où elle est stockée et disponible pour l'organisme.

Cette mobilisation de l'énergie nécessite donc un processus biochimique : le métabolisme énergétique.

7.2.2.-La glycolyse :le tronc central du métabolisme énergétique.

La glycolyse, première partie du métabolisme énergétique, réalise la dégradation anaérobie du glucose ou d'autres sucres (sources principales d'énergie) en pyruvate (fig 4).

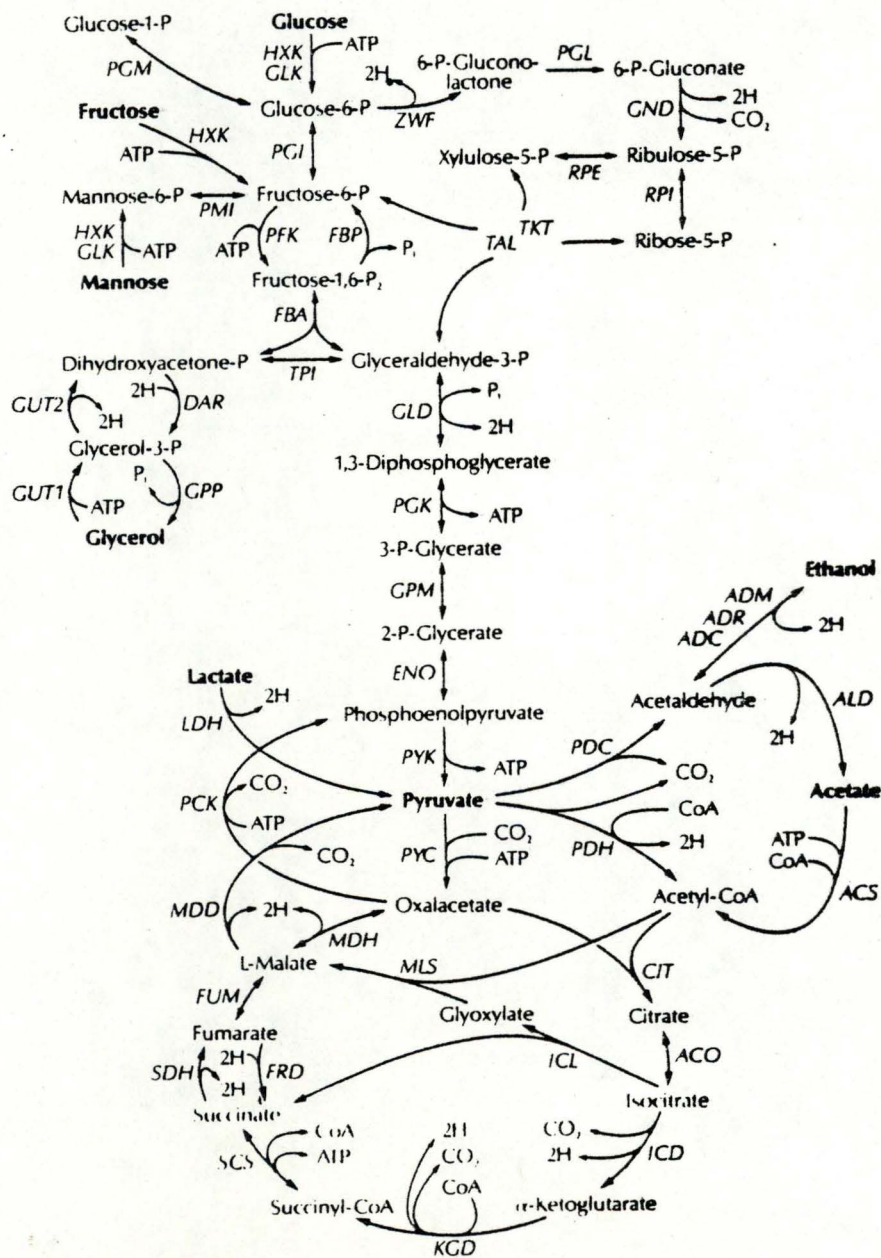


Fig.4 : Métabolisme énergétique de Saccharomyces cerevisiae: fermentation et cycle de Krebs. (58)
Pour les symboles utilisés, voir annexe 2.

La mobilisation de l'énergie se fait lors de deux étapes seulement, les autres étapes constituant des étapes de préparation à celles-ci (40).

Au cours de la première, la glyceraldéhyde - 3P subit une oxydation (une perte d'électrons), catalysée par la GLD : 2 électrons ainsi que $2H^+$ sont cédés à une molécule de NAD. Cette oxydation libère de l'énergie qui permet la formation, à partir d'un phosphate inorganique, d'une liaison phosphate riche en énergie. Ce phosphate sera transféré à une molécule d'ADP lors de l'étape suivante, pour former l'ATP, molécule dans laquelle l'énergie est stockée sous forme de liaison phosphate.

La seconde étape mobilisatrice d'énergie suit à peu près le même processus : le 2 P glycerate subit une oxydo-réduction interne cette fois (l'échange d'électrons se fait entre deux atomes de carbone de la molécule elle-même, et ne nécessite pas de NAD), dont l'énergie sert à former une liaison phosphate riche en énergie, avec stockage sous forme d'ATP à l'étape suivante.

La glycolyse conduit donc à la formation de 2 ATP et de 1 NADH par molécule de triose, soit 4 ATP et 2 NADH par molécule d'hexose.

La glycolyse terminée, le métabolisme énergétique de Saccharomyces cerevisiae peut suivre deux voies différentes, en fonction des conditions du milieu.

7.2.3.-La fermentation.

Au cours de cette première voie, le pyruvate obtenu suite à la glycolyse subit une décarboxylation catalysée par la PDC qui mène à la formation d'acétaldéhyde. Celui-ci subit une réduction catalysée par l'ADH (3 isoenzymes : ADC, ADR et ADM) menant à la formation d'éthanol, produit final de la fermentation. Les électrons et les H^+ cédés à l'acétaldéhyde proviennent d'une molécule de NADH. Cette étape permet ainsi de régénérer la molécule de NAD utilisée dans la glycolyse. Cette régénération, indispensable pour éviter l'épuisement de NAD, constitue en fait le seul but de ces deux dernières étapes.

Le bilan énergétique global de la fermentation est donc de 2ATP formés par molécule d'hexose consommée (40).

7.2.4.-La respiration.

Au cours de la deuxième voie métabolique possible, le pyruvate rentre dans un cycle de réactions (appelé cycle de Krebs, représenté sur la fig. 4), au cours duquel il se produit une série d'oxydations successives (en présence d'oxygène) menant finalement à l'oxydation totale de la molécule en CO_2 . Les électrons sont cédés à des molécules spécialisées comme la NAD ou le Co Q.

ATP à l'étape α cétogluc.

L'énergie réductrice ainsi stockée peut bien sûr être utilisée comme telle par l'organisme, mais elle peut également être transformée en énergie de liaison (formation d'ATP) au cours de transferts successifs des électrons entre divers transporteurs présents dans la membrane mitochondriale. Lors de certains transferts, il se produit une chute d'énergie de l'électron suffisante pour permettre la synthèse d'une molécule d'ATP. Cet ensemble, oxydation totale et transferts d'électrons, constitue la respiration (fig. 5) (41).

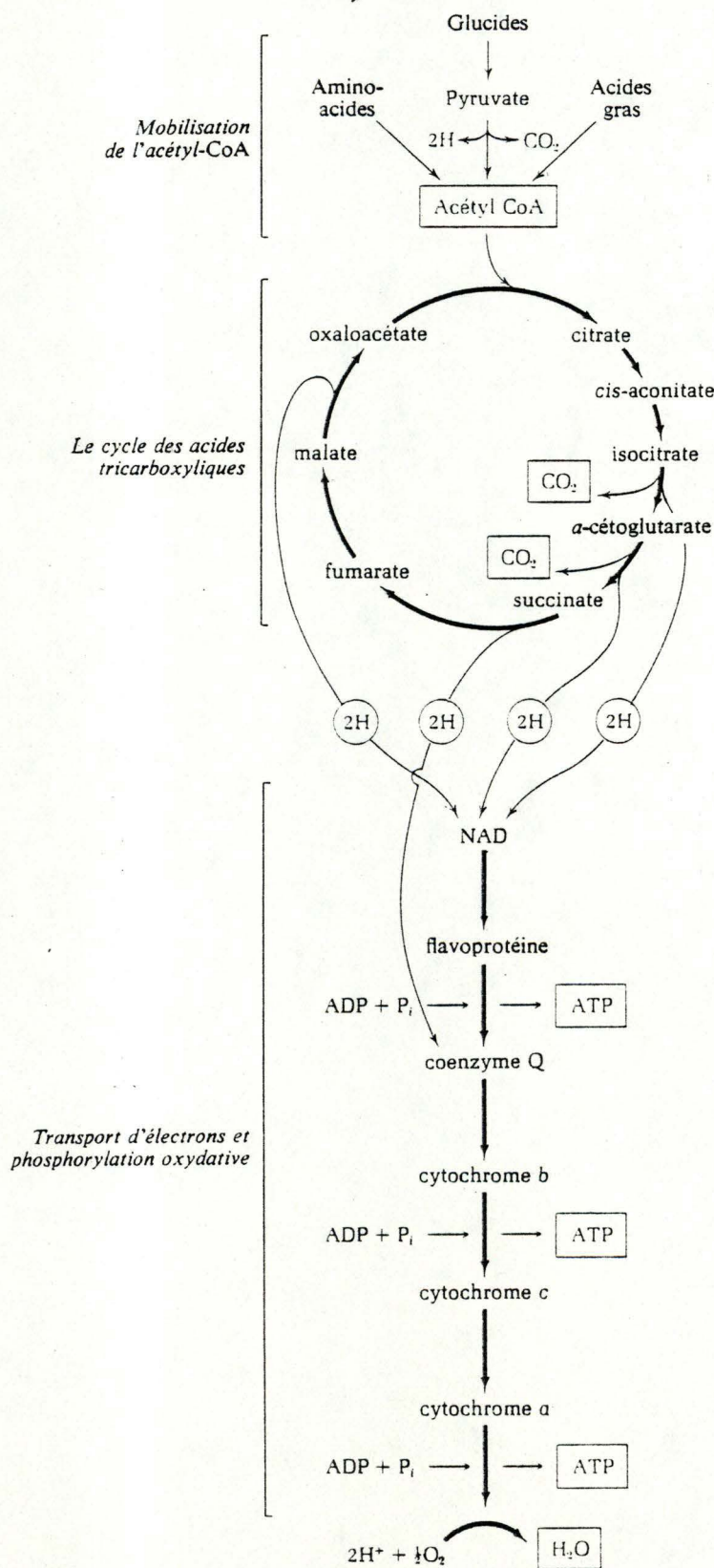


Fig.5 : Oxydation des glucides et transferts d'électrons de la respiration (41).

Le bilan énergétique de la respiration est de 36 ATP formés par molécule d'hexose consommée. Il est donc 18 fois plus élevé que celui de la fermentation.

D'un point de vue évolutif, la terre étant apparue en conditions d'anaérobiose, la fermentation a certainement constitué le premier métabolisme énergétique pour les êtres primitifs. Ce n'est que plus tard, après l'apparition de l'oxygène due à la photosynthèse, que la respiration, plus performante, est venue se greffer sur la fermentation et la supplanter peu à peu chez la majorité des êtres vivants (43).

Cependant, chez certains organismes primitifs comme Saccharomyces cerevisiae, la respiration, bien que possible, n'a jamais remplacé la fermentation en conditions normales. Ceci est probablement dû à ce que la respiration chez ces organismes n'est pas très "au point" (les enzymes sont moins actives), contrairement à la fermentation.

La fermentation alcoolique reste donc préférentiellement utilisée par Saccharomyces cerevisiae en conditions normales, ce qui fait de cet organisme une véritable machine à transformer le sucre en alcool. Cette particularité lui vaut son grand intérêt économique (fabrication de la bière, du vin...).

Cependant, si la source d'énergie disponible est du lactate par exemple, la levure peut le transformer en pyruvate par la LDH. Mais elle sera obligée de respirer pour en tirer de l'énergie. Le lactate est dit pour cette raison un substrat respiratoire, par opposition aux substrats fermentables.

Le glycérol constitue un substrat un peu particulier : sa fermentation produit 1 ATP par molécule de glycérol.

On constate qu'une levure placée sur un milieu contenant du glycérol comme unique source d'énergie utilise la respiration plutôt que la fermentation, alors que nous savons que, quand elle le peut, la levure utilise préférentiellement la fermentation.

La préhension du glycérol par Saccharomyces cerevisiae constitue peut-être l'étape limitante. En effet, Gacendo et al ont montré en 1968 que la pénétration du glucose dans Saccharomyces cerevisiae est beaucoup moins rapide que chez d'autres champignons comme Candida utilis par exemple (45). Cette lenteur relative associée au faible rendement de 1 ATP par molécule de glycérol fermentée, pourrait empêcher la levure de survivre par fermentation uniquement.

D'autre part, la transformation du glycérol en dihydroxy-acétone-P cède 2 électrons et $2H^+$ à une molécule de NAD. La fermentation du glycérol utilise donc 2 NAD dont un seul est régénéré par la fermentation. La respiration est donc nécessaire pour la régénération de NAD.

Le glycérol est donc un substrat respiratoire.

7.2.5.-Autres rôles du métabolisme énergétique.

Nous avons vu que l'organisme avait besoin pour vivre d'une source de carbone. Les substrats du métabolisme énergétique servent, en plus de leur rôle de donneur d'énergie, de sources de carbone.

En effet, la glycolyse et le cycle Krebs sont en fait des voies amphiboliques : elles fonctionnent non seulement dans le sens catabolique décrit, mais fournissent également des précurseurs utilisables dans les voies anaboliques (40, 41).

Plusieurs réactions enzymatiques importantes détournent ainsi de la voie catabolique des intermédiaires spécifiques tels que le glucose-6-P, le 3-P-glycérate, le P-énol pyruvate, l'oxaloacetate, l'4'-cetoglutarate et le succinate.

Ceux-ci constituent ainsi les "précurseurs de composés organiques" aussi essentiels que les acides aminés, les bases puriques et pyrimidiques, les acides gras (40, 41).

Pour que le cycle de Krebs puisse continuer à tourner, il est nécessaire d'alimenter celui-ci en intermédiaires dérivés sur ces autres voies. Des mécanismes enzymatiques sont mis en place dans ce but : ce sont les réactions anaplérotiques telles que la transformation du pyruvate en oxaloacetate par la PYC ou encore le cycle du glyoxylate (voir fig. 4). *Pyruvate Carboxykinase*

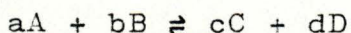
7.2.6.-La gluconéogenèse.

La croissance sur un substrat respiratoire tel que le lactate nécessite donc de réaliser une sorte de "glycolyse à l'envers" de manière à obtenir les intermédiaires nécessaires : c'est la gluconéogenèse.

Toute réaction chimique est en fait un équilibre plus ou moins déplacé, répondant aux lois de la thermodynamique (conservation de l'énergie totale du système et du milieu extérieur, augmentation de l'entropie de l'univers).

Au niveau du système, ces lois se traduisent par une valeur : ΔG .

Le ΔG est la variation d'énergie libre, c'est-à-dire la fraction de la variation totale d'énergie qui est disponible pour fournir un travail, lorsque ce système évolue vers l'équilibre à température, pression et volume constants. L'énergie libre du système a toujours tendance à diminuer (46). Soit la réaction



ou a, b, c et d représentent le nombre de molécules de A, B, C et D qui participent à la réaction.

Le ΔG de cette réaction, à température et pression constantes vaut :

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

[] : concentrations molaires
 R : constante des gaz parfaits
 T : température absolue
 ΔG° : variation d'énergie libre standard, c'est-à-dire le ΔG de la réaction dans des valeurs standard de T, de P et de [] .
 C'est une constante pour la réaction.

La réaction sera toujours déplacée dans le sens pour lequel le ΔG est négatif.

Si le ΔG° est relativement proche de 0, le déplacement de la réaction dans un sens ou dans l'autre dépendra surtout des concentrations relatives : la réaction est dite réversible.

Par contre, si le ΔG° est nettement inférieur à 0, les concentrations en C et D devront être très élevées pour compenser et déplacer la réaction vers la gauche : en pratique, une telle réaction est irréversible.

Les ΔG° de chaque étape de la glycolyse ont été déterminés et sont représentés à la fig. 6.

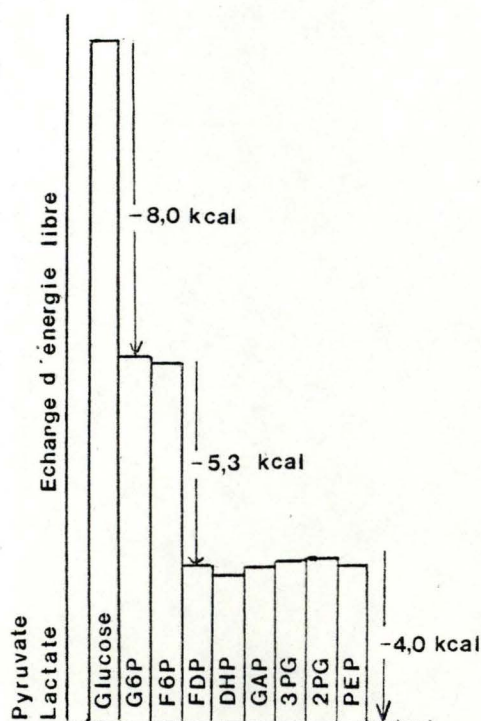


Fig. 6 : Echanges d'énergie libre lors des différentes étapes de la glycolyse. (40)

Ce profil correspond à la glycolyse dans l'érythrocyte humain et malheureusement pour nous pas chez la levure, mais le raisonnement reste semblable.

On constate que la plupart des réactions sont réversibles et sont utilisées indépendamment dans le sens glycolyse et gluconéogenèse.

Mais 3 étapes montrent un ΔG° nettement négatif : elles ne sont utilisables que pour la glycolyse. Ces étapes (phosphorylation du glucose, phosphorylation du fructose-6-P et formation du pyruvate) nécessitent donc la mise en place de voies de retour distinctes, utilisant d'autres enzymes.

La gluconéogenèse n'est donc pas exactement la glycolyse à l'envers : elle possède ses étapes propres.

7.2.7.-Effets particuliers du glucose.

Comme nous allons le voir, le glucose exerce des effets particuliers sur la gluconéogenèse.

En 1975, Haarasilta et Oura (47) réalisent le dosage d'enzymes propres à la gluconéogenèse et aux voies ana-plérotiques, lors d'une croissance sur un milieu contenant du glucose et de l'éthanol comme sources d'énergie.

Une répression du glucose sur les gènes codant pour ces enzymes est mise en évidence. De plus, le glucose semble également exercer un effet inhibiteur sur les enzymes de la gluconéogenèse. La présence de glucose dans le milieu empêche donc la gluconéogenèse par ce double effet.

L'inhibition par des sucres fermentables (glucose mais aussi fructose), est étudiée plus en détail en 1979 (48) grâce à divers mutants. Cette étude montre que l'inhibition est due non pas aux sucres tels quels, mais aux sucres phosphorylés. En outre, c'est la synergie entre le glucose-6-P et le fructose-6-P qui provoque l'inhibition.

Cet aspect de répression et d'inhibition de la gluconéogenèse sera déterminant pour nous par la suite pour la mise au point de notre technique d'identification.

7.3 -Le cycle de division cellulaire.

7.3.1.-La nécessité de sauvegarder l'espèce.

La sauvegarde du patrimoine génétique constitue l'une des préoccupations majeures de tout être vivant. Pour un organisme unicellulaire tel que Saccharomyces cerevisiae, deux moyens sont utilisés. Le premier est la reproduction

sexuée c'est-à-dire la conjugaison de deux individus de sexes opposés. Ce moyen implique un brassage du patrimoine génétique de l'espèce.

Un second moyen est la multiplication végétative qui consiste en divisions successives des cellules en deux cellules filles génétiquement identiques à la cellule mère. Toutes les cellules descendantes seront en principe (sauf mutations), rigoureusement identiques et formeront un clone.

La multiplication végétative, qui nous occupe ici, a nécessité la mise en place d'un processus bien défini et complexe appelé cycle de division cellulaire.

Comme nous allons le voir, ce processus met en jeu un nombre important de gènes évidemment essentiels pour la vie végétative.

Le cycle de division cellulaire doit donc logiquement donner lieu à un certain nombre de mutations thermosensibles, d'où l'intérêt que nous lui portons.

7.3.2.-Description du cycle de division de *Saccharomyces cerevisiae*.

Comme pour les autres eucaryotes, le cycle de division de *Saccharomyces cerevisiae* est conventionnellement divisé en phases : la phase G1 qui précède l'initiation de la réplication du DNA chromosomique; la phase S, phase de réplication du DNA chromosomique; une phase G2; une phase M pendant laquelle a lieu la mitose.

La division de *Saccharomyces cerevisiae* se fait par bourgeonnement et non par division binaire comme c'est le cas pour d'autres levures (49).

La fig. 7 représente le cycle normal de division qui débute en G1 par la formation des centrosomes. Puis il apparaît dans la paroi non chitineuse épaisse de la cellule, un cercle de chitine à l'intérieur duquel se développe un bourgeon. Dans cette région apparaît un cercle de microfilament orienté vers le bourgeon.

Vers la fin de la phase S, le fuseau complet se forme puis s'allonge rapidement et le noyau se divise. La cytokinèse, c'est-à-dire la séparation des cytoplasmes des deux cellules par une barrière membranaire, se réalise alors, suivie de la séparation des cellules (50).

Il faut noter qu'à aucun moment, on n'observe de condensation des chromosomes. Cela est dû au fait que la division cellulaire est débutée très tôt dans la phase G1 et que la cellule ne peut maintenir ses chromosomes condensés (la transcription est inhibée) pendant une aussi grande partie du cycle (49).

La question qui se pose maintenant est de savoir comment ces différentes étapes s'agencent entre elles.

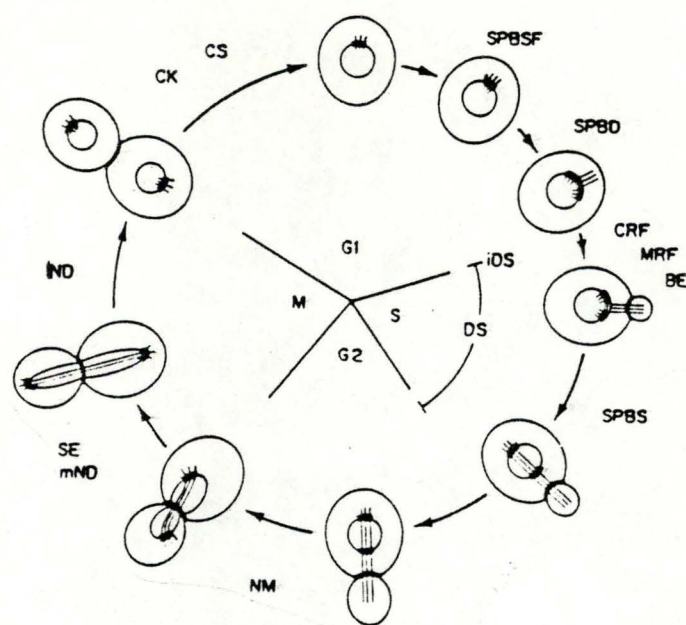


Fig.7: Cycle de division de Saccharomyces cerevisiae. (50).

SPBSF: Spindle Pole Body Satellite Formation

SPBD: Spindle Pole Body Division

CRF: Chitin Ring Formation

MRF: Microfilament Ring Formation

BE: Bud Emergence

SPBS: Spindle Pole Body Separation

NM: Nuclear Migration

mND: medial Nuclear Division

SE: Spindle Elongation

IND: late Nuclear Division

CK: Cytokinesis

CS: Cell Separation

iDS: initiation of DNA Synthesis

DS: DNA Synthesis

7.3.3.-La coordination des événements : les modèles possibles.

Deux modèles possibles expliquent la séquence des événements du cycle de division (51) (fig 8).

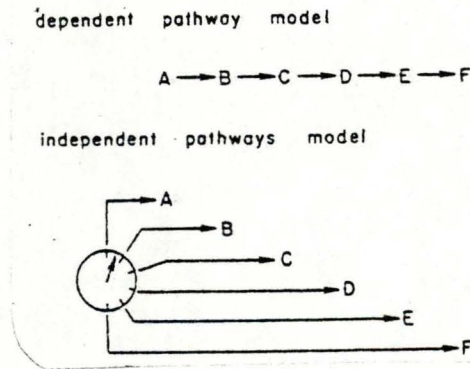


Fig.8: Modèles dépendant et indépendant expliquant les séquences des événements du cycle de division. (51)

Le modèle "dépendant" implique une connexion causale directe entre un événement et le suivant. Ainsi, l'événement C ne pourra se faire que si l'événement B est entièrement terminé.

Dans le modèle indépendant, par contre, les événements sont ordonnés par des signaux provenant d'un mécanisme temporel central.

Dans ce modèle, l'événement C pourra se faire même si l'événement B n'est pas terminé, ou même s'il est complètement absent.

Il est bien sûr possible que le cycle de division corresponde à un modèle mixte, mélange des deux modèles présentés (fig 9).

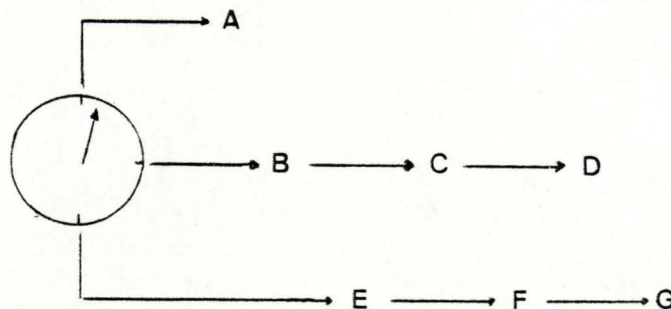


Fig.9 : Modèle mixte expliquant la séquence des événements du cycle de division.

Il est possible de distinguer entre ces deux modèles fondamentalement différents en bloquant le cycle à un stade donné. Selon que les événements suivants se réaliseront ou non, on aura affaire à un modèle indépendant ou dépendant.

Pour ce faire, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'un événement du cycle peut donner des renseignements utiles. Cependant, c'est l'utilisation de mutants thermosensibles qui a donné le plus de détails (51).

7.3.4.-Les mutants cdc.

Une mutation menant à la perte d'une fonction particulière dans un stade du cycle de division est dite mutation cdc (cdc pour "cell division cycle"). Si la fonction touchée est essentielle pour le cycle, la mutation est létale : l'utilisation de mutants conditionnels s'impose.

Des mutants thermosensibles ont été utilisés à cet effet (50, 51, 52, 53).

Lorsque des mutants cdc thermosensibles sont placés en conditions restrictives, chaque cellule cesse son développement au même point du cycle de division (au moment où le produit du gène muté devrait normalement entrer en jeu). Donc, à partir d'une population initiale asynchrone (cellules à des stades divers du cycle), se développe une population de cellules homogènes morphologiquement, représentant toutes le phénotype terminal caractéristique de la mutation (50).

L'identification de mutants cdc est donc basée sur la morphologie particulière du mutant en conditions restrictives.

7.3.5.-La séquence des événements répond à un modèle mixte.

Les études réalisées sur des mutants cdc ont permis d'établir que le cycle de division de Saccharomyces cerevisiae répondait à un modèle mixte (51). Un schéma reprenant les événements du cycle et montrant les relations entre eux, ainsi que les gènes impliqués à chaque stade, a pu être établi (50) (fig.10).

Dans ce schéma, si deux événements sont situés sur des flèches parallèles, cela signifie qu'ils sont indépendants entre eux.

Les événements dépendants sont directement reliés entre eux par les flèches. Les numéros correspondent aux numéros des gènes cdc impliqués au stade où ils sont indiqués. La position des événements de la gauche vers la droite correspond approximativement à l'ordre temporel dans lequel ils se déroulent.

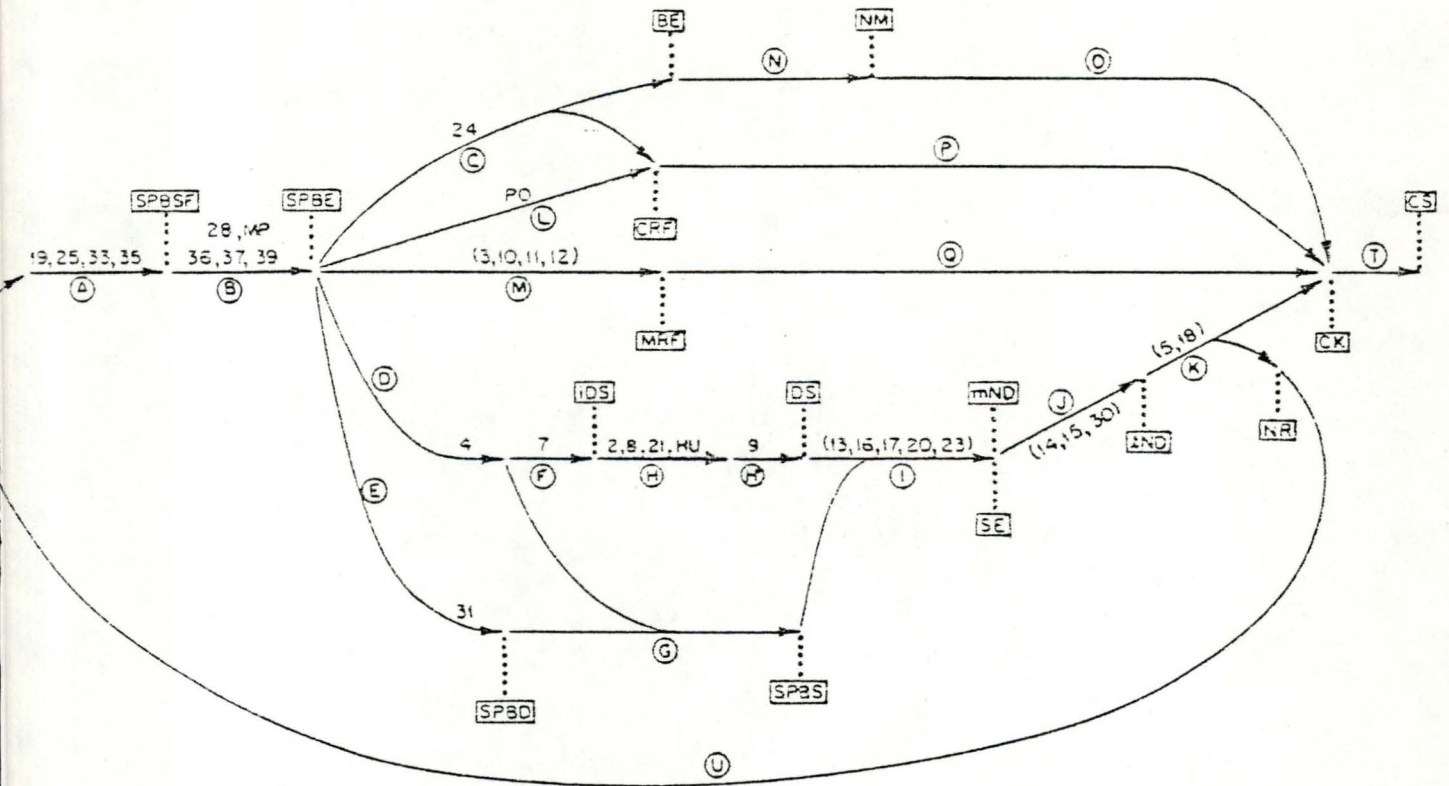


Fig.10: Schéma reprenant les événements du cycle de division de *Saccharomyces cerevisiae*. Les nombres représentent les numéros des gènes *cdc* impliqués à chaque stade. Les lettres entourées d'un cercle représentent le phénotype correspondant (voir explication dans RESULTATS ET DISCUSSION: 7. -Identification des mutants *cdc*). Les lettres entourées d'un rectangle symbolisent l'événement du cycle. (50)

**MATERIEL
ET
METHODES**

1. - SOUCHE UTILISEE.

Nous utilisons comme souche de départ pour la mutagenèse la souche Saccharomyces cerevisiae D585-11C (a, lys 1) provenant des Cold Spring Harbor Laboratories; Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.

2. - MILIEUX DE CULTURE UTILISES.2.1. -Préparation des milieux.

Après ajustement des proportions précisées ci-dessous et ajustement du pH à pH 4,8 à l'aide de HCl ou de NaOH, le milieu est stérilisé dans une casserole à pression pendant 15 minutes à 120°C, dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau.

Pour les milieux solides, 2% de Bacto Agar (Difco) sont ajoutés. Après stérilisation, le milieu est coulé dans des boîtes de Petri et mis à sécher deux jours à température ambiante avant utilisation.

2.2. -Composition des milieux.

Les proportions sont données en poids par volume d'eau distillée.

2.2.1.-Milieu YPD = milieu complet.

Bacto Yeast Extract (Difco)	1%
Peptone de caséine (Merck)	2%
D (+) Glucose (monohydraté) (Merck)	2%

2.2.2.-Milieu YPM = milieu d'identification des mutants de préhension du glucose.

Bacto Yeast Extract (Difco)	1%
Peptone de caséine (Merck)	2%
Maltose	2%

Le maltose est mis en solution dans de l'eau distillée, solution qui est stérilisée par filtrage sur filtre Gelman GA-8 (0,2 μ n).

Il est ajouté au milieu juste avant de couler celui-ci dans les boîtes.

2.2.3.-Milieu YPGL.

Milieu d'identification des mutants de fermentation et de préhension du glucose.

Bacto Yeast Extract (Difco)	1%
Peptone de caséine (Merck)	2%
Glycérol	2%
Acide lactique 88% (UCB)	2%

2.2.4.-Milieu YPGE.

Milieu d'identification des mutants de fermentation et de préhension du glucose.

Bacto Yeast Extract (Difco)	1%
Peptone de caséine (Merck)	2%
Glycérol	2%
Ethanol	2%

L'éthanol est ajouté après stérilisation, juste avant de couler le milieu dans les boîtes.

2.2.5.-Milieu YPG.

Milieu d'identification des mutants de respiration.

Bacto Yeast Extract (Difco)	1%
Peptone de caséine (Merck)	2%
Glycérol	2%
D(+) Glucose (monohydraté) (Merck)	0,025%

3. - CULTURES EN MILIEU LIQUIDE.

La quantité de milieu requise est placée dans un erlenmeyer stérile de contenance double du volume de milieu, bouché par un tampon d'ouate. Le milieu estensemencé stérilement (en flambant le col de l'erlenmeyer après avoir retiré le bouchon et en maintenant l'erlenmeyer incliné à proximité de la flamme d'un bec Bunsen), à partir d'un peu de colonie prélevée sur un fil de platine (préalablement stérilisé par chauffage au rouge et refroidi dans l'agar).

La culture est alors placée à température voulue, sur un agitateur maintenant une agitation constante.

- Courbe de croissance.

Une préculture de 5 ml est réalisée comme décrit ci-dessus (dans un tube à essai, vu le faible volume) et laissée

à 23°C pendant deux à trois jours, c'est-à-dire le temps nécessaire pour permettre à la culture d'atteindre une valeur de 7 à 8 DO (lecture au spectrophotomètre selon le principe de la turbidimétrie).

Un erlenmeyer contenant 100 ml de milieu est préparé et servira à la réalisation de la courbe proprement dite.

Ce milieu estensemencé à partir de la préculture de manière à obtenir une valeur de départ de environ 0,1 DO (à partir de plus ou moins 1,25 à 1,50 ml de préculture).

A partir du temps 0 (moment de l'ensemencement), la croissance est suivie régulièrement par lecture de la DO au spectrophotomètre, jusqu'au moment où la culture atteint la phase stationnaire.

4. - CULTURES EN MILIEU SOLIDE.

Etant donné l'immobilité des cellules sur milieu solide, on peut ici obtenir un clone issu d'une seule cellule isolée sur le milieu.

On peut également mettre en culture plusieurs colonies différentes sur une seule boîte, sans risquer qu'elles se mélangent.

Plusieurs de nos techniques d'identification vont faire appel à des comparaisons de croissance sur des milieux différents, ce qui implique de pouvoir obtenir des répliques des colonies.

- Techniques de réplification utilisées.

° Par mise en suspension des cellules.

Dans chacun des "puits" d'une boîte à dépression stérile (Falcon 3.040) sont déposés 100 μ l d'eau distillée stérile.

Un petit échantillon de chaque colonie à répliquer est prélevé sur la pointe d'un cure-dent stérile et mis en suspension dans l'eau contenue dans un des puits. Chaque puits contient ainsi une suspension de cellules venant d'une colonie différente.

De ces suspensions, 8 μ l sont prélevés et déposés sur une boîte vierge, formant après pénétration de l'eau dans le milieu un mince film de cellules à la surface du milieu. Chaque clone peut ainsi être répliqué sur plusieurs boîtes différentes. Sur chaque boîte, la quantité de cellules déposée sera statistiquement semblable puisqu'il s'agit chaque fois d'un même volume d'une même suspension cellulaire.

° Par le répliqueur à clous.

- Description du répliqueur à clous.

La position des colonies sur les boîtes est standardisée : 25 colonies sont disposées par boîte, dans des positions obtenues par référence à une grille numérotée. Ceci a permis l'utilisation d'un instrument que nous avons appelé le répliqueur à clous (photos 1 et 2).

Celui-ci est composé d'un disque d'aluminium de diamètre semblable à celui d'une boîte de Petri, et d'épaisseur suffisante pour y forer des trous dans lesquels seront enfoncés des clous - 25 clous à tête plate et striée sont enfoncés et collés, de manière à ce que les têtes de clous se trouvent toutes dans un même plan. Les clous sont disposés de telle manière que, si l'on applique correctement le répliqueur à clous sur une boîte de Petri avec ses 25 colonies, chaque tête de clou se trouvera en face d'une colonie.

- Réplication.

Les têtes de clous sont d'abord stérilisées par trempage dans l'alcool et flambage au Bunsen. Elles sont refroidies par application sur une boîte vierge. Le répliqueur à clous est ensuite appliqué sur la boîte à répliquer, de manière à ce que les têtes de clous entrent en contact avec les colonies. Chaque clou retient ainsi un échantillon de la colonie, qui est déposé par application du répliqueur à clous sur la boîte vierge. Celle-ci devient donc la réplique de la boîte de départ.

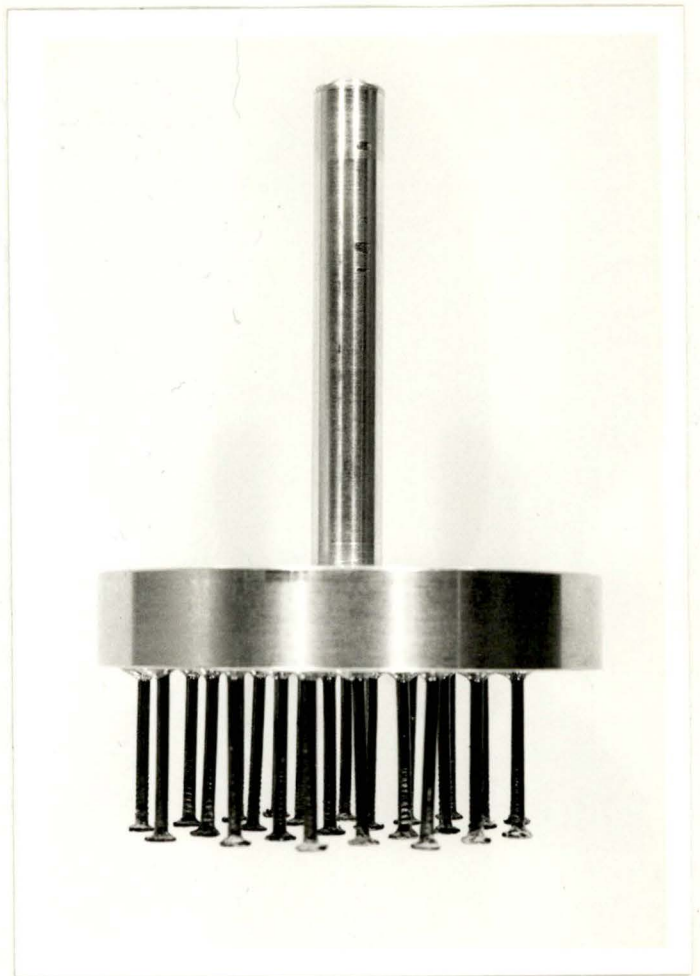
5. - PROTOCOLE DE LA MUTAGENÈSE.

La mutagenèse qui a mené à la constitution d'une banque de mutants thermosensibles, a été réalisée en 1982 par Hélène Bouchet et Camille Loch, au laboratoire de génétique moléculaire de l'U.C.L.

Bien qu'elle ait été réalisée en dehors de ce mémoire, il est important pour nous de considérer le protocole, principalement pour s'assurer que les mutants obtenus sont indépendants, et pour voir dans quelles conditions (sur quel milieu surtout) les mutants thermosensibles ont été isolés.

Une culture de 10 ml a été réalisée à partir de la souche D585-11C.

Les cellules obtenues sont lavées avec 100 ml d'un mélange tampon phosphate pH 8, 0,1 M et glucose 2%, avant d'être resuspendues dans 10 ml de ce même mélange.



Photos 1a et 1b. Réplicateur à clous.

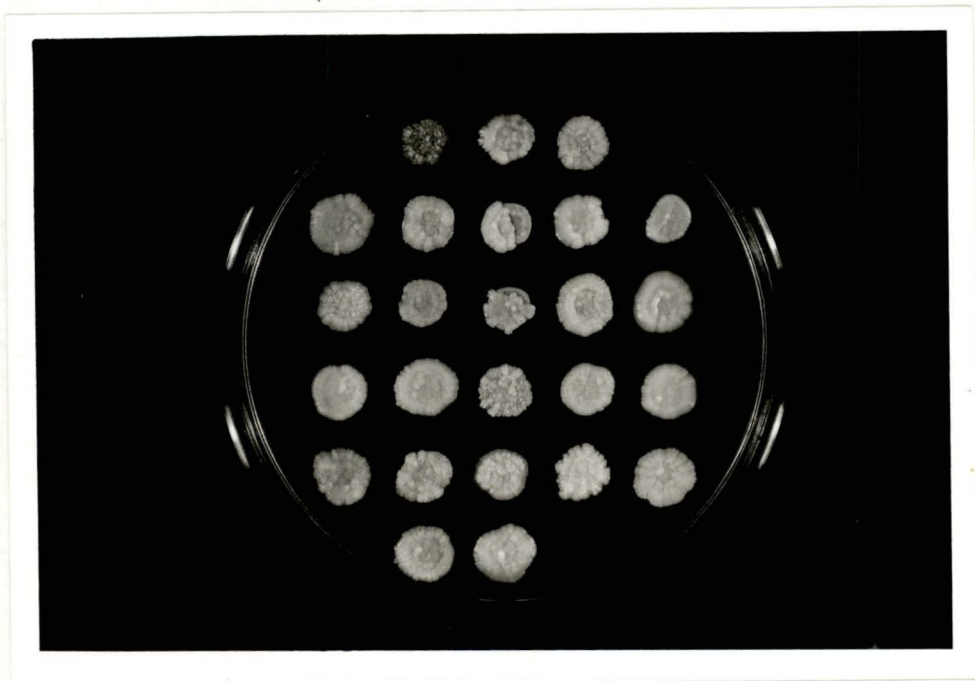


Photo 2. Boîte répliquée par la méthode du réplicateur à clous, après 2 jours de croissance à 23°C. On peut voir la disposition standard des 25 colonies.

EMS

200 μ l d'éthyl méthane sulfonate sont ajoutés et le tout est incubé pendant 90 minutes à 30°C sous agitation constante.

Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec de l'eau froide, puis resuspendues dans 10 ml de milieu YPD. On laisse incubé 2 à 3 heures à 30°C sous agitation constante (pour permettre l'élimination de l'EMS).

Yeast
Pept.
D. Gluc.

Les cellules sont alors comptées : 10^6 cellules par ml sont obtenues.

Trois dilutions sont réalisées (10x, 50x, 100x), à partir desquelles 100 μ l sont prélevés et étalés sur boîte YPD, l'opération étant répétée quatre fois.

Dilution <u>10x</u>	<u>$4 \times 100 \mu$l</u>	<u>4 boîtes</u>
Dilution <u>50x</u>	<u>$4 \times 100 \mu$l</u>	<u>4 boîtes</u>
Dilution <u>100x</u>	<u>$4 \times 100 \mu$l</u>	<u>4 boîtes</u>

Après incubation à 23°C, les colonies obtenues sont comptées, de manière à calculer un pourcentage de survie des cellules à la mutagenèse.

Dilution <u>10x</u>	—————>	<u>143 colonies par boîte</u> <u>en moyenne</u>
Dilution <u>50x</u>	—————>	<u>25 colonies par boîte</u> <u>en moyenne</u>
Dilution <u>100x</u>	—————>	<u>15 colonies par boîte</u> <u>en moyenne.</u> (sur lun de ses)

Cette opération est ensuite réalisée en série : à partir d'une dilution 10x, 150 boîtes sont ainsi étalées. Les colonies obtenues après incubation à 23°C sont repiquées sur des boîtes d'après la grille de référence.

La thermosensibilité est testée par réplication sur velours des boîtes à 23°C et à 37°C. Environ 1 à 2 colonies par boîte sont thermosensibles. Chaque colonie thermosensible est ensuite retestée par méthode de la mise en suspension.

On peut contrôler facilement la fréquence de mutation par le repérage des mutants d'auxotrophie pour l'adénine. En effet, ces mutants ont la caractéristique de former des colonies rouges.

Sur 150 boîtes contenant environ 145 colonies chacune, c'est-à-dire environ 21.750 colonies, 50 mutants auxotrophes pour l'adénine ont été repérés (soit 0,23%).

Un test de complémentation a permis de déterminer les proportions de mutants ade 1 et de mutants ade 2. Sur 39 mutants caractérisés, 21 étaient des mutants ade 2 et 8 étaient des mutants ade 1. Cette différence de proportion est intéressante à noter.

Le point important à examiner pour nous est le temps laissé aux cellules pour se diviser entre le début de la mutagenèse à l'EMS et le moment de l'isolement. Si ce temps est trop long, on risque d'obtenir des colonies "soeurs".

Depuis le moment d'adjonction d'EMS jusqu'au moment où la culture est étalée (en partie, et le reste est mis au frigo), il s'écoule environ 4 heures. Dans les 90 premières minutes (mutagenèse proprement dite), les cellules sont placées dans un milieu peu favorable à la croissance. Elles subissent ensuite un choc (3 lavages à l'eau froide) avant d'être placées pour 2 à 3 heures en milieu YPD. En tenant compte de ces chocs et du temps de latence nécessaire pour permettre à la cellule de s'adapter aux possibilités du milieu, et en sachant que le temps de génération est d'environ 2 heures, on peut raisonnablement penser que peu ou pas de cellules ont eu le temps d'effectuer un cycle de division complet.

D'autre part, l'isolement des mutants se fait sur milieu complet YPD (contenant des acides aminés, des bases, des vitamines...). C'est important puisqu'on sait que la notion de gène essentiel est liée au milieu utilisé. Dans notre cas par exemple, des mutants d'auxotrophie ne peuvent pas être thermosensibles puisque le milieu contient tous les acides aminés nécessaires.

6. - CONSERVATION DE LA BANQUE.

6.1. -A long terme.

Depuis février 1982, date de fabrication de la banque, celle-ci a été conservée à l'ultra freezer, à -80°C , dans un milieu YPD + 50% glycérol. Chaque souche thermosensible a ainsi fait l'objet d'une petite culture de 1 ml dans ce milieu liquide, dans une cupule Eppendorf.

Chaque souche a reçu un numéro t^1 à t^5 883. Les cupules sont ensuite congelées directement au freezer.

Cette méthode permet la conservation à long terme.

6.2. -A court terme.

Au cours de ce mémoire, les souches ont en outre été conservées sur milieu YPD solide, à raison de 25 colonies par boîte, en chambre froide à $+4^{\circ}\text{C}$. Cette méthode ne permet pas une conservation à long terme mais laisse l'accès permanent et immédiat à n'importe quelle souche.

Les souches sont placées sur les boîtes d'après la grille référence, par ordre de leur numérotation. Chaque boîte est numérotée (1-25; 26-50; 51-75; ...; 875-883).

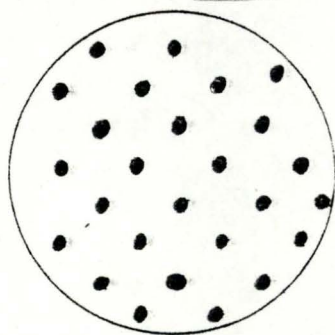
*acrobasse ou anaerobiose?*7. - CRIBLAGE DE LA BANQUE.7.1. - Mutants de fermentation.

L'identification de ces mutants se fait par comparaison de la croissance à 36°C sur milieu YPD d'une part et sur milieu YPGL d'autre part.

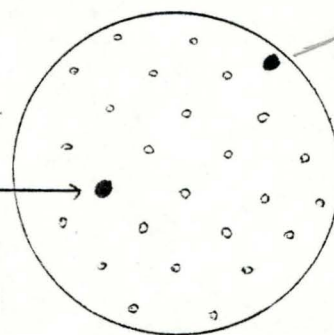
Une boîte contrôle YPD à 23°C est ajoutée (pour vérifier la viabilité de chaque souche). De plus, sur chaque boîte est ajoutée la souche sauvage D585-11C qui constitue la référence sur laquelle est jugée la croissance (voir schéma).

Glycérol. cc. lactique

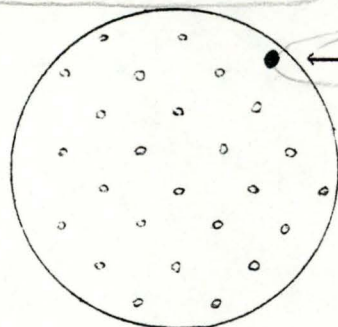
Milieu YPD 23°C



Milieu YPGL 36°C



Milieu YPD 36°C



Mutant de fermentation

*cette colonie peut utiliser l'acide lactique.**Test d'identification des mutants de fermentation.

7.3. -Mutants de respiration.

La croissance est comparée à 23°C sur milieu YPD d'une part et sur milieu YPG d'autre part.

Le contrôle est simplement constitué par la souche sauvage D585-11C placée sur chaque boîte.

7.4. -Mutants du cycle de division cellulaire.

Ces mutants se repèrent par leur morphologie particulière.

Une culture de 1 ml en milieu YPD liquide est réalisée dans une cupule Eppendorf pendant environ 12 heures à 23°C.

500 μ l de la culture sont prélevés et dilués dans 4,5 ml de milieu YPD (dilution 10x) pour obtenir une valeur d'environ 0,6 DO.

La suspension est soniquée (Bronson, Sonifier B 12) pendant 15 secondes à 67.000 W de manière à obtenir une séparation convenable des cellules agrégées.

8 μ l sont prélevés et déposés sur milieu YPD solide préchauffé à 36°C, et 8 μ l sont déposés sur milieu YPD solide à 23°C, constituant le contrôle.

Après pénétration du liquide dans le milieu, la zone de cellules est recouverte d'un petit treillis de nylon, qui forme ainsi une grille facilitant le repérage au microscope.

La boîte est alors placée à 36°C.

Pour la simple identification des mutants, les cellules sont observées au microscope (boîte de Petri ouverte sur la platine), après 5 à 6 heures de culture à 36°C, puis après une douzaine d'heures, et éventuellement encore par la suite pour les mutants non bloqués.

Les grilles peuvent servir à réaliser des photos d'une même plage de cellules à différents moments de la croissance. Pour ce faire, une plage de la grille est repérée, notée et photographiée aux moments voulus.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

1. - REVEIL DE LA BANQUE.

La banque de 883 mutants thermosensibles, réalisée en 1982, a été conservée à l'ultra-freezer à -80°C sous protection au glycérol, dans des cupules Eppendorf de 1,5 ml.

Cette méthode de conservation à long terme ne permet pas des accès répétés aux souches, car des décongélations et recongélations successives sont déconseillées (elles provoqueraient chaque fois la mort de nombreuses cellules).

Un autre mode de conservation, à moins long terme, mais qui permet l'accès permanent aux souches, consiste à maintenir chaque souche sous forme de colonie sur milieu solide, à basse température ($+ 4^{\circ}\text{C}$) pour stopper la croissance.

Le réveil de la banque constitue ce passage de l'ultra-freezer à la chambre froide. La banque est simplement décongelée à température ambiante.

Les cultures sont ensuite homogénéisées (au vortex). 10 μl de chaque culture sont prélevés et déposés sur des boîtes vierges, selon la position standard adoptée (voir Matériel et Méthodes).

Deux jours de croissance à 23°C permettent aux colonies de se développer. La banque ainsi constituée est placée en chambre froide à $+ 4^{\circ}\text{C}$ où elle est constamment disponible.

La banque originale est recongelée directement à l'ultra-freezer.

2. - COURBE DE CROISSANCE.

2.1. -Principe de la courbe de croissance.

Mis en culture dans un milieu liquide à température choisie et sous agitation constante, un microorganisme tel que Saccharomyces cerevisiae va se multiplier, et la masse de levure va donc augmenter en fonction du temps.

On peut suivre l'évolution de la culture au cours du temps par turbidimétrie (c'est-à-dire mesure du pourcentage de lumière absorbée par les cellules en culture, ou densité optique). Les mesures sont réalisées dans un spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 640 nm.

Du fait de la consommation des éléments nutritifs et de l'accumulation des produits terminaux du métabolisme, la composition du milieu varie en fonction du temps. Ceci se répercute sur la vitesse de croissance, qui variera donc elle aussi en fonction du temps.

Une courbe de croissance typique présente trois phases distinctes (54, 55)

- une phase de latence, où le taux de croissance est quasi nul, puis augmente progressivement : le micro-organisme s'adapte aux conditions du milieu
- une phase exponentielle où le taux de croissance est maximal et constant : l'organisme est adapté au milieu
- une phase de ralentissement suivie d'une phase stationnaire où le taux de croissance diminue progressivement pour s'annuler finalement à cause de la disparition des éléments nutritifs et de l'accumulation des déchets métaboliques.

La phase de latence sera d'autant plus longue que l'organisme est en état de "dormance" (s'il sort du frigo par exemple), ainsi que si l'organisme provient d'un milieu différent : il lui faut plus de temps pour adapter son métabolisme aux possibilités du milieu.

Dans le but de réduire cette phase de latence, et pour obtenir une même DO de départ pour chaque culture (ce qui facilite les comparaisons), une préculture est réalisée dans le milieu identique à celui dans lequel la courbe de croissance se réalise. A partir de cette préculture, un volume calculé pour obtenir une densité optique de départ de 0,1 DO est prélevé et sert à inoculer le milieu pour la courbe de croissance.

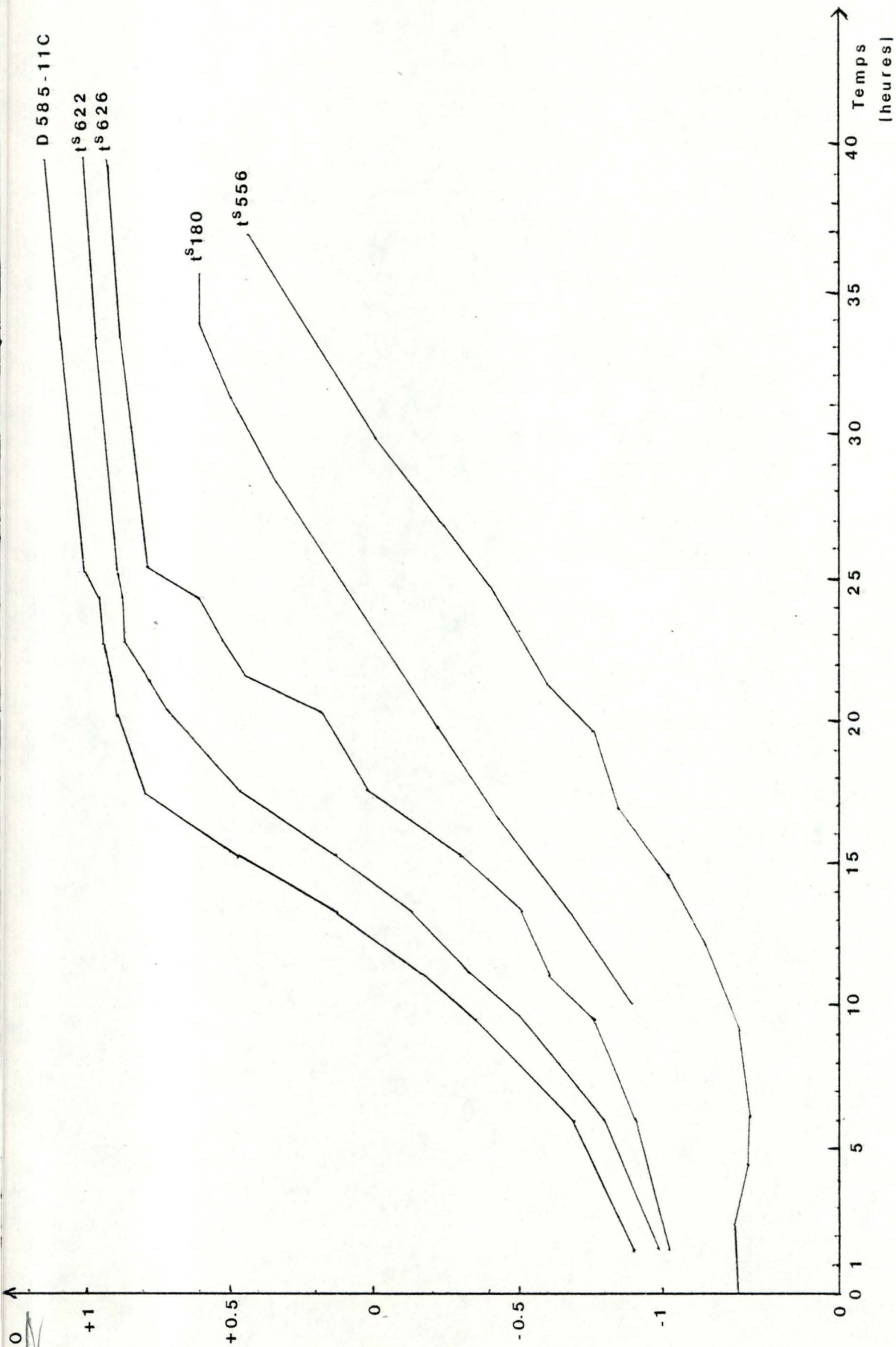


Fig. 11: Courbe de croissance à 23°C de la souche sauvage et de 4 mutants pris au hasard. Les différences de pente indiquent un ralentissement de la croissance des mutants par rapport au sauvage.

2.2. -Résultats et interprétation.

Des courbes de croissance sur milieu YPD à 23°C ont été réalisées pour la souche sauvage D585-11C et pour quatre mutants t^s quelconques (fig 11).

Des différences sensibles sont constatées, mais le taux de croissance des mutants est toujours inférieur à celui de la souche sauvage.

Cela s'explique par le mécanisme moléculaire de la thermosensibilité : la protéine ou le RNA déstabilisé garde en général une activité suffisante à 23°C pour permettre la croissance mais qui reste néanmoins inférieure à l'activité normale.

Souvent, cela constitue un facteur limitant pour la croissance qui s'en trouve ralentie.

Les différences constatées entre les mutants eux-mêmes peuvent être dues à plusieurs causes. D'abord, la déstabilisation de la structure peut être plus ou moins importante en fonction du site touché et de la substitution provoquée.

Ensuite, l'étendue du domaine couvert par la fonction touchée est variable. Par exemple, une protéine ribosomique touche toute la synthèse protéique, et la mutation provoquée a des effets sur toute la cellule. Par contre, une mutation dans une étape particulière de la synthèse d'une protéine constitutive de la paroi touche un domaine beaucoup plus restreint. A 36°C, les conséquences seront dramatiques dans les deux cas, mais à 23°C, l'effet sera beaucoup plus nuancé.

La principale conclusion à tirer est qu'un mutant thermosensible garde des traces de sa mutation même à 23°C. Il s'ensuit que, sur une boîte de Petri, toutes les colonies n'ont pas exactement la même taille. Nous verrons que cela influencera nos méthodes de répllication.

3. - VARIATIONS DE LA THERMOSENSIBILITE.

Le fait que la thermosensibilité n'est pas un phénomène "tout ou rien" se marque également de façon très nette à 36°C.

L'observation des mutants au microscope (pour la technique, voir 7.-Mutants cdc), met très clairement en évidence

des différences de croissance entre les mutants t^s placés à 36°C .

La photo 3 montre l'organisme sauvage après 6 heures de croissance à 36°C . Les gros amas de cellules sont dus à la fusion de plus petits amas et ne sont bien sûr pas issus d'une seule cellule.

Après 12 heures de croissance, toute la plage serait recouverte de cellules

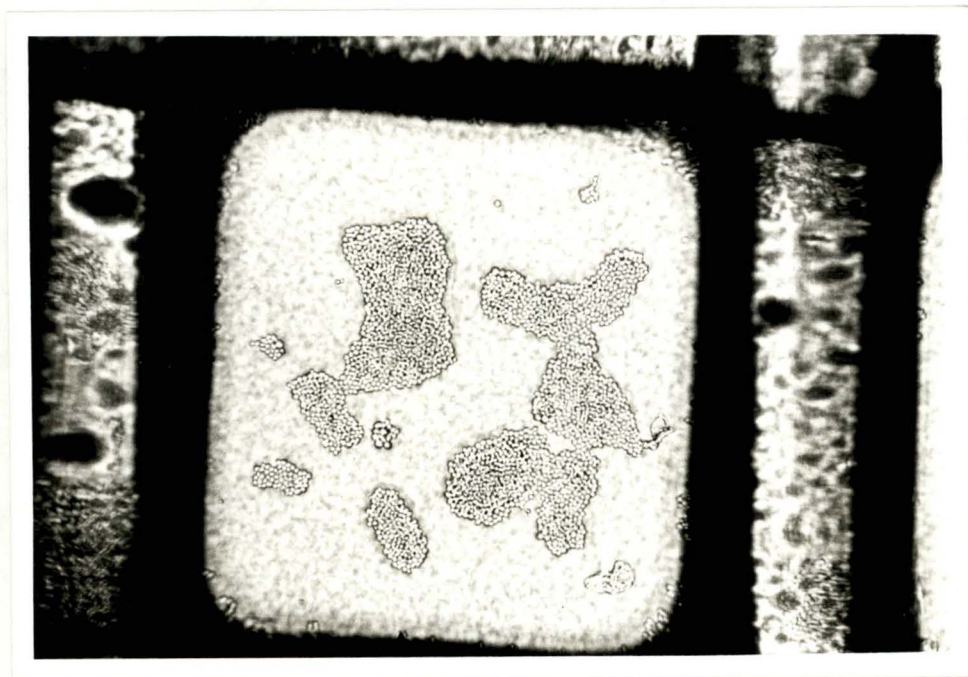


Photo 3: Souche sauvage D585-IIC après 6 heures de croissance à 36°C . Grossissement 80x.

Environ 25% des mutants thermosensibles (répertoriés sous le signe +++ dans l'annexe) stoppent très rapidement leur croissance après leur mise en conditions restrictives. C'est le cas notamment de la colonie t^s 107, comme on peut le constater sur la photo réalisée après 12 heures d'incubation à 36°C (photo 4). Sur cette photo comme sur les autres photos présentées, les différences de taille entre les amas de cellules sont dues à une mauvaise séparation des cellules au départ (voir 7.-Mutants cdc).

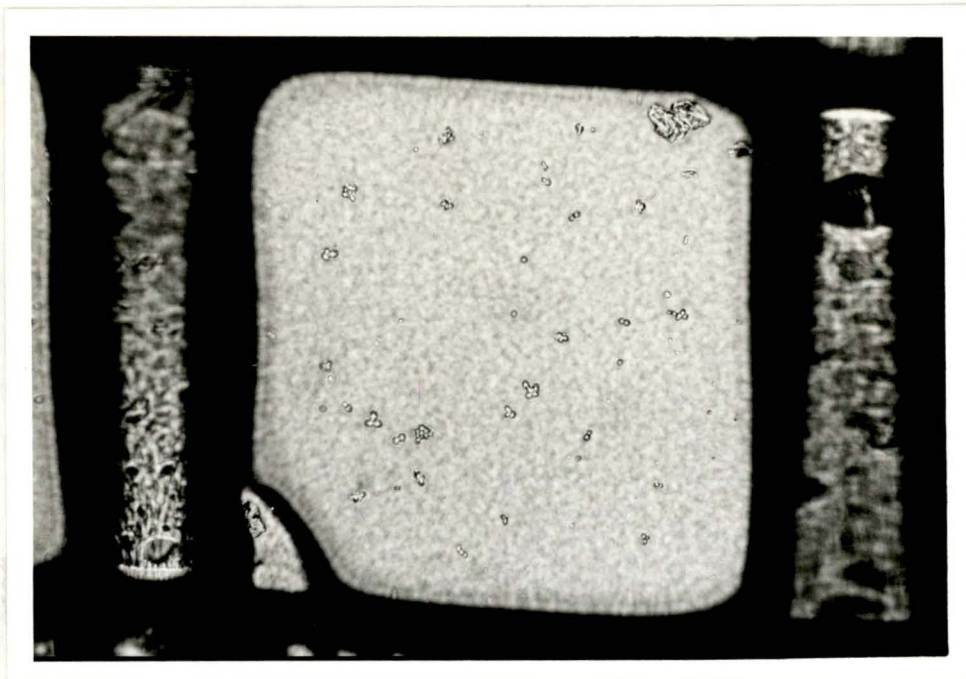


Photo 4: Mutant t^S 107 après 12 heures d'incubation à 36°C. Grossissement 80x.

Les 75% de mutants restants, par contre, montrent une croissance résiduelle d'importance variable.

La grosse majorité de ceux-ci (répertoriés sous le signe ++ dans l'annexe), continuent leur croissance pendant deux ou trois générations après leur mise en conditions restrictives. C'est le cas de la colonie t^S 25, photographiée après 12 heures de croissance (photo 5).

La colonie atteint déjà ce stade après environ 6 heures d'incubation, puis reste bloquée. L'image observée est typique de la grosse partie des mutants de la banque.

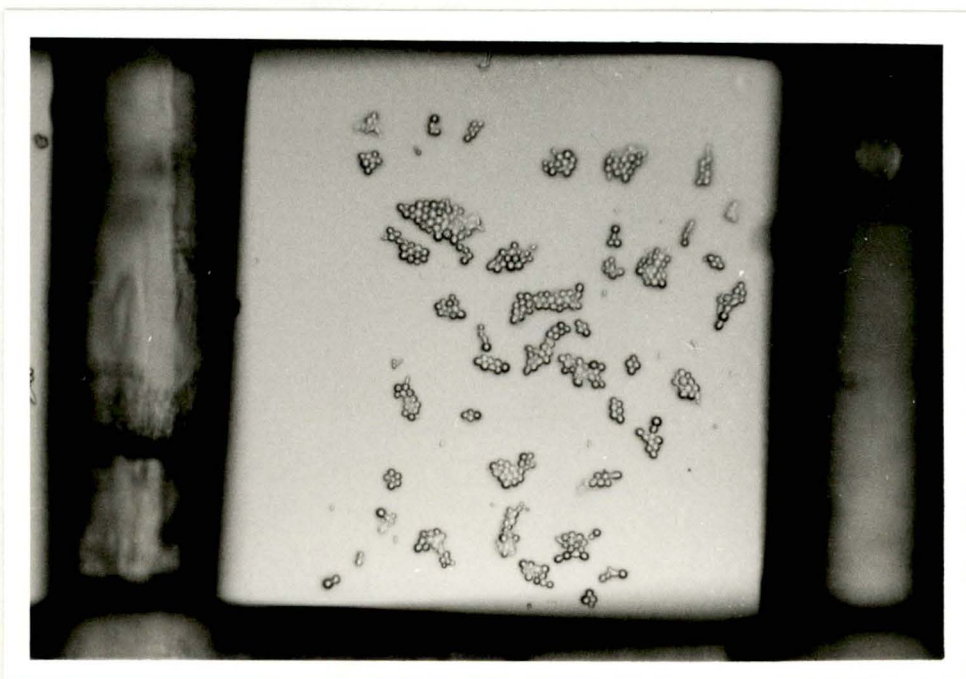


Photo 5: Mutant t^S 25 après 12 heures d'incubation à 36°C. Grossissement 80x.

Parmi les 75% de mutants montrant une croissance résiduelle, on en trouve un faible pourcentage qui continuent leur croissance pendant plusieurs cycles de division, pour finalement stopper celle-ci après une dizaine d'heures d'incubation à 36°C. C'est le cas de la colonie t^S 512, également photographiée après 12 heures et qui montre des amas de cellules beaucoup plus importants (photo 6).

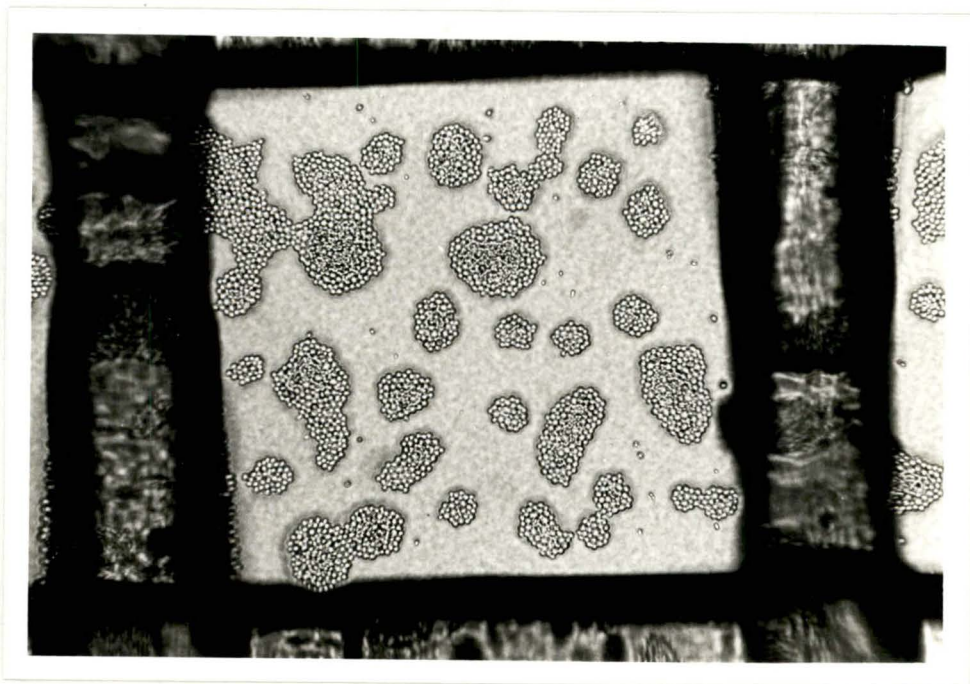


Photo 6: Mutant t^S 512 après 12 heures d'incubation à 36°C. Grossissement 80x.

Quelques mutants (répertoriés sous le signe + dans l'annexe) ont été observés, qui ne stoppaient pas du tout leur croissance. Celle-ci était cependant nettement ralentie par rapport à l'organisme sauvage. Après trois jours d'incubation à 36°C, ces mutants sont capables de former des colonies aussi développées que celles formées par la souche sauvage après deux jours. Ceci peut s'expliquer de deux façons. Soit la fonction n'est pas vraiment essentielle, et la mutation ne provoque dès lors pas la mort du mutant. Soit la thermosensibilité est faible et, même à 36°C, la fonction garde une efficacité suffisante pour maintenir l'organisme en vie.

Ces observations du phénomène de thermosensibilité et de ses variations à 23°C ou à 36°C sont essentielles à connaître avant de débiter l'identification proprement dite des mutants.

4. - TESTS DE THERMOSENSIBILITE.

Dans un organisme mutant, une mutation spontanée, inverse de la mutation originelle et ramenant ainsi le mutant à l'état sauvage, peu arriver : c'est une réversion (23). Or, un révertant, même d'un mutant conditionnel, en conditions permissives, est avantageé par rapport au mutant. Lors des étapes diverses qui ont suivi l'isolement des mutants de notre banque, de telles réversions peuvent être apparues. Il est donc nécessaire pour nous de vérifier avant toutes choses, la thermosensibilité des 883 souches.

Ceci se fait par comparaison de la croissance sur milieu YPD à 23°C et sur milieu YPD à 36°C.

Cette comparaison des croissances dans des conditions différentes nécessite donc de réaliser des répliques de la banque qui seront placées dans ces conditions.

Plusieurs techniques de réplification peuvent être utilisées (18)

- méthode des cure-dent : sur la pointe d'un cure-dent stérile, un petit échantillon de la colonie à repiquer est prélevé. Le simple piquage dans un milieu vierge dépose des cellules qui donnent naissance à la future colonie;
- méthode de réplique sur velours : un morceau de tissu (type velours), stérile, est tendu sur une base d'un cylindre, de dimensions légèrement inférieures à celles d'une boîte de Petri. La boîte à répliquer est appliquée sur le tissu qui retient ainsi des cellules de chaque colonie. L'application d'une boîte vierge sur le tissu permet de déposer des cellules qui formeront les colonies. La nouvelle boîte constitue ainsi la réplique exacte de la boîte de départ (fig.I2).

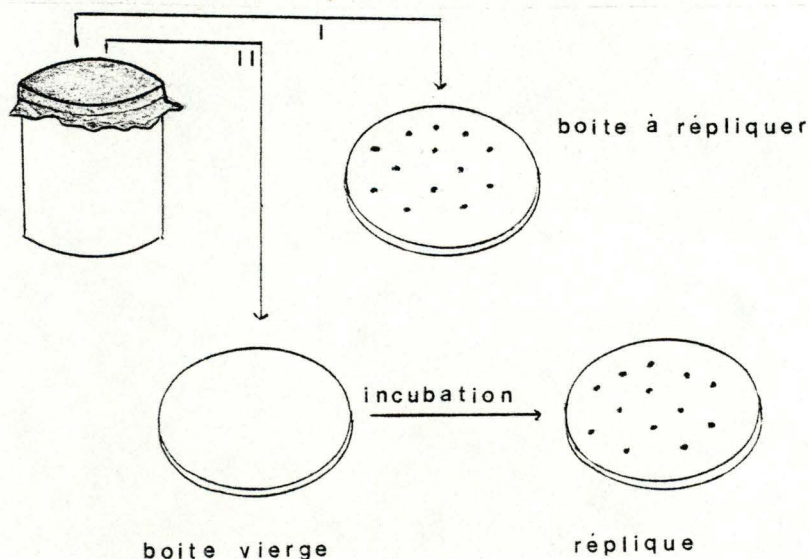


Fig.I2: Méthode de réplique sur velours

1. Application du velours sur la boîte à répliquer
2. Application d'une boîte vierge sur le velours.

- méthode de mise en suspension : un échantillon de la colonie est mis en suspension dans l'eau (pour les détails techniques, voir Matériel et Méthodes). Des aliquots sont prélevés et déposés sur les boîtes à ensemercer.

Le gros avantage de cette méthode est de permettre de déposer sur les boîtes à comparer des quantités statistiquement égales de cellules. La comparaison des croissances est donc beaucoup plus précise, ce qui est nécessaire étant donné les variations assez fortes de la thermosensibilité. C'est pourquoi nous avons choisi cette technique, malgré qu'elle soit très fastidieuse.

Résultats obtenus.

Sur les 883 souches testées, 66 ont été considérées comme non thermosensibles (elles sont répertoriées sous le signe - dans l'annexe). Toutes ne constituent pas nécessairement des révertants.

En effet, malgré la sensibilité de la méthode, certains mutants qui montrant une croissance résiduelle non stoppée sont parfois difficiles à classer. La subjectivité de l'expérimentateur entre en jeu. Des mutants ont pu être écartés cette fois alors qu'ils avaient été retenus comme thermosensibles lors de la fabrication de la banque.

5. - IDENTIFICATION DES MUTANTS DE FERMENTATION.

5.1. - Principe de sauvetage des mutants.

Sur le milieu utilisé pour isoler les mutants t^s , qui contient du glucose comme source d'énergie (milieu YPD), Saccharomyces cerevisiae réalise la fermentation alcoolique.

Mais si une des enzymes nécessaires à cette fermentation subit une mutation thermosensible, la voie biochimique restera bloquée au niveau de l'étape affectée, à 36°C, entraînant la mort de l'organisme incapable d'utiliser le glucose qui l'entoure.

Ce même organisme sera par contre capable d'utiliser l'énergie contenue dans du lactate, puisque celui-ci est respiré, et que son métabolisme énergétique n'emprunte aucune des étapes de la fermentation (fig. 11). D'un point de vue énergétique, le blocage provoqué par la mutation dans la fermentation n'a donc plus d'effet, en présence de lactate. *Donc peut croître sur lactate à 36°C.*

Mais nous avons vu que, pour survivre, l'organisme doit encore fabriquer les intermédiaires essentiels de la glycolyse comme le glucose-6-P, le 3-P-glycérate ou le P-énolpyruvate.

A partir du lactate, ceci se réalise par gluconéogenèse (fig. 11). Mais si la mutation affecte une étape réversible, donc empruntée par la gluconéogenèse, celle-ci restera également bloquée à ce niveau et les intermédiaires essentiels fabriqués en amont de cette étape ne pourront être obtenus à partir du lactate (nous parlerons d'amont et d'aval par rapport au sens de la glycolyse).

Pour survivre à 36°C, l'organisme doit donc trouver dans le milieu, en plus du lactate à partir duquel il tirera son énergie ainsi que les intermédiaires en aval de l'étape mutée, un substrat X qui intervient dans la glycolyse en amont de la mutation, de manière à fournir les intermédiaires en amont.

Le substrat X que nous avons utilisé est le glycérol : un mutant de fermentation sera donc capable de croître sur milieu YPGL (milieu avec glycérol et lactate) à 36°C. *↳ (croissance à l'analyse)*

Nous utilisons le glycérol à la place des sucres fermentables car ceux-ci ont tendance à inactiver les enzymes de la gluconéogenèse.

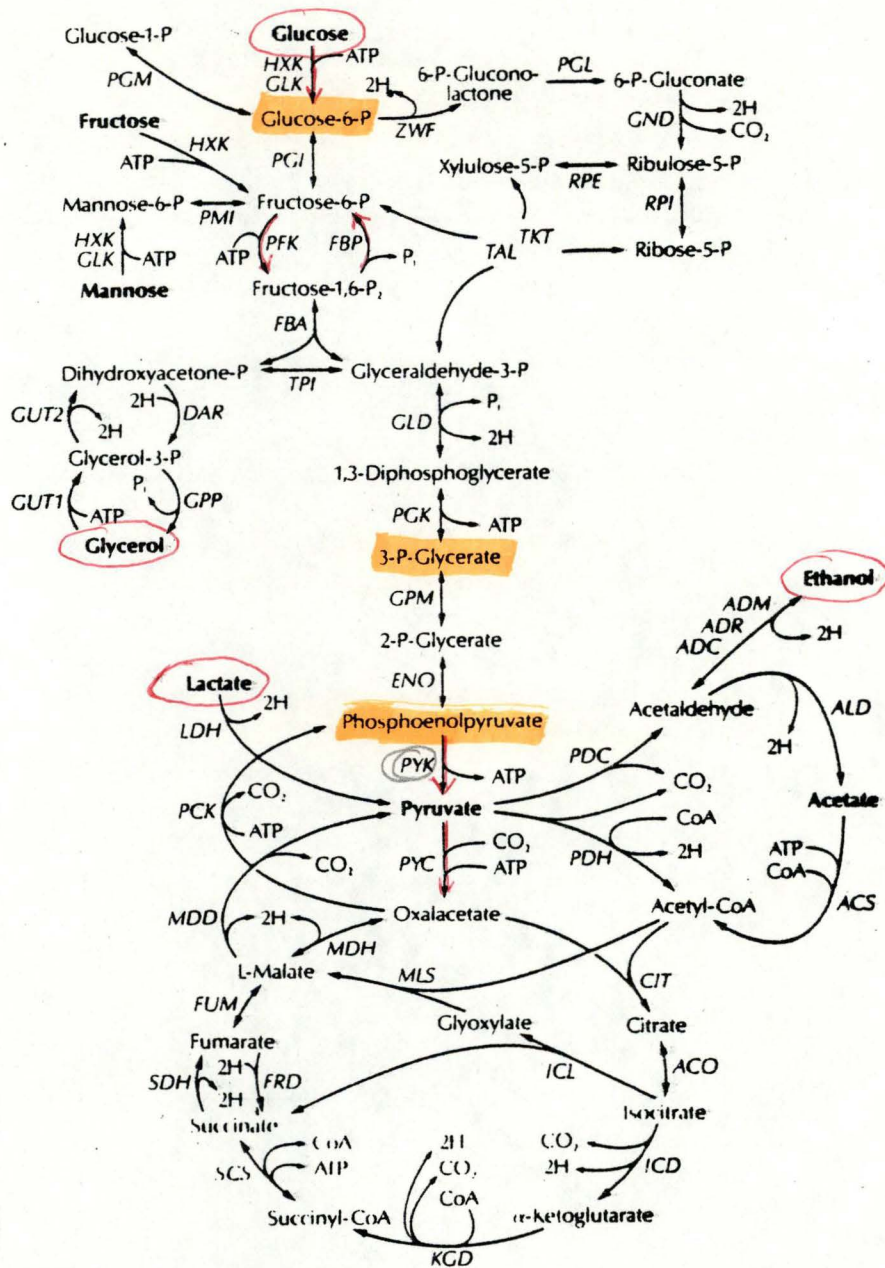


Fig 13: Métabolisme énergétique de *Saccharomyces cerevisiae*: fermentation et cycle de Krebs (58).
 Pour les symboles: voir annexe 2.

5.2. -Mutants identifiables.

Nous allons passer en revue les étapes de la fermentation du glucose en éthanol, et nous demander, pour chacune d'elles, si une mutation survenant à cette étape donnera un mutant détectable par notre méthode (voir fig. 13).

- Le cellule doit toute d'abord faire passer le glucose du milieu externe vers son cytoplasme. Le mécanisme de transport impliqué peut lui-même subir des mutations qui empêchent donc cette préhension du glucose par l'organisme. Le lactate et le glycérol sont des molécules nettement plus petites que le glucose et n'utilisent certainement pas le même mécanisme d'entrée que celui-ci (45, 57).

Lors de leur identification de mutants de fermentation par la même méthode, Ciriacy et Breitenbach avaient d'ailleurs identifié un certain nombre de mutants de préhension du glucose (56).

- Mutants de phosphorylation du glucose. Trois enzymes peuvent réaliser cette étape : la GLK, spécifique au glucose, et les HXK1 et HXK2 qui peuvent également phosphoryler le fructose ou le mannose. L'existence de ces trois enzymes rend très hautement improbable l'existence d'un mutant pour cette étape.

Un tel mutant serait toutefois repérable par la méthode employée car, d'une part l'étape est irréversible, et d'autre part, même si elle ne l'était pas, le glucose-6-P, qui est l'intermédiaire essentiel le plus en amont, serait obtenu de toute façon.

Phospho-glucose isomerase

- Mutants de la PGI. Cette étape est réversible : la PGI est donc utilisée pour la glycolyse et pour la gluconéogenèse.

Au vu du mécanisme de la thermosensibilité (déstabilisation — changement de conformation à haute température — perte d'activité), on peut considérer que le blocage se fera sentir aussi bien dans le sens glycolyse que dans le sens gluconéogenèse.

Or, cette étape se déroule en amont de l'intervention du glycérol dans la glycolyse. On ne pourra donc pas, dans ce cas, obtenir le glucose-6-P indispensable et le mutant ne pourra être sauvé.

- Mutants de PFK. L'étape est irréversible : la gluconéogenèse utilise une enzyme différente, la FBP. Le sauvetage d'un tel mutant est donc possible en principe. Cependant, ces mutants, même s'ils accumulent des hexoses monophosphates à partir du glucose, gardent un métabolisme suffisant pour survivre (58, 59). Dans ce cas, un tel mutant

Phospho-Fruktokinase

Fruktose Diphosphatase

ne serait pas sélectionné comme thermosensible et ne se trouve donc probablement pas dans la banque testée.

- - Mutants de FBA. L'étape est réversible et se situe en amont de l'intervention du glycérol dans la glycolyse. Comme pour les mutants de PGI, de tels mutants ne sont donc en principe pas identifiables par notre méthode.

D'autre part, il est possible que plusieurs isoenzymes existent (58, 60), ce qui rendrait très improbable la présence d'un tel mutant dans notre banque.

- - Mutants de la TPI. Lorsqu'un tel mutant fermente le glucose, la consommation d'ATP est égale à la production d'ATP, car seulement la moitié des trioses obtenus par clivage du fructose 1-6 BP servent à faire de l'ATP. Ceci explique qu'un tel mutant ne pousse pas sur milieu YPD, mais est sauvé sur milieu YPGL.

- - Mutants pour les étapes venant du glyceraldéhyde-3-P jusqu'au phosphoénolpyruvate. Tous ces mutants peuvent être sauvés, les intermédiaires étant obtenus soit à partir du lactate, soit à partir du glycérol, les étapes étant réversibles.

- - Mutants de la pyruvate kinase. Cette étape est irréversible : la gluconéogenèse se fait par transformation du pyruvate en oxaloacétate par la PYC (voie anaplérotique), oxaloacétate qui est transformé en phosphoénolpyruvate par la PCK (gluconéogenèse). Le sauvetage de ces mutants ne pose donc pas de problème.

→ - Mutants de transformation du pyruvate en éthanol. Nous savons que ces deux dernières étapes de la fermentation, si elles n'apportent rien d'un point de vue énergétique, sont indispensables pour la régénération de la NAD. Un mutant à ce niveau sera donc incapable de survivre sur milieu YPD car la respiration est réprimée par le glucose (effet Crabtree) et ne suffit pas pour permettre la survie de cet organisme.

Sur milieu YPGL par contre, l'organisme peut respirer et ainsi régénérer la NAD indispensable.

Nous pouvons donc par notre méthode identifier les mutants pour la PDC. L'existence d'un mutant pour l'ADH est très improbable, étant donné l'existence de trois isoenzymes (ADC, ADR et ADM).

5.3. - Résultats obtenus.

Nous savons que la technique de réplification par mise en suspension des cellules et prélèvement d'aliquots est la

meilleure pour faire des comparaisons de croissance. Du fait de sa lenteur, elle ne se prête toutefois pas à l'identification d'un grand nombre de mutants. C'est pourquoi, nous avons utilisé une méthode dérivée de la méthode de répliation sur velours, mais plus rapide car elle ne nécessite pas le nettoyage et la stérilisation en autoclave des tissus entre chaque utilisation : c'est la méthode du "réplicateur à clous" (voir Matériel et Méthodes).

Les résultats obtenus au premier test étaient surprenants : environ 200 mutants semblaient être sauvés (soit 25% !) après trois à quatre jours de croissance.

Le test a donc été recommencé par la même méthode, mais en surveillant régulièrement la croissance, ce qui a permis d'expliquer ce nombre très élevé de mutants apparemment sauvés.

En effet, le réplicateur à clous ne permet pas de déposer sur la boîte un film très mince de cellules, mais dépose en fait une quantité beaucoup plus importante. Or, comme nous le savons, un certain nombre de mutants présentent encore, à 36°C, une croissance résiduelle relativement importante. Si une quantité trop élevée de cellules d'un tel mutant est déposée, on aura l'impression que le mutant est sauvé, alors que ce n'est que la croissance résiduelle normale qui est observée. Le nombre de 200 mutants est donc surestimé.

Le test par le réplicateur à clous n'est donc pas suffisamment précis à lui seul, mais permet néanmoins de réaliser une première sélection de mutants parmi lesquels se trouvent les mutants de fermentation.

Au lieu de tester toute la banque par mise en suspension, il nous suffit dès lors de tester ainsi les 200 mutants sélectionnés par le réplicateur à clous.

Nous avons ainsi identifié 61 mutants sauvés sur milieu YPGL.

De plus, 8 mutants semblaient être sauvés, mais présentaient encore une croissance résiduelle assez forte sur milieu YPD (voir détails en annexe).

constater que certaines morphologies des mutants cdc diffèrent très fort de la morphologie normale de Saccharomyces cerevisiae.

6.1. -Phénotypes caractéristiques et techniques d'identification.

En 1970, Hartwell a identifié quelques mutants cdc en photographiant, à intervalles de temps réguliers, des cellules placées en culture sur milieu solide en conditions restrictives. Les photographies montrent ainsi très clairement l'évolution de chaque cellule au cours du temps, qui mène pour chacune d'entre elles à une même morphologie caractéristique (52).

Certains mutants ainsi repérés ont fait l'objet d'une légère sonication après culture en milieu liquide en conditions restrictives. Les cellules ainsi séparées ont été observées au microscope et classées en fonction de la relation Volume du bourgeon/Volume de la cellule mère. Un histogramme de fréquence a ainsi été réalisé (fig. 15).

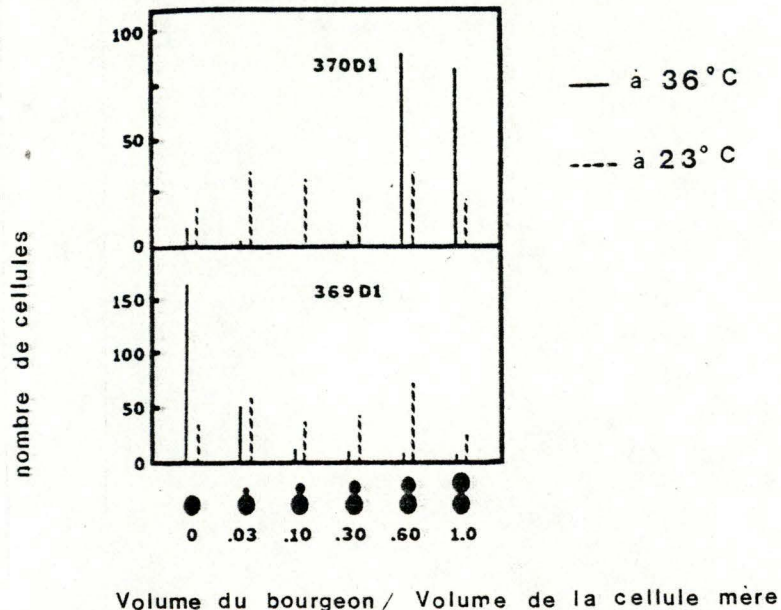


Fig. 15 : Distribution des cellules en fonction du volume bourgeon/ cellule mère après incubation à 23°C et à 36°C pour les mutants 370D1 et 369D1 de Hartwell (51).

A 23°C, on observe une distribution homogène pour l'ensemble des classes : les cellules observées se trouvent à divers stades du cycle.

Par contre, pour les deux mutants observés à 36°C, on constate que la distribution est fortement déplacée: la plupart des cellules observées se trouvent bloquées au même stade du cycle et le rapport Volume du bourgeon/Volume de la cellule mère est donc semblable pour toutes ces cellules. Cette technique montre très bien l'homogénéité morphologique caractéristique des mutants cdc.

Dans le but d'observer l'état du noyau dans les cellules

bloquées, Hartwell et al ont également réalisé une coloration du noyau sur ces mutants.

En 1973, une méthode différente a été employée pour identifier des mutants cdc (53). Après culture à 23°C en milieu liquide et transition à 36°C en phase exponentielle de croissance, les cellules étaient traitées à la glusulase, extrait d'estomac d'escargot qui a la faculté de digérer la paroi dont est entourée la levure. Ceci permettait de séparer radicalement toutes les cellules qui n'étaient plus maintenues entre elles par des ponts cytoplasmiques. Ces cellules traitées étaient alors observées au microscope et les mutants cdc étaient sélectionnés sur base de l'homogénéité morphologique.

La coloration des noyaux des mutants ainsi identifiés a permis de mettre en évidence, dans la plupart des cas, une homogénéité de la morphologie nucléaire également.

Ces divers techniques ont permis d'observer plusieurs phénotypes caractéristiques des mutants cdc (fig. 16), liés à la séquence des événements (fig. 17).

Au début du cycle, les centrioles émettent des prolongements qui vont s'allonger pour finalement aboutir à la duplication des centrioles.

Si un blocage survient tout au début du cycle, avant même la formation des prolongements des centrioles, les cellules stoppent immédiatement leur croissance, sans former de bourgeons. Ceci correspond au phénotype A (mutants cdc 1, cdc 19, cdc 25, cdc 29, cdc 33, cdc 35). Une mutation peut survenir juste après la formation des prolongements : dans ces cas, la croissance continue mais la cellule est incapable de former un bourgeon. Des excroissances vont donc se former, qui peuvent même se ramifier (phénotype B : mutants cdc 22, cdc 26, cdc 28, cdc 32, cdc 37, cdc 38, cdc 39°).

A ce stade du cycle, plusieurs chaînes d'événements se séparent et se déroulent indépendamment l'une de l'autre.

Une de ces chaînes conduit à la formation du bourgeon. Un mutant dans cette chaîne montrera des cellules multinucléées car, bien que le bourgeon ne se forme plus, la croissance, la répllication du DNA et la division nucléaire continuent (phénotype C : mutants cdc 24, cdc 42, cdc 43).

Chez certains mutants, les centrioles se dupliquent, mais leur séparation ne se fait pas. Il n'y a pas de formation du fuseau, et donc pas de division nucléaire. La cellule peut par contre bourgeonner et continue sa croissance, ce qui mène à une cellule avec plusieurs bourgeons en croissance, mais mononucléée (phénotype D : mutants cdc 4 et cdc 34).

cdc gene number	prototype phenotype
1,19,25,29	A
22,28,32	B
24	C
4	D
2,6,7,8,9,13,16,17,20,21,23,26,30	H
14,15,27,31	J
5,18	K
3,10,11,12	M

Fig 16. Phénotypes caractéristiques des mutants cdc. Les nombres correspondent aux numéros des gènes cdc, les lettres aux phénotypes correspondants(53).

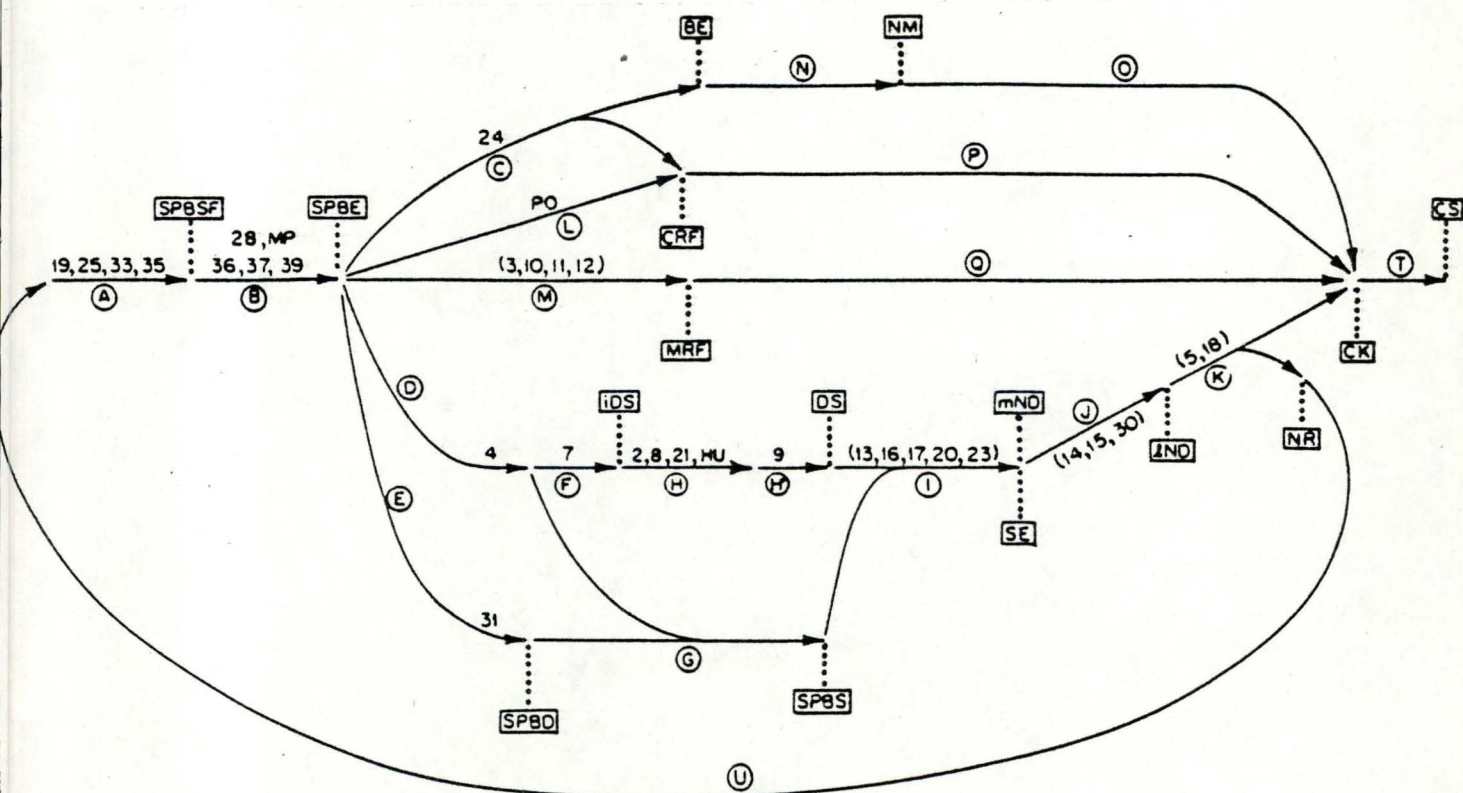


Fig 17. Séquence des évènements du cycle de division de *Saccharomyces cerevisiae*. Les nombres représentent les numéros des gènes cdc impliqués à chaque stade. Les lettres entourées d'un cercle représentent le phénotype correspondant, et celles entourées d'un rectangle symbolisent l'évènement du cycle(50).

La voie du cycle qui mène à la réplication du DNA et la division nucléaire implique de nombreux gènes. C'est ainsi que de nombreuses mutations peuvent empêcher la division du noyau : la cellule se divise tout de même, mais les deux cellules filles restent attachées par un pont cytoplasmique car elles doivent se partager le noyau unique (phénotype H : mutants cdc 2, cdc 6, cdc 7, cdc 8, cdc 9, cdc 13, cdc 16, cdc 17, cdc 20, cdc 21, cdc 23, cdc 26, cdc 40, cdc 44, cdc 45, cdc 46, cdc 47, cdc 48, cdc 51).

Si la mutation survient un peu plus tard dans la division nucléaire, la cellule ne se divise pas mais continue sa croissance, émettant des excroissances contenant des excroissances du noyau unique (phénotype J : mutants cdc 14, cdc 15, cdc 27, cdc 30, cdc 31).

Des mutations peuvent survenir un peu plus tard, après la division du noyau, et empêcher la division cellulaire cette fois : la cellule devient alors binucléée et bourgeonne comme si la division s'était faite. Les bourgeons continuent à grandir (phénotype K : mutants cdc 5, cdc 18).

Enfin, des mutations peuvent survenir tout à la fin du cycle : toute la division se réalise (bourgeonnement, division nucléaire, croissance du bourgeon), sauf la dernière étape que constitue la séparation proprement dite des deux cellules filles. Des cellules complexes, avec plusieurs bourgeons et multinucléées, sont ainsi obtenues (phénotype M : mutants cdc 3, cdc 10, cdc 11, cdc 12).

D'autres phénotypes ont été observés par la suite, qui ne sont pas repris sur la fig. 16.

Le mutant cdc 41 continue sa croissance sans bourgeonner, sans former d'excroissances, et sans répliquer son DNA.

Enfin, les mutants cdc 49 et cdc 50 montrent des cellules uninucléées, avec des petits bourgeons. Elles semblent continuer la croissance sans que le rapport taille du bourgeon/taille du parent en soit modifié.

6.2. -Technique d'identification utilisée.

Certaines morphologies typiques des mutants cdc sont évidentes et se repèrent facilement par simple examen en microscopie : c'est le cas des mutants multibourgeonnants ou présentant des excroissances par exemple. D'autres mutants sont cependant plus difficiles à repérer au simple examen : c'est le cas des mutants montrant le phénotype H par exemple (les deux cellules filles restent attachées par un pont cytoplasmique). En effet, l'arrêt de croissance après une seule division ne constitue pas un critère suffisant pour affirmer que l'on est en présence d'un tel mutant cdc, car

cet arrêt rapide peut être du à une thermosensibilité très marquée n'ayant rien à voir avec le cycle de division. Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un mutant cdc, il faut réaliser soit une coloration du noyau (pour mettre en évidence la non division de celui-ci), ou traiter les cellules à la glusulase (pour mettre en évidence le pont cytoplasmique entre les cellules filles).

Dans le cadre d'une étude spécifique du cycle de division cellulaire, ces techniques sont bien sûr indispensables, quoique longues à réaliser sur de nombreux mutants.

Notre travail actuel n'est pas dirigé dans ce sens, et n'a pas pour but d'identifier tous les mutants cdc existant dans la banque.

Notre but est de trouver des techniques suffisamment simples et rapides pour permettre de réaliser un premier triage d'une banque de mutants de taille assez importante.

Il est donc nécessaire pour nous de réaliser un compromis entre la rapidité de la méthode et la possibilité qu'elle offre d'identifier le plus de mutants cdc possible.

Le traitement à la glusulase, méthode certainement la plus efficace, est à rejeter pour nous car elle nécessite, outre les cultures, de soumettre les cellules à divers traitements nécessitant des lavages (et donc plusieurs centrifugations) et est donc très longue (53).

La méthode que nous avons utilisée est en fait dérivée de la méthode des photographies à intervalle de temps, utilisée par Hartwell en 1970 (52). Chaque souche à tester fait l'objet d'une culture en milieu YPD liquide à 23°C, de manière à l'amener en phase exponentielle de croissance (après environ 12 heures). Un échantillon de la culture est dilué 10 x et soumis à une sonication légère visant à séparer les cellules. Une goutte est prélevée sur une anse de platine et déposée sur milieu YPD solide préchauffé à 36°C. La dilution 10 x permet d'obtenir une concentration de cellules convenable. Une grille de nylon de taille suffisante pour couvrir la colonie est déposée sur celle-ci. Elle servira principalement à permettre le repérage d'une même région de la colonie, de manière à photographier les mêmes cellules après différents temps de croissance. Elle facilite également le repérage des colonies sur la boîte de Petri, celles-ci n'étant pas très visibles, vu le petit nombre de cellules déposées.

A partir de cette situation, deux procédés sont possibles :

- soit on choisit une région de cellules et on la photographie après différents temps de croissance, de manière à suivre l'évolution des cellules au cours du temps : c'est la méthode de photographies à intervalles;

- soit les colonies sont laissées quelques heures à 36°C, puis simplement observées, sans réaliser de photographies. C'est de cette manière que nous avons repéré des mutants cdc dans notre banque.

Cette méthode nous permettait ainsi de repérer les mutants cdc ayant un phénotype très caractéristique telles que cellules à excroissance ou cellules multibourgeonnantes (les phénotypes B, D, J, M décrits précédemment). Nous espérons également pouvoir ainsi identifier un certain nombre de mutants bloqués dès le début du cycle (phénotype A), ou bloqués après une division (phénotype H : doublets de cellules reliées par un pont cytoplasmique).

Pour ce faire, il était nécessaire que, au temps 0 (c'est-à-dire le moment où les cellules sont déposées sur la boîte de Petri), les cellules soient le mieux séparées possible, ce qui était obtenu par une sonication légère de la culture liquide.

6.3. -Mise au point de la sonication.

Pour déterminer la dose d'ultra-sons à laquelle les cellules devaient être soumises, nous avons réalisé 5 cultures à partir de 5 mutants t^s choisis au hasard (t^s_{84} , t^s_{273} , t^s_{479} , t^s_{521} , t^s_{651}).

Après 12 heures de culture à 23°C, 12 échantillons de chaque culture étaient prélevés, dilués 10 x et soumis à des sonications de plus en plus fortes en temps d'exposition et en puissance (voir fig. 18).

Temps d'exposition(sec) Puissance (Watts)	5 secondes	15 secondes	30 secondes
50000	E1	E2	E3
60000	E4	E5	E6
70000	E7	E8	E9
80000	E10	E11	E12

Fig.18: Mise au point de la sonication. Chaque échantillon est soumis à la sonication au temps et à la puissance indiqués.

E1, ..., E12 : échantillons 1 à 12 de chaque souche t^s_{84} , t^s_{273} , t^s_{479} , t^s_{521} , t^s_{651} .

Les cellules étaient alors placées sur milieu YPD solide à 23°C et la séparation contrôlée par observation au microscope, de même que la viabilité, après quelques heures d'incubation à 23°C. Il est apparu tout de suite que toutes les colonies ne présentaient pas le même comportement face à la sonication (nous l'avons remarqué : voir variations de la thermosensibilité), que ce soit du point de vue séparation des cellules, ou du point de vue mortalité.

Idéalement, il faudrait donc déterminer la meilleure dose d'ultra-sons pour chaque souche, ce qui est bien entendu impensable dans le cadre de notre travail.

Le traitement choisi est donc un compromis : dans un certain nombre de cas, les cellules ne seront pas bien séparées.

Nous avons ainsi choisi de soniquer toutes les souches à une puissance comprise entre 65.000 et 70.000 W pendant 15 secondes. Une puissance supérieure risquerait d'entraîner trop de mortalité. Un temps d'exposition supérieur ne semble pas provoquer une meilleure séparation.

6.4. -Résultats obtenus.

Comme nous pouvions nous y attendre, la simple observation des cellules après quelques heures de croissance nous a révélé un certain nombre de mutants (40 mutants répertoriés sous le signe cdc dans l'annexe) de morphologie très particulière, immédiatement reconnaissable. La photo 7 montre un mutant non cdc, de morphologie normale pour Saccharomyces cerevisiae (cellules rondes ou ovales).

Photo 7: Morphologie normale de Saccharomyces cerevisiae.

Les photos 8 à 13 par contre montrent des mutants cdc typiques: cellules avec des excroissances, à bourgeons multiples.

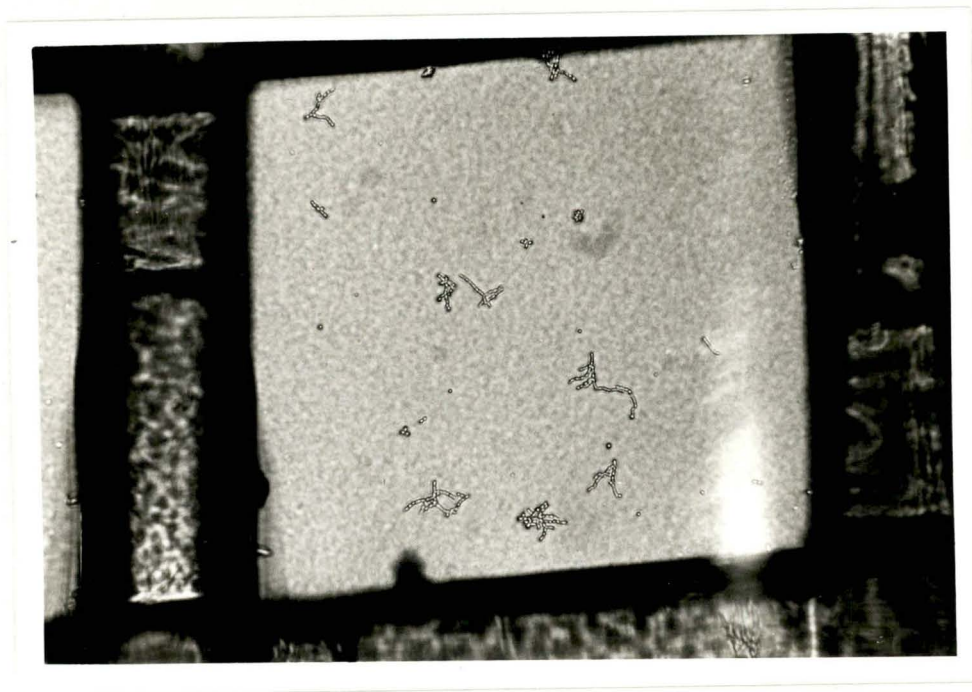


Photo 8. Mutant t^S 48I après 8 heures d'incubation à 36°C.
Grossissement: 80X.



Photo 9. Mutant t^S 33 après 6 heures d'incubation à 36°C.
Grossissement: 320 X.

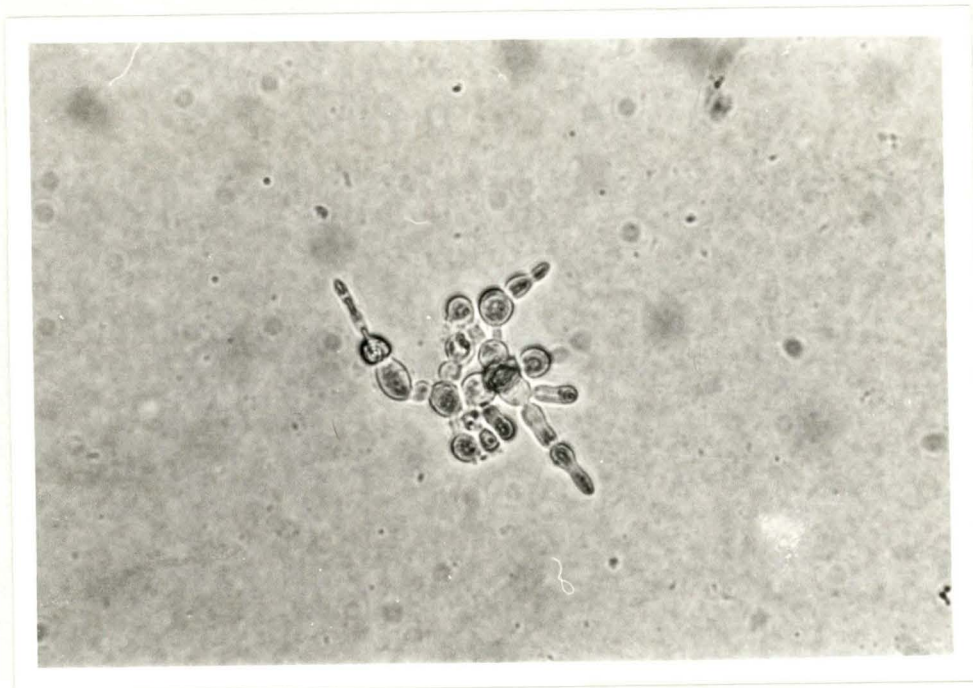


Photo IO. Mutant t^S 855 après 6 heures d'incubation à 36°C.
Grossissement 320x.

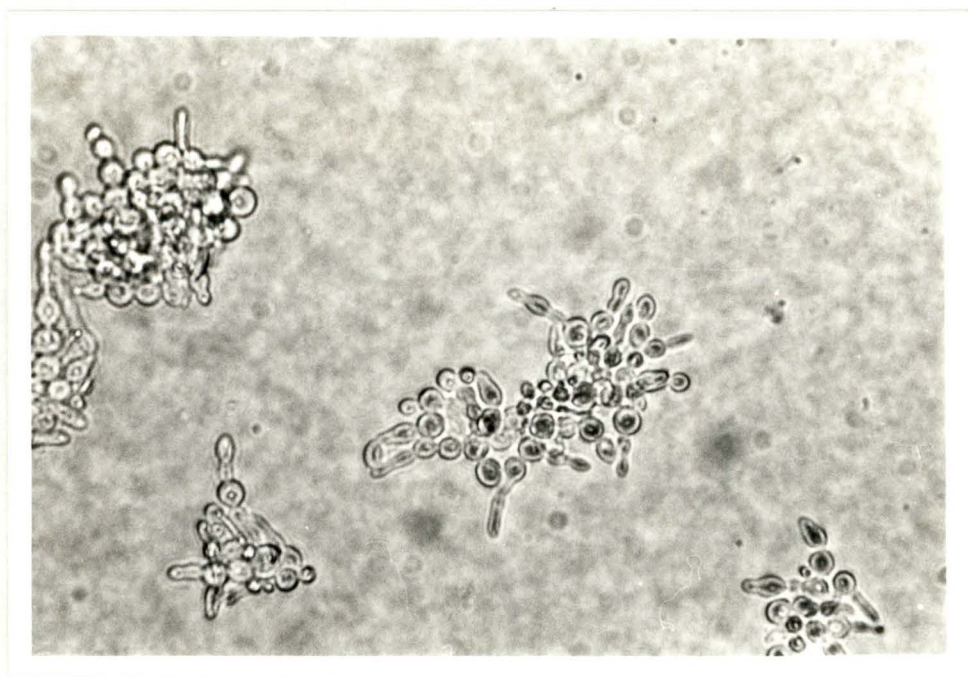


Photo II. Mutant t^S 100 après 36 heures d'incubation à 36°C.
Grossissement 320x.

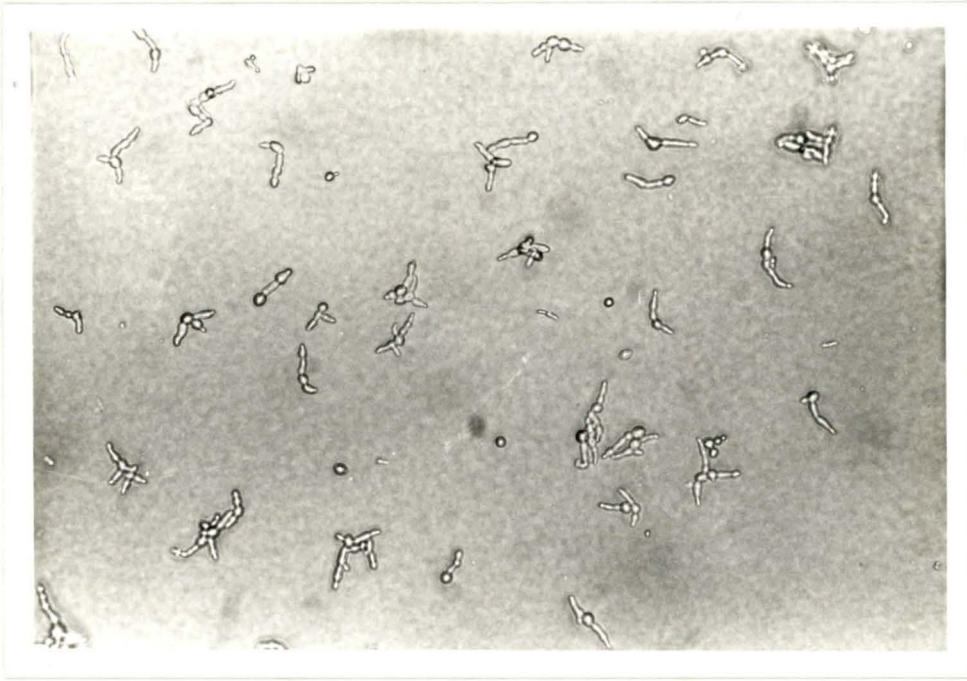


Photo 12. Mutant $t^s 12$ après 8 heures d'incubation à 36°C .
Grossissement 128x.

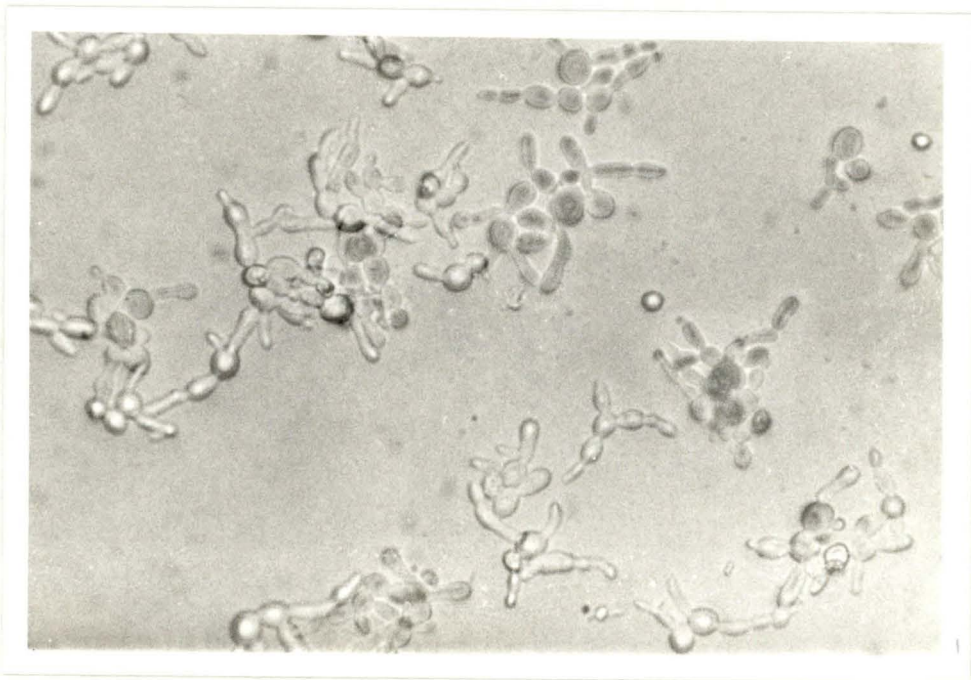


Photo 13. Mutant $t^s 62$ après 6 heures d'incubation à 36°C .
Grossissement 320x.

Sur des mutants aussi caractéristiques, nous avons réalisé des photos à intervalle de temps, les photos étaient prises au temps 0, puis après 2 heures, 4 heures, 6 heures et enfin 24 heures de croissance à 36°C.

La série I montre l'évolution de la souche sauvage D585-11C dans ces conditions.

Ia. Souche D585-11C
au moment 0.

Ib. Souche D585-11C
après 2 heures.

Série I: Photos à intervalle de la souche sauvage D585-11C à 36°C (a,b,c,d,e: suite page suivante).

Ic. Souche D585-11C
après 4 heures à
36°C.
G. 80x.

Id. Souche D585-11C
après 6 heures à
36°C.
G. 80x.

I.e. Souche D585-11C
après 24 heures
à 36°C.
G. 80x.

La série II montre l'évolution d'un mutant cdc présentant un phénotype "à excroissance". Les photos II f, II g et II h sont des détails après 4 heures, 6 heures et 24 heures de croissance.

II a. Mutant t^{S14} au
moment 0.
G. 80x.

II b. Mutant t^{S14} après
2 heures à 36°C.
G. 80x.

Série II: Photos à intervalles du mutant t^{S14} à 36°C
(II a, b, c, d, e, f, g, h: voir aussi pages suivantes.)
La croissance est très ralentie par rapport
au sauvage.

I Ic. Mutant t^{S14} après
4 heures à 36°C.
G. 80x.

II d. Mutant t^{S14} après
6 heures à 36°C.
G. 80x.

II e. Mutant t^{S14} après
24 heures à 36°C.
G. 80 x.

II f. Détail du mutant
t^s14 après 4
heures à 36°C.
G. 320x.

II g. Détail du mutant
t^s14 après 6
heures à 36°C.
G. 320x.

II h. Détail du mutant
t^s14 après 24
heures à 36°C.
G. 320x.

On constate ici que la croissance est stoppée ou en tout cas très ralentie par rapport à l'organisme sauvage.

Dans d'autres cas, nous avons observé des mutants ayant un phénotype du même ordre, mais qui gardent une croissance beaucoup plus importante.

Sur la série III, on constate, après 24 heures, l'existence d'amas de cellules à excroissances, enchevêtrées.

IIIa. Mutant t^{S62} au
moment 0.
G. 80x.

IIIb. Mutant t^{S62}
après 2 heures
à 36°C.
G. 80x.

Série III: Photos à intervalles du mutant t^{S62} à 36°C
(IIIa, b, c, d, e: suite page suivante).
La croissance continue jusqu'à former des
enchevêtrements de cellules.

IIIc. Mutant t^S62
après 4 heures
à 36°C.
G. 80x.

IIId. Mutant t^S62
après 6 heures
à 36°C.
G. 80x.

IIIe. Mutant t^S62
après 24 heures
à 36°C.
G. 80x.

Sur la série IV, la croissance est même tellement forte que, après 24 heures, la différence avec l'organisme sauvage n'est pas tellement marquée. Le phénotype mutant cdc caractéristique atteste ici l'existence d'une mutation thermosensible, dont la thermosensibilité est peu marquée. Une fois encore, on peut se rendre compte de la relativité du phénomène de thermosensibilité.

IVa. Mutant t^{S100}
au moment 0.

IVb. Mutant t^{S100}
après 2 heures
à 36°C.
G. 80x.

Série IV: Photos à intervalles du mutant t^{S100} à 36°C
(IVa, b, c, d, e, f, g: suite pages suivantes).

IVc. Mutant t^{S100}
après 4 heures
à 36°C.
G. 80x.

IVd. Mutant t^{S100}
après 6 heures à
36°C.
G. 80x.

IVe. Mutant t^{S100}
après 8 heures
à 36°C.
G. 80x.

IVf. Mutant t^S après 24 heures à 36°C.
G. 80x.

IVg. Mutant t^S_{100} après 24 heures à 36°C; détail.
G. 320x.

Un autre phénomène doit également être remarqué. Nous venons de voir que certains mutants formant des excroissances sont capables de grandir très fort au point de former des colonies visibles à l'oeil nu (série IV).

Or, si l'on observe la photo 13 qui est un détail de la photo 14 représentant un autre mutant de même type après 24 heures d'incubation à 36°C, on observe, indiquées par des flèches, des cellules aux contours flous, dont les limites semblent même disparaître. Il s'agit en fait de traces de cellules ayant lysé ou en train de lyser. On pourrait penser que ces cellules lysant parce qu'incapables de se diviser mais continuant à croître et formant pour cela des excroissances ne peuvent continuer à grandir à l'infini, et finissent par lyser. Mais dans ce cas, il faudrait expliquer pourquoi le mutant t^S100 par exemple (série IV) peut, lui, grandir de la sorte.

Il est possible d'autre part que les mutants pour lesquels une lyse est observée soient sujets à une certaine osmosensibilité (voir 5.2.4. : les mutants osmosensibles), alors que les autres ne le sont pas. Cette hypothèse pourrait être testée en réalisant le même test sur la souche t^S216 sur un milieu à forte osmolarité (YPD + 10% sorbitol) à condition toutefois que l'osmolarité du milieu ne corrige pas la thermosensibilité en confortant la structure mutée dans sa conformation active. Si cela n'est pas et si l'hypothèse de l'osmosensibilité est juste, les cellules ne devraient plus lyser après exposition à 36°C.

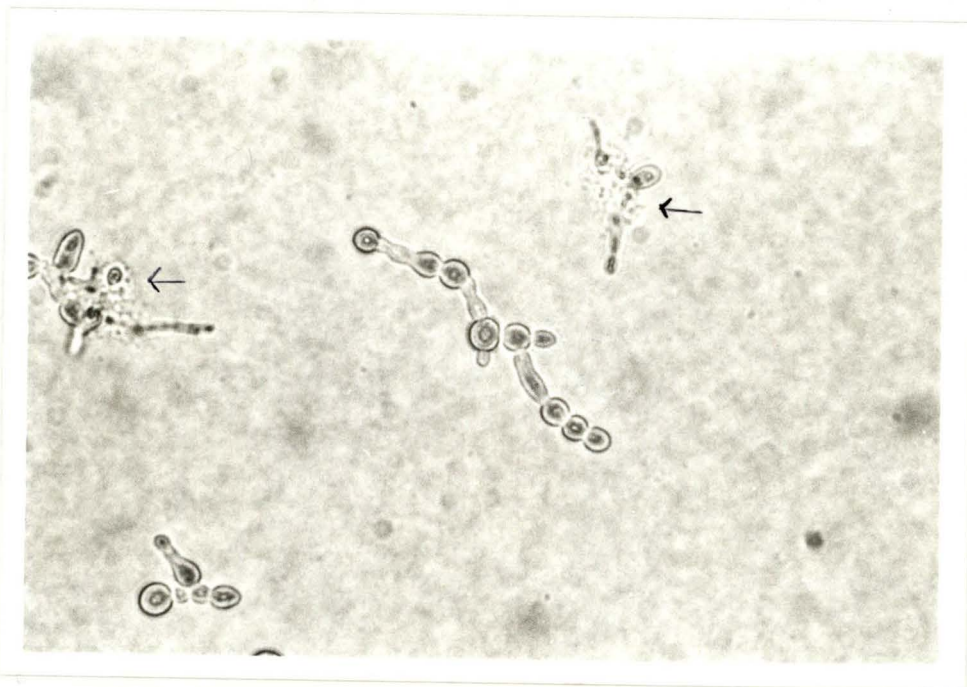


Photo 13. Mutant t^S216 après 24 heures à 36°C.
Les flèches indiquent les zones de lyse cellulaire.
G. 320x.

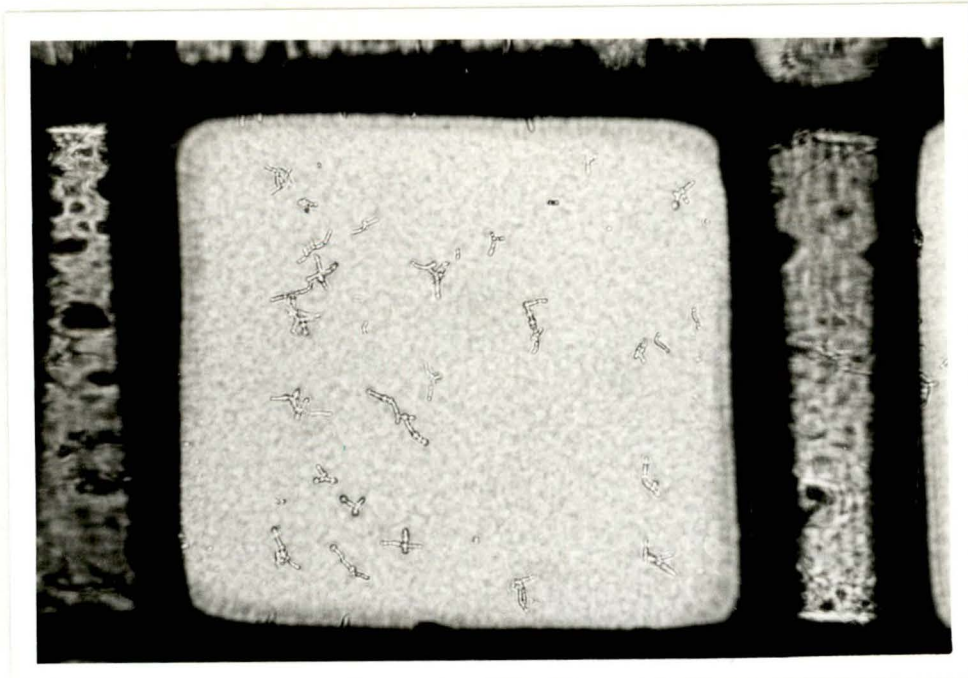


Photo 14: Mutant t^{S216} après 24 heures à 36°C .
La zone encadrée est détaillée sur la photo 13.
G. 320x.

Outre ces mutants montrant des excroissances à 36°C , nous espérons pouvoir identifier des mutants cdc de phénotype A (pas de division) ou H (une seule division).

Nous avons pu en effet relever environ 200 mutants dont la croissance est stoppée immédiatement : malheureusement, il est difficile, par la méthode de simple observation utilisée de savoir si cet arrêt de croissance est du à une mutation cdc ou simplement à une thermosensibilité très marquée.

Ce que l'on peut affirmer, c'est que les mutants cdc de ce type se trouvent parmi ces 200 mutants relevés et qu'ils pourraient être identifiés par une technique plus poussée telle que traitement à la glusulase par exemple.

Un tel mutant dont la croissance est stoppée immédiatement est présenté sur la série V. Le contrôle réalisé à 23°C permet d'affirmer que les cellules n'étaient pas mortes avant d'être déposées sur la boîte.

Page suivante: Série V: Photos à intervalles du mutant t^{S97} à 36°C . La croissance est stoppée immédiatement.

Va. Mutant t^{S97} au
moment 0.
G. 80x.

Vb. Mutant t^{S97} après
2 heures à 36°C.
G. 80x.

Vc. Mutant t^{S97} après
4 heures à 36°C.
G. 80x.

Nous avons également repéré un mutant (t^S_{130}) qui présente un phénotype un peu particulier. Après mise à 36°C , ce mutant, au lieu de se diviser dans toutes les directions de l'espace et donner ainsi des amas de cellules comme cela se passe normalement, réalise quelques divisions dans une direction privilégiée, formant ainsi des chaînettes de cellules (photos 15 et 16).

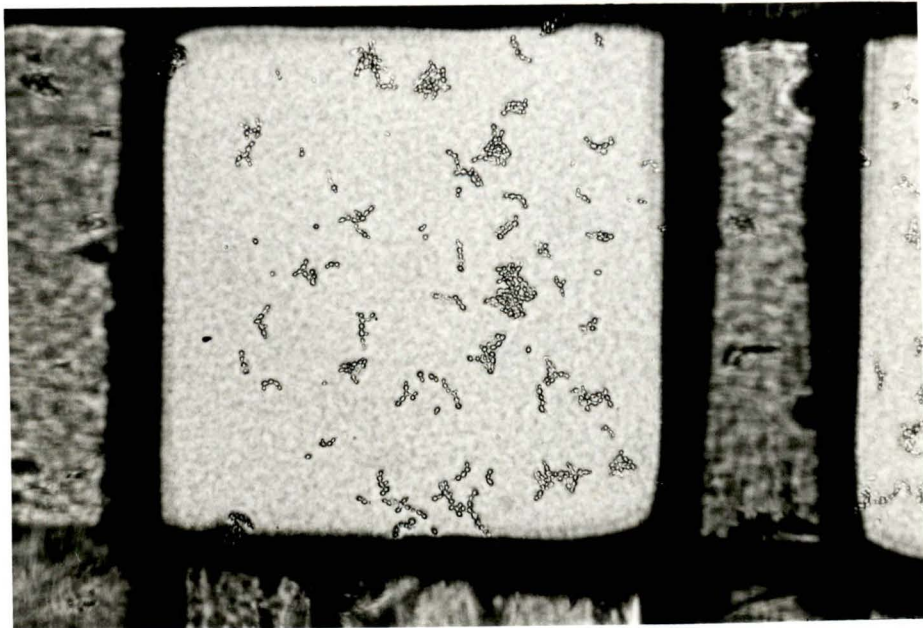


Photo 15. Mutant t^S_{130} après 20 heures à 36°C .
Les cellules forment des "chaînettes".
G. 80x.



Photo 16. Mutant t^S_{130} après 20 heures à 36°C .
G. 320x.

On observe que ces chaînettes peuvent cependant se ramifier ou se couder, prouvant ainsi que, de temps en temps, une division se réalise dans une autre direction. Ce type de mutation semble en tout cas bien affecter le cycle de division cellulaire, ce qui nous la fait classer dans les mutations cdc, momentanément en tout cas.

Un autre mutant particulier est le mutant t^S727, dont toutes les cellules lysent après quelques heures à 36°C (photos 17 et 18). Il pourrait s'agir d'une osmosensibilité très marquée, mais peut-être aussi s'agit-il d'un mutant incapable de synthétiser un constituant essentiel de sa membrane ou de sa paroi.

7. - IDENTIFICATION DE MUTANTS DE RESPIRATION.

7.1. -Principe.

Nous avons vu que, en conditions normales de croissance et en présence de glucose, une grosse partie de l'énergie nécessaire à la levure est fournie par la fermentation, alors que la respiration est réduite, malgré son rendement énergétique bien meilleur.

Par contre, on peut penser que plus on s'éloigne des conditions optimales de croissance (élévation de la température par exemple), plus la levure a besoin de la respiration pour satisfaire à ses besoins.

Si l'on admet cette hypothèse, il est possible que, dans la banque, se trouvent des mutants de respiration qui meurent à 36°C car, à cette température, la respiration est nécessaire pour la survie.

Les mutants de respiration sont assez faciles à identifier : il suffit de comparer la croissance à 23°C sur un milieu contenant un substrat fermentable d'une part (milieu YPD) et sur un milieu contenant un substrat respiratoire d'autre part (milieu YPG : le glycérol est la seule source d'énergie). Les mutants de respiration pourront donc former des colonies sur le milieu YPD grâce à la fermentation, mais pas sur YPG (puisque la fermentation du glycérol donne un bilan énergétique nul et que sa respiration est rendue impossible suite à la mutation).

7.2. -Résultats obtenus.

La banque entière a donc été testée selon ce principe par la méthode du répliqueur à clous. Nous avons ainsi repéré 62 mutants qui poussaient moins bien ou pas du tout sur le milieu respiratoire YPG.

Nous avons ensuite retesté ces 62 mutants par la méthode de mise en suspension des cellules, de manière à observer plus finement la croissance. Nous avons ainsi retenu 15 mutants

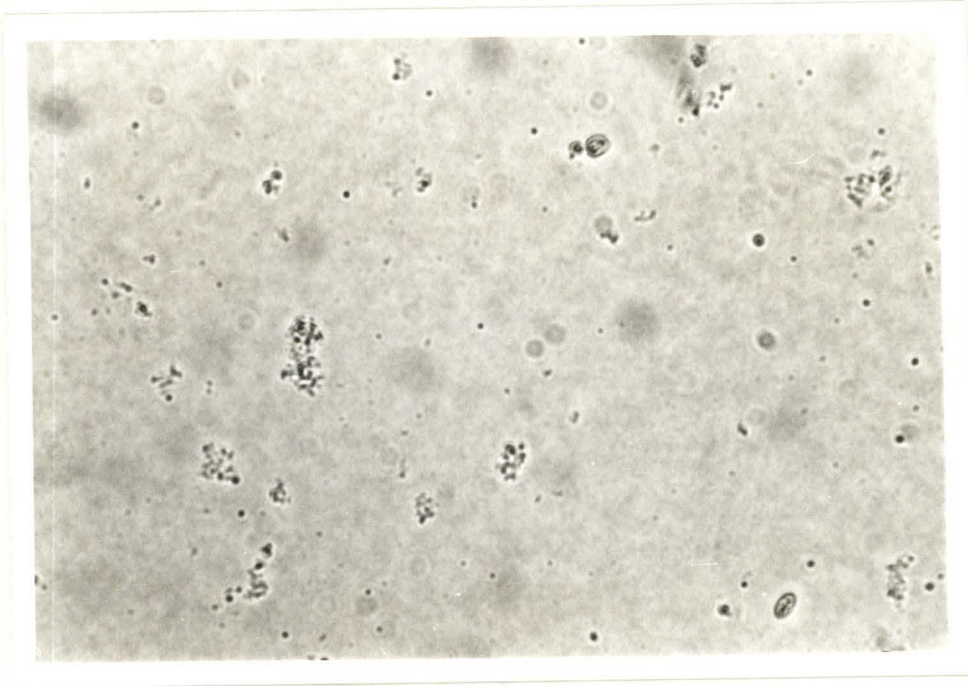


Photo 17: Mutant $t^S 727$ après 12 heures d'exposition à 36°C .
Toutes les cellules sont lysées.
G80x.

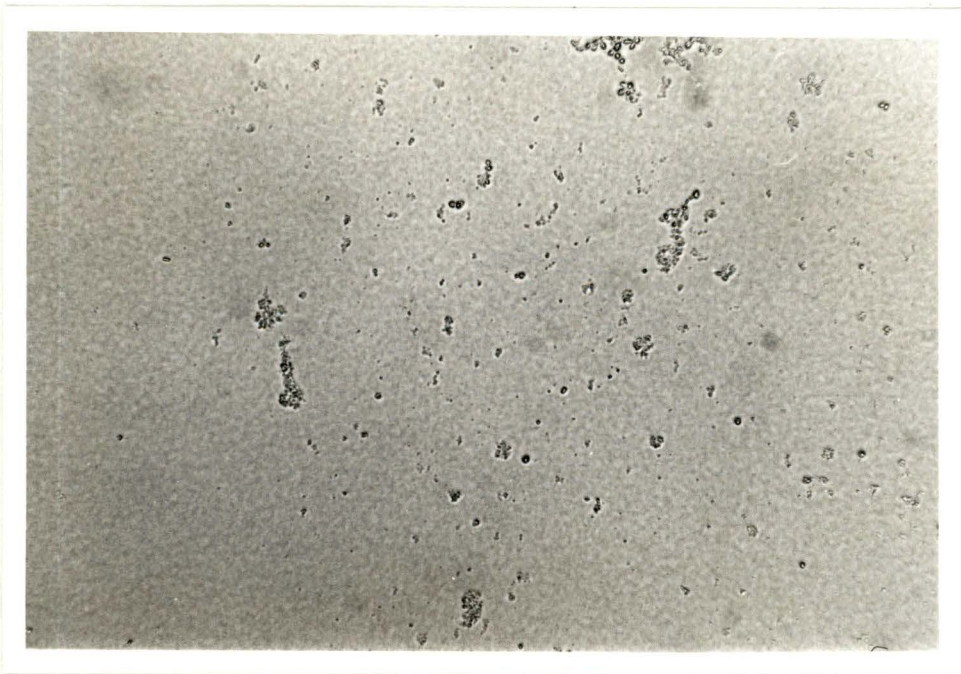


Photo 18: Mutant t^S après 12 heures d'exposition à 36°C .
G 80x.

(répertoriés dans l'annexe) que nous considérons ainsi comme des mutants de respiration.

L'existence de ces mutants tend donc à étayer notre hypothèse de départ selon laquelle la levure a besoin de la respiration pour survivre à 36°C alors qu'elle survit très bien grâce à la fermentation à des températures plus basses (23°C).

Nous avons donc affaire ici à un type particulier de mutants : la mutation n'est pas vraiment thermosensible d'après le mécanisme expliqué (déstabilisation de la structure à haute température) et elle s'exprime à 23°C comme à 36°C. Mais les effets sont tragiques à 36°C et non à 23°C.

Nous retrouvons donc ici la relativité de la notion de gène essentiel, notion liée entièrement aux conditions de l'environnement.

**CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES**

1. - CONSIDERATIONS SUR LE CRIBLAGE D'UNE BANQUE DE MUTANTS THERMOSENSIBLES.

Dans l'optique d'un premier criblage visant à dégrossir quelque peu une banque de mutants thermosensibles, nous avons vu qu'une technique de réplification rapide et sensible était indispensable (identification des mutants de fermentation et de respiration pour nous).

Nous avons ainsi pu constater que la technique de mise en suspension des cellules est très précise, mais lente, alors qu'au contraire, le technique du réplicateur à clous est très rapide, mais moins précise. En ce qui nous concerne, nous avons donc concilié les deux méthodes : une première sélection réalisée par le réplicateur à clous était ensuite retestée par mise en suspension des cellules.

A l'avenir, un réplicateur à clous quelque peu modifié pourra être utilisé : les clous à tête plate seront remplacés par des clous à tête ronde. Les clous ne seront pas appliqués directement sur les colonies, mais plongés dans des suspensions cellulaires de celles-ci.

Chaque tête ronde retiendra ainsi une goutte qui sera déposée sur une boîte vierge. Cette méthode garde donc la précision de la mise en suspension cellulaire, mais est plus rapide.

Lorsqu'il s'agit de comparer des croissances, il faut considérer la relativité du phénomène de la thermosensibilité, que nous avons mise en évidence à 23°C (courbes de croissance) comme à 36°C (photographies). En effet, nous avons vu que certains mutants poussent encore à 36°C, ce qui pose certains problèmes d'interprétations indispensables à considérer.

2. - MUTANTS IDENTIFIES.

Nous avons utilisé le principe selon lequel un mutant de fermentation peut survivre à 36°C, si on lui fournit des substrats dont il pourra tirer son énergie d'une part (par la respiration), et tirer les intermédiaires essentiels aux diverses voies anaboliques d'autre part, et ce malgré la mutation.

Nous avons ainsi identifié 66 mutants de fermentation qui pourront être caractérisés plus en détail et ainsi servir de base à l'étude du métabolisme énergétique et de sa régulation chez Saccharomyces cerevisiae.

Nous basant sur l'hypothèse selon laquelle la respiration devient de plus en plus nécessaire si la levure est placée à de plus hautes températures, nous nous sommes demandé si, dans une telle banque, pouvaient se trouver des mutants de respiration. L'utilisation comme unique source d'énergie d'un substrat respiratoire (comme le glycérol par exemple), nous a ainsi permis d'identifier 15 mutants incapables de former des colonies à 23°C sur un tel milieu. Une étude plus détaillée de ces mutants et de leurs réactions vis-à-vis de la température notamment, permettra peut-être de mieux comprendre le métabolisme énergétique de Saccharomyces cerevisiae (importances et rôles respectifs de la fermentation et de la respiration notamment).

→ En nous basant sur les phénotypes des mutants cdc observés jusqu'à présent, et sur les méthodes employées jusqu'ici pour identifier ceux-ci, nous avons choisi une méthode simple pour cribler notre banque : la simple observation au microscope de la croissance des cellules à 36°C.

Cette méthode nous a permis d'identifier des mutants à phénotype très visible (bourgeons multiples, excroissances). Par contre, l'identification sûre de mutants cdc dont le phénotype ressemble au phénotype normal en simple microscopie, nécessite une méthode plus démonstrative mais plus longue (traitement à la glusulase ou coloration des noyaux au moins). La méthode que nous avons choisie ne convient donc que pour un criblage grossier de la banque.

Le mutant t^S130 nous a frappés parce qu'il semblait se diviser dans une direction privilégiée, avec de temps en temps, changement de cette direction de division. Ceci mène à la formation de "chaînettes" de cellules éventuellement ramifiées. L'explication de ce phénomène apparemment lié au cycle de division pourra être approchée par une étude de ce mutant.

Le mutant t^S727 est particulier du fait de la lyse totale des cellules après exposition à 36°C. La facilité avec laquelle on peut lyser les cellules de cette souche pourrait s'avérer très intéressante si l'on sait que la paroi de la levure est très résistante et nécessite d'employer des moyens énergiques pour lyser les cellules : broyages violents avec billes de verre, traitements à la glusulase... Ces traitements sont plus longs et plus difficiles et nécessitent toujours l'intervention d'agents extérieurs. Ici, un simple changement de température suffit.

3. - PERSPECTIVES D'UTILISATION DE LA BANQUE DANS LE CAS PARTICULIER DE LA METHYLATION DE LA COIFFE DES ARNm EUCARYOTIQUES.

Pour être exprimé, un gène eucaryotique doit d'abord être

transcrit complètement en ARNhn, qui sera alors profondément modifié avant d'être exporté vers le cytoplasme où il servira de messager pour la synthèse des protéines par les ribosomes.

L'ARNhn doit donc subir diverses étapes de maturation (61) : coiffage en position 5' (dont nous allons parler), polyadénylation en position 3', et épissage (c'est-à-dire excision des introns, régions non codantes présentes dans les gènes d'eucaryotes).

Le coiffage, qui nous intéresse ici, est donc la mise en place en position 5' de l'ARNhn d'une structure particulière appelée la coiffe (fig.19).

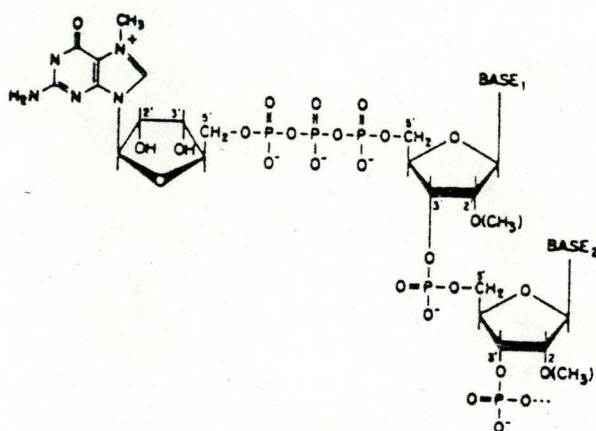
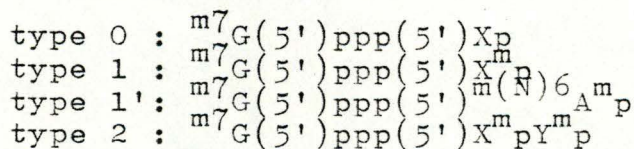


Fig.19: La structure de la coiffe d'après Shatkin(68).

Une 7-méthylguanosine est reliée au pénultième nucléotide par un pont 5'-5' triphosphate, et ceci chez tous les eucaryotes.

Par contre, la nature et le degré de méthylation du pénultième et de l'antépénultième nucléotide varient, formant ainsi divers types de coiffe :



On rencontre la coiffe de type 0 chez Saccharomyces cerevisiae et la coiffe de type 2 chez l'homme par exemple.

La coiffe est donc une structure universelle chez les eucaryotes, et que l'on rencontre aussi chez certains virus. Le tableau donne une idée de la répartition des types de coiffe

Virus	Coiffe 0	Coiffe 1	Coiffe 2	Méthylation interne
VEGETAUX				
<u>à ARN bicaténaire</u>				
WTV	N.D.	X = A	N.D.	N.D.
Virus de <i>Penicillium chrysogenum</i>	-	X = Pu, Py	-	N.D.
<u>à ARN monocaténaire</u>				
CMV	Pas de coiffe			N.D.
STNV	Pas de coiffe			-
Virus de la nécrose du tabac	Pas de coiffe			-
Virus de la mosaïque du tabac	X = G	-	-	-
Virus de la mosaïque de l'orge	X = Pu, Py	-	-	-
Virus de la mosaïque du concombre	X = Pu, Py	-	-	-
Virus de la mosaïque jaune du navet	X = G, A	-	-	-
Virus de la mosaïque de la luzerne	X = G	-	-	-
Virus X de la pomme de terre	X = G	-	-	-
BMV	X = G	-	-	-
ANIMAUX				
<u>à ADN</u>				
<u>à réplication cytoplasmique</u>				
Virus de la vaccine	-	X=A,G, $m(6)N_A$	-	-
<u>à réplication nucléaire</u>				
Adenovirus	-	-	X=A, $m(6)N_A$	$m(6)N_A, m^5C$
Virus SV 40	-	X=G, $m(6)N_A$	-	$m(6)N_A$
Virus de l'herpès	-	-	+	$m(6)N_A$
Virus du polyome	-	-	X=G, $m(6)N_A$	$m(6)N_A$
<u>à ARN bicaténaire</u>				
<u>à réplication cytoplasmique</u>				
Réovirus	-	-	X = G, Y = C	-
<u>à ARN monocaténaire</u>				
<u>à réplication cytoplasmique</u>				
Spring viremia du carpe	-	X = A	-	N.D.
Virus de la maladie de Newcastle	X = Pu, Py	-	-	-
Virus de la grippe	-	X=G, $m(6)N_A$	-	$m(6)N_A$
Virus de la stomatite vésiculeuse	-	-	X= $m(6)N_A$, Y=A	-
Virus de Dengue	-	X= $m(6)N_A$	-	-
Virus de Sindbis	X = A	-	-	m^5C
Calcivirus	Pas de coiffe			N.D.
Virus de la fièvre aphteuse	Pas de coiffe			-
Virus de l'encéphalomyocardite	Pas de coiffe			-
Poliovirus	Pas de coiffe			-
<u>à réplication nucléaire</u>				
Virus du sarcome aviaire	-	X = G	-	$m(6)N_A$
Virus de la leucose féline	-	X = G	-	$m(6)N_A$
Virus de la leucose murine	-	X = G	-	$m(6)N_A$
Virus du sarcome de Rous	-	X = G	-	$m(6)N_A$

	Coiffe 0	Coiffe 1	Coiffe 2	Méth. int.
<u>MICROORGANISMES</u>				
<i>Neurospora crassa</i>	X = A > G	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	X = A > G	-	-	-
<i>Dictyostellium discoïdes</i>	X = A > G	X = A(10%)	-	-
<u>VEGETAUX</u>				
Embryons de blé	X = Pu, Py	-	-	-
Maïs	X = Pu, Py	-	-	-
Soya	X = Pu, Py	X = Pu, Py	-	-
<u>ANIMAUX</u>				
<u>Invertébrés</u>				
Oocytes d'insectes	X = Pu, Py	-	-	-
<i>Bombyx mori</i>	-	X = A	Y = U	m(6)N _A
<i>Aedes albopictus</i>	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
<i>Artemia salina</i>	X = Pu, Py	N.D.	N.D.	N.D.
Drosophile	X = C	X = Py > Pu	Y = Pu, Py	N.D.
Oursin de mer	-	X = Pu > Py	-	m(6)N _A
<u>Vertébrés</u>				
Ovalbumine	X = A	X=A, m(6)N _A	Y = Py	N.D.
Globine de canard	-	X = Pu, Py	N.D.	-
Globine de souris	-	X=A, m(6)N _A	Y = C	-
Immunoglobuline de souris	-	X=G, m(6)N _A	Y = A	m(6)N _A
Rein de souris	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	+
Cellules L de souris	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Erythroïdes de souris	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Myélome de souris	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Hépatome de rat	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Rein de hamster	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A , m ⁵ C
Globine de lapin	-	X = m(6)N _A	Y = C	-
Rein de singe	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Globine humaine	-	X=A, m(6)N _A	Y = C	-
Cellules HeLa humaines	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Histones de cellules HeLa	-	X=A,G, m(6)N _A	Y = Pu, Py	-

Tableau donnant une liste de coiffes identifiées dans quelques virus (page 86) et cellules eucaryotiques (ci-dessus).

La figure 20 représente les diverses étapes du coiffage, ainsi que les enzymes impliquées.

- 1/ Une ARN 5'-triphosphatase enlève le -phosphate de l'ARN_{hn} pour former un ARN 5'-diphosphate.
- 2/ Une ARN guanylyltransférase catalyse le transfert de GMP à partir de GTP sur l'ARN 5'-diphosphate : c'est la réaction de coiffage proprement dite.
- 3/ Une ARN (guanine-7) méthyltransférase est responsable du transfert d'un groupement méthyle de la SAdoMet (donneur biologique de groupement méthyle) vers la position 7 de la guanine terminale, pour former une coiffe de type 0.
- 4/ Une ARN (nucléoside-2'-) méthyltransférase méthyle la position 2' du pénultième nucléotide pour former une coiffe de type 1.
- 5/ Une ARN (2'-O-méthyladénosine-N-6) méthyltransférase catalyse le transfert d'un groupement méthyle en position N-6 si le pénultième résidu est une adénine. On a alors une coiffe de type 1'.
- 6/ Une ARN (nucléoside-2'-) méthyltransférase peut catalyser (cette fois dans le cytoplasme), le transfert d'un groupe méthyle supplémentaire en position 2'-O de l'antépénultième nucléoside pour former une coiffe de type 2 (62).

La coiffe joue plusieurs rôles importants.

- Stabilité : du fait de la liaison 5'-5', une nouvelle extrémité 3'OH est créée, ce qui empêche l'attaque des 5' exonucléases.

De plus, Kim et Sarma ont proposé comme structure tridimensionnelle de la coiffe, un repli de l'extrémité m⁷GppXp sur elle-même, grâce à la grande flexibilité du lien triphosphate. Dans ce cas, des forces de stacking entre les cycles de la guanine et du pénultième nucléotide renforceraient la stabilité de la molécule.

Shatkin a confirmé ce rôle de stabilisation en observant une diminution du temps de demi vie des messagers dépourvus de coiffe (64).

- Transcription : le coiffage se fait dès le début de la transcription (65) et il semble indispensable, chez certains organismes en tout cas, à la continuation de la transcription (66).
- Traduction : la coiffe pourrait faciliter la liaison du ribosome à l'ARN_m, peut-être en interaction avec certaines protéines telles que le CBP (Cap Binding Protein).

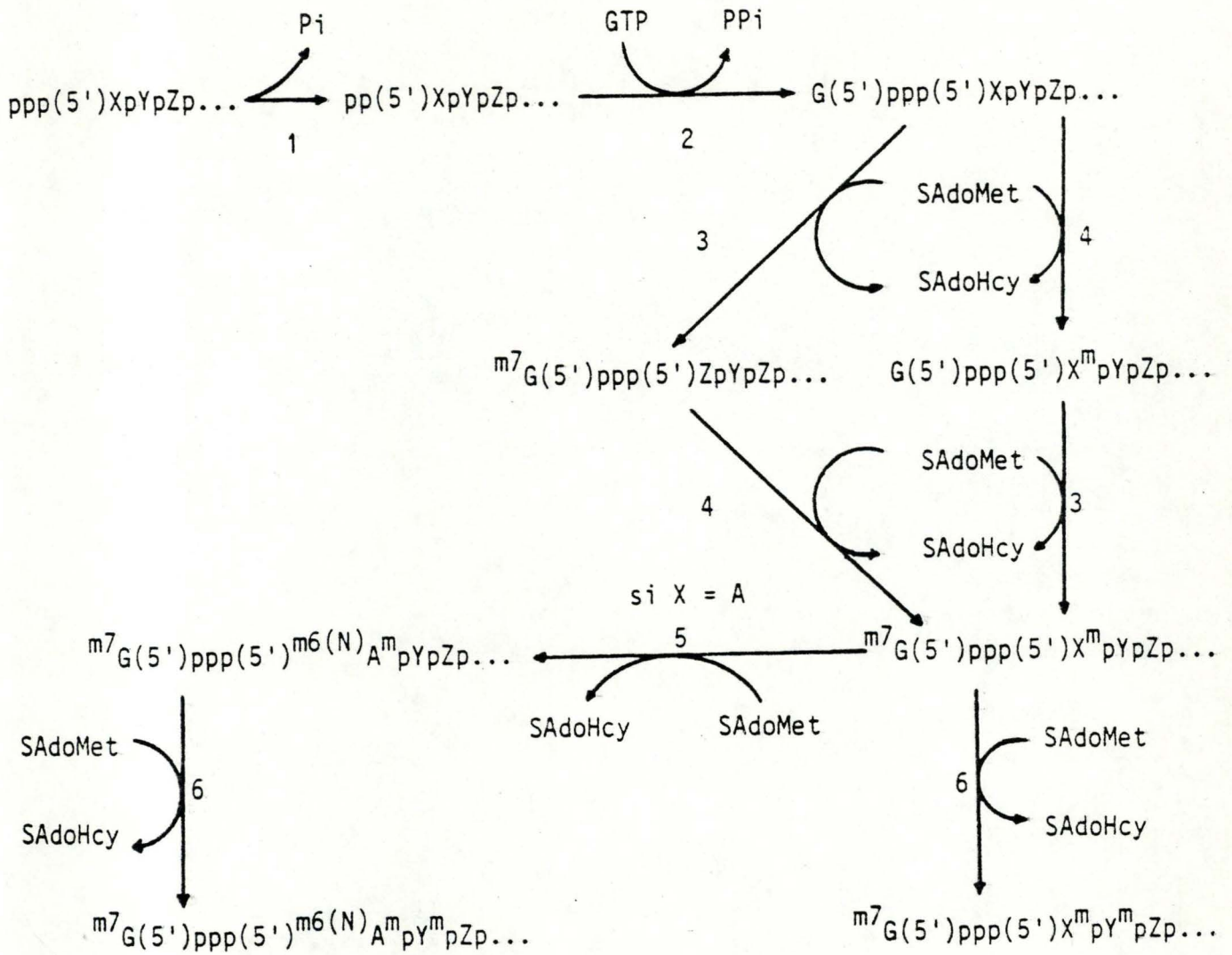


Fig.20: Etapes de coiffage avec les enzymes impliqués:

1. ARN-triphosphatase
2. ARN-guanylyltransférase
3. ARN(guanine-7-)-méthyltransférase
4. Coiffe 1 ARN(nucléoside-2'-)-méthyltransférase
5. ARN(2'-O-méthyladénosine-N-6)-méthyltransférase
6. Coiffe 2 ARN(nucléoside-2'-)-méthyltransférase.

Nous voyons donc que la coiffe possède plusieurs rôles plus ou moins connus.

Mais il n'en va pas de même en ce qui concerne la méthylation de la coiffe qui, si elle est universelle, n'a pas encore de rôle connu.

Certaines études ont montré que la méthylation de l'ARNm viral est nécessaire à sa traduction in vitro, mais aucun rôle n'a encore été démontré in vivo (68).

Il existe donc là une structure particulière, universellement conservée chez les eucaryotes et présente chez certains virus, qui nécessite pour sa mise en place un système enzymatique spécifique mais qui est encore très peu connue.

L'idée est donc d'obtenir un mutant thermosensible incapable de méthyler ses coiffes à 36°C.

La fig. 21 explique le test biochimique qui permettrait de découvrir un tel mutant de méthylation, dont l'étude conduirait peut-être à une meilleure compréhension du rôle biologique de la méthylation.

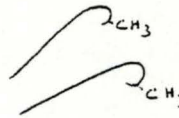
Mutant autre qu'un mutant de méthylation.

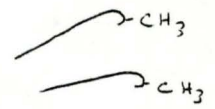
23°C

Mutant de méthylation

Fabrication de l'ARNm normal (méthylé)

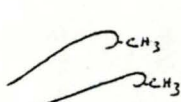
Fabrication de l'ARNm normal (méthylé)

 court passage à 36°C

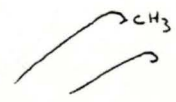


Fabrication de l'ARNm méthylé

Fabrication de l'ARNm sous-méthylé

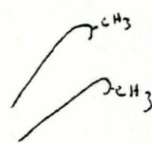


extraction d'ARN

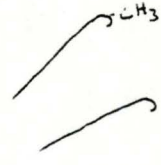


ARNm méthylé

ARNm sous-méthylé

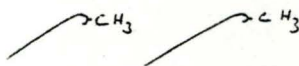


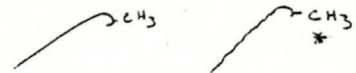
+SAdoMet marqué
+enzyme de méthylation (I)



ARNm non marqué:
réponse négative

ARNm marqué:
réponse positive





(I): Test de méthylation. L'ARN extrait est mis en présence d'enzyme de méthylation de la coiffe et de donneur de groupe méthyle marqué (réponse positive du compteur à radioactivité).

L'ARNm sous-méthylé recevra dans ces conditions un groupe méthyle marqué (réponse positive du compteur à radioactivité) alors que l'ARNm méthylé gardera ses groupes méthyles non marqués (réponse négative du compteur à radioactivité).

Fig. 21: Principe de la détection d'un mutant de méthylation dans la banque.

ANNEXE I.Tableau synthétique des résultats obtenus.

Symboles utilisés:

+++ : thermosensibilité forte (les mutants stoppent très rapidement leur croissance après une ou deux générations).

++ : thermosensibilité moyenne (les mutants stoppent leur croissance après quelques générations).

+ : thermosensibilité faible (les mutants gardent une croissance résiduelle assez forte).

- : mutants non thermosensibles (croissance proche de celle du sauvage à 36°C).

F : mutant de Fermentation.

R : mutant de Respiration.

C : mutant cdc. à excroissance.

numéro du mutant	thermosensibilité	identification	numéro du mutant	thermosensibilité	identification
1	++	C	38	-	
2	++		39	++	
3	+++		40	++	
4	-		41	++	
5	-		42	-	
6	++	F	43	++	
7	++		44	+++	
8	++	F	45	-	
9	++		46	++	
10	++		47	+++	
11	++		48	+++	R
12	++	C	49	+++	
13	+++	C	50	++	F
14	++	C	51	++	
15	++	C	52	++	F
16	++		53	++	
17	++		54	++	
18	++		55	++	
19	++	F	56	++	
20	++		57	++	
21	++		58	+	
22	++		59	++	
23	++		60	-	
24	++		61	-	
25	++		62	+	C, F
26	-		63	-	F
27	++		64	++	
28	++		65	++	
29	++		66	+++	
30	++		67	++	
31	++		68	-	F
32	++		69	++	
33	++	C	70	++	R
34	++		71	++	
35	++		72	++	
36	++		73	-	F
37	+++	R	74	++	

numéro du mutant	thermosensibilité	identification	numéro du mutant	thermosensibilité	identification
75	-		129	++	
76	++		130	++	F (1)
77	++		131	+++	
78	++		132	++	
79	++	F	133	++	
80	++		134	++	F
81	++		135	++	
82	++	F	136	-	
83	++		137	++	F
84	++	F	138	++	
85	++		139	++	C
86	-	F	140	+++	
87	++		141	++	
88	++		142	++	
89	++		143	++	
90	-		144	+	
91	-		145	+	
92	++		146	+++	
93	+++		147	+++	
94	++		148	++	
95	++		149	++	F
96	++		150	++	F
97	+++		151	+	
98	-		152	+++	
99	+		153	+	
100	++	C	154	+	
101	+++		155	+	
102	++	C	156	++	
103	++		157	++	
104	++		158	+	F
105	+++		159	++	
106	++		160	++	
107	+++		161	++	
108	+++	R	162	+	
109	++	R	163	++	F
110	++	R	164	++	
111	++	F	165	+++	
112	++		166	++	
113	++		167	++	
114	++		168	++	F
115	++	R	169	++	
116	++		170	++	
117	+++	C	171	+++	
118	++		172	++	
119	++		173	-	
120	+		174	-	
121	++		175	+++	
122	+++	F	176	++	
123	++	F	177	++	
124	+	C	178	-	
125	++		179	+++	
126	+++		180	++	
127	++		181	+++	
128	++	F	182	++	

numero du mutant	thermosensibilité	identification	numéro du mutant	thermosensibilité	identification
183	++		237	++	
184	++		238	++	
185	++		239	++	
186	++		240	++	
187	++		241	-	
188	-		242	+++	
189	+++		243	-	
190	++		244	++	
191	++		245	++	
192	++		246	-	
193	++		247	++	R
194	++		248	++	R
195	+++		249	+++	
196	++		250	++	
197	+		251	++	
198	++		252	-	
199	+++		253	++	
200	-		254	-	
201	++	C	255	++	
202	++		256	-	
203	++		257	-	
204	++		258	++	
205	++		259	+++	
206	++		260	+++	
207	-		261	+++	
208	-		262	++	
209	+++		263	++	
210	+++		264	++	
211	++		265	++	
212	++		266	+++	
213	++	F	267	++	
214	++		268	-	
215	+++	F	269	++	
216	++	C	270	++	
217	++	C	271	-	
218	+++		272	-	
219	+++		273	++	
220	++		274	+++	
221	++	F	275		(2)
222	++	F	276	+++	
223	+++		277	+++	
224	++		278	+++	
225	++	F	279	+++	R
226	+++	F	280	++	
227	+++		281	++	
228	++		282	+++	
229	++		283	+++	
230	++		284	++	
231	+++		285	++	
232	+++		286	+++	
233	-		287	-	
234	+++		288	++	
235	++		289	-	
236	++		290	+++	

numéro du mutant	thermosensibilité	identification	numéro du mutant	thermosensibilité	identification
291	++		347	++	
292	-		348	++	
293	++		349	++	
294	+++		350	+++	C
295	+++		351	+++	
296	+++		352	+	
297	++	C	353	++	
298	+++		354	+++	
299	+++		355	+++	
300	++		356	+++	
301	-		357	++	
302	++	F	358	++	
303	++		359	++	
304	+		360	+++	
305	++		361	+++	
306	+++		362	++	
307	++		363	++	
308	++		364	++	
309	+++		365	++	
310	+++		366	+++	
311	++		367	++	
312	+++		368	++	
313	++		369	++	
314	++		370	-	
315	+++		371	++	C
316	++		372	++	
317	+++		373	++	
318	+++		374	+	
319	++		375	++	
320	+++		376	+++	
321	+++		377	++	
322	+++		378	++	
323	+++		379	++	
324	+++		380	++	
325	+++		381	+++	C
326	++		382	+++	
327	++		383	++	
328	++		384	-	
329	++		385	++	
330	++		386	++	
331	++		387	+++	
332	++		388	++	
333	++		389	++	
334	++		390	++	F
335	++		391	++	
336	++		392	++	F
337	+++		393	++	
338	++		394	++	
339	-		395	+++	
340	++		396	++	
341	+++	F	397	++	
342	++		398	++	
343	++		399	++	
344	++		400	++	R
345	+++		401	++	
346	++		402	+++	

numéro du mutant	thermosensibilité	identification	numéro du mutant	thermosensibilité	identification
403	+++		459	+++	
404	+++		460	++	
405	++		461	+++	
406	++		462	++	
407	+++		463	+++	
408	++	C	464	+++	
409	++		465	+++	
410	++		466	+++	F
411	++		467	++	R
412	+++		468	++	C
413	+++		469	++	
414	+++		470	++	
415	+++		471	+	
416	++		472	+++	
417	++	C	473	++	
418	++		474	++	
419	++		475	++	
420	+++		476	++	
421	++		477	+++	
422	++		478	++	
423	++		479	+++	
424	++		480	+++	
425	++		481	++	C
426	++		482	++	
427	++		483	++	
428	+++		484	+++	
429	+++		485	-	
430	++	C	486	+++	
431	++		487	+	
432	++		488	+++	
433	++		489	++	
434	++		490	++	
435	++		491	+++	
436	++	C	492	++	
437	+++		493	++	R
438	+++		494	++	
439	+++		495	++	
440	+++		496	+++	R
441	++		497	++	F
442	++	C	498	++	
443	+++		499	++	R
444	++		500	++	
445	+++		501	++	
446	+++	F	502	+++	
447	+++		503	+++	
448	+++		504	+++	
449	+++		505	++	
450	++		506	-	
451	++		507	++	
452	+++		508	==	
453	++	C	509	-	
454	++		510	++	
455	++		511	++	
456	++		512	++	
457	++		513	++	
458	++		514	-	

numéro du mutant	thermosensibilité	identification	numero du mutant	thermosensibilité	identification
515	-		569	++	
516	++		570	++	
517	++		571	++	F
518	++		572	++	F
519	++		573	++	F
520	-		574	++	F
521	++		575	++	
522	++		576	-	
523	++		577	++	
524	++		578	++	
525	++		579	-	
526	+++		580	-	
527	-		581	-	
528	+		582	++	
529	+		583	++	
530	+		584	++	
531	+++		585	++	
532			586	-	
533	++		587	++	
534			588	+++	
535	++		589	++	
536	++		590	-	
537	++		591	+++	
538	++		592	++	F
539	++		593	+	
540	++		594	++	
541	++	C	595	++	
542	++		596	++	
543	++		597	++	
544	++		598	++	F
545	++		599	-	
546	++		600	++	
547	++		601	++	
548	++		602	++	
549	+		603	+++	
550	+		604	-	
551	++		605	-	
552	++		606	-	
553	++		607	+++	
554	++		608	-	
555	++		609	++	
556	++		610	++	
557	+++		611	++	
558	++		612	++	F
559	++		613	++	
560	++		614	++	
561	++		615	+++	
562	++		616	++	
563	++		617	++	
564	++		618	++	
565	++		619	++	
566	++		620	++	C
567	++	C	621	++	
568	++		622	++	

numéro du mutant	thermosensibilité	identification	numéro du mutant	thermosensibilité	identification
623	+++		683	++	
624	++		684	++	
625	++		685	++	
626	-		686	++	
627	++		687	+++	
628	++		688	++	
629	++		689	++	
630	++		690	++	
631	++		691	++	
632	++		692	++	F
633	++		693	+++	
634	++		694	+++	
635	+++	F	695	++	
636	++	F	696	+++	
637	++		697	++	
638	++	F	698	++	C
639	++		699	+++	
640	++		700	++	
641	++	F	701	++	
642	++	F	702	++	C
643	++		703	+++	
644	++	F	704	++	
645	+++		705	++	
646	++		706	++	
647	++		707	+++	
648	++		708	++	
649	++		709	++	
650	++		710	++	
651	+++		711	++	
652	++	F	712	+++	
653	++		713	+++	
654	+++		714	++	
655	-		715	++	
656	++		716	+++	
657	++	C	717	++	
658	++		718	++	
659	++		719	-	
660	+++		720	++	
661	++		721	++	F
662	++		722	++	
663	+++		723	+++	
664	++		724	++	C
665	++		725	++	C
666	++		726	+++	C
667	++		727	++	(3)
668	+++		728	+++	
669	++		729	++	
670	++		730	+++	
671	-		731	+++	
672	++		732	++	
673	++		733	++	
674	++		734	+++	
675	+++		735	++	
676	+++		736	++	
677	+++		737	+++	
678	+++		738	+++	
679	+++		739	-	
680	-	F	740	++	
681	+++		741	-	
682	+++		742	+	

numéro du mutant	thermosensibilité	identification	numéro du mutant	thermosensibilité	identification
743	+++		797	++	
744	++		798	++	
745	+		799	++	
746	++		800	++	
747	+++		801	++	
748	+++	F	802	+++	
749	++		803	++	
750	++		804	++	
751	++		805	++	
752	+++		806	+++	
753	++		807	+++	
754	+++		808	+++	
755	+++		809	++	
756	+		810	+++	
757	+++		811	++	
758	++		812	++	
759	++		813	++	
760	++		814	++	
761	++		815	++	
762	++		816	++	
763	++		817	++	
764	++		818	++	
765	++		819	++	
766	++		820	+++	
767	++		821	++	
768	+++		822	++	
769	++		823	++	
770	++		824	++	
771	++		825	++	
772	++		826	+++	
773	++		827	++	
774	++		* 829	++	
775	-		830	++	
776	++		831	++	
778	++		832	++	
779	++		833	++	
780	++		834	+++	R
781	++		835	+++	
782	++		836	++	
783	+++		837	++	
784	++		838	++	
785	++		839	++	
786	++		840	+	
787	++		841	++	
788	++		842	++	
789	++		843	++	
790	++		844	++	
791	++		845	++	
792	++		846	++	
793	++		847	++	
794	+++		848	+++	
795	++		849	-	
796	++		850	++	

* 828

+++

C
F
F
F
F
C
F
F
F

numéro du mutant	thermosensibilité	identification	numéro du mutant	thermosensibilité	identification
851	++		868	++	
852	+++		869	-	
853	++	F	870	-	
854	+++	F	871	-	
855	++	C	872	+++	
856	++		873	-	
857	++		874	-	
858	++	F	875	-	
859	++		876	+	
860	++		877	++	
861	++		878	++	
862	+++		879	-	
863	++		880	++	F
864	++		881	++	
865	++		882	++	
866	+++	F	883	-	
867	+				

Remarques:

- (1):mutant 130: formation de "chaînettes"
(2):mutant 275: n'existe pas
(3):mutant 727: mutant de lyse.

ANNEXE 2.

Liste des symboles utilisés pour le métabolisme énergétique.

Table 1 Enzymes and genes of yeast intermediary metabolism

<i>ACO</i> ^a	aconitate hydratase 4.2.1.3 ^b ; R: Boyer (1971, V, 413-439)
<i>(ACS)</i>	acetyl-CoA synthetase 6.2.1.1; Frenkel and Kitchens (1977); 2 × 78, 0.5% ^d
<i>ADC ADM ADR</i>	alcohol dehydrogenase 1.1.1.1; Wills and Jörnvall (1979); Wenger and Bernofsky (1971); 4 × 36, ~ 1%; R: Boyer (1975, XI, 103-190)
<i>(ALD)</i>	aldehyde dehydrogenase (NADP ⁺) 1.2.1.5; Bostian and Betts (1978); 4 × 62
<i>CIT</i>	citrate synthase 4.1.3.7; Parvin (1969); 0.2%; R: Weitzman and Dawson (1976)
<i>(DAR)</i>	dihydroxyacetone-P reductase (glycerol-3-P dehydrogenase) 1.1.1.94
<i>(ENO)</i>	enolase 4.2.1.11; Brewer and Fairwell (1970); 2 × 44; R: Boyer (1971, V, 499-538)
<i>(FBA)</i>	fructose-bisphosphate aldolase 4.1.2.13; Harris et al. (1969); Lubini et al. (1977); 2 × 40, 4%; R: Boyer (1972, VII, 213-258)
<i>(FBP)</i>	fructose bisphosphatase 3.1.3.11; Funayama et al. (1979); 2 × 56, 0.1%; R: Boyer (1971, VI, 612-646)
<i>(FRD)</i>	fumarate reductase 1.3.99.1; Tisdale et al. (1968)
<i>(FUM)</i>	fumarase 4.2.1.2; Cataldi and Stoppani (1966); R: Boyer (1971, V, 539-571)
<i>(GLD)</i>	glyceraldehyde-3-P dehydrogenase 1.2.1.12; Kirschner and Voigt (1968); Butler and Jones (1970); Stallcup et al. (1972); Holland and Westhead (1973); 4 × 36, 2-20%; R: Boyer (1976, XIII, 1-49)
<i>GLK</i>	glucokinase 2.7.1.2; Maitra and Lobo (1977c); ? × 51, 0.2%
<i>(GND)</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase 1.1.1.44
<i>GPM</i>	phosphoglycerate mutase 2.7.5.3; Grisolia and Carreras (1975); Sasaki et al. (1976); 4 × 28, 0.9%; R: Boyer (1972, VI, 407-477)
<i>(GPP)</i>	glycerol-1-phosphatase 3.1.3.21
<i>GUT1</i>	glycerol kinase 2.7.1.30; R: Boyer (1973, VIII, 487-508)
<i>GUT2</i>	glycerol-3-P dehydrogenase 1.1.99.5; R: Boyer (1976, XIII, 175-298)
<i>HXK1</i>	hexokinase; Bernard (1975); McDonald et al. (1979); 2 × 52,
<i>HXK2</i>	0.5%; R: Boyer (1973, IX, 1-48); <i>HXK1</i> on 6R ^c , Lobo and Maitra (1977a); <i>HXK2</i> on 7L, P.K. Maitra (pers. comm.)
<i>(ICD1)</i>	isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺) 1.1.1.42; Barnes et al. (1971); Illingworth (1972); 8 × 40, α ₁ β ₁ .
<i>(ICD2)</i>	isocitrate dehydrogenase (NADP ⁺) 1.1.1.43; Kornberg (1955)
<i>ICL</i>	isocitrate lyase 4.1.3.1; Olson (1959)
<i>KGD</i>	α-ketoglutarate dehydrogenase 1.2.4.2; Hirabayashi and Harada (1971); R: Boyer (1970, I, 213-240)
<i>(LDH)</i>	lactate dehydrogenase 1.1.2.3 (cytochrome <i>b</i> ₂); Labeyrie et al. (1978); 4 × 57, 1.1.2.4, 1.1.96.6; R: Boyer (1976, XIII, 175-298)
<i>(MDD)</i>	malate dehydrogenase (decarboxylating) or the "malic enzyme" 1.1.1.40; Temperli et al. (1965); Fuck et al. (1973); R: Frenkel (1975)
<i>MDH</i>	malate dehydrogenase 1.1.1.37; Hägele et al. (1978); 2 × 37 (mitochondrial), 2 × 34 (cytoplasmic); R: Boyer (1975, XI, 369-396)
<i>(MLS)</i>	malate synthase 1.1.3.2; Dixon et al. (1960); Zipper and Durschlag (1978); 3 × 63
<i>(PCK)</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase 4.1.1.49

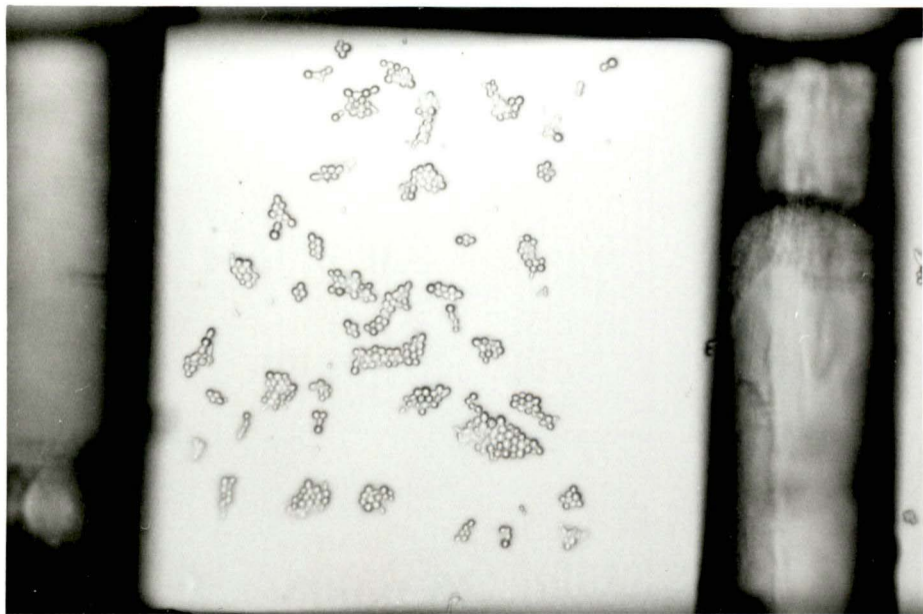
Table 1 (Continued)

<i>PDC</i>	pyruvate decarboxylase 4.1.1.1; Gounaris et al. (1975); 4 × 60, 1%
<i>(PDH)</i>	pyruvate dehydrogenase 1.2.4.1; Wais et al. (1973); 0.1%; R: Boyer (1970, I, 213-240)
<i>PFK</i>	phosphofructokinase 2.7.1.11; Tamaki and Hess (1975); Kopperschläger et al. (1977); $\alpha_4\beta_4$, 8 × ~100, 0.3%; R: Boyer (1973, VIII, 240-278); Uyeda (1979)
<i>PGI</i>	phosphoglucose isomerase 5.3.1.9; Kempe et al. (1974); 2 × 60, 1%; R: Boyer (1972, VI, 272-354); on 2R, Maitra and Lobo (1977d); Herrera and Pascual (1978)
<i>PGK</i>	phosphoglycerate kinase 2.7.2.3; Scopes (1975); Spragg et al. (1976); 1 × 40, 5%; R: Boyer (1973, VIII, 335-351)
<i>(PGL)</i>	6-phosphogluconolactonase 3.1.1.31
<i>PGM1</i>	phosphoglucomutase 2.7.5.1; Daugherty et al. (1975); 2 × 32, 0.04%; R: Boyer (1972, VI, 407-477)
<i>PGM2</i>	phosphomannose isomerase 5.3.1.8; Gracy and Noltmann (1968); 1 × 45?, 0.06%; R: Boyer (1972, VI, 272-354)
<i>PMI</i>	phosphomannose isomerase 5.3.1.8; Gracy and Noltmann (1968); 1 × 45?, 0.06%; R: Boyer (1972, VI, 272-354)
<i>(PYC)</i>	pyruvate carboxylase 6.4.1.1; Cohen et al. (1979); 4 × 120, 0.3%; R: Boyer (1972, VI, 1-36)
<i>PYK</i>	pyruvate kinase 2.7.1.40; Aust and Suelter (1978); 4 × 57, 3-6%; R: Boyer (1973, VIII, 353-382); on 1L, Maitra and Lobo (1977a); Sprague (1977)
<i>(RPE)</i>	ribulose-5-P 3-epimerase; Williamson and Wood (1966)
<i>(RPI)</i>	ribose-5-phosphate isomerase 5.3.1.6; R: Boyer (1972, VI, 272-354)
<i>SDH</i>	succinate dehydrogenase 1.3.99.1; R: Boyer (1976, XIII, 175-298)
<i>(SCS)</i>	succinyl-CoA synthetase 6.2.1.4
<i>(TAL)</i>	transaldolase 2.2.1.2; Vankataraman and Racker (1961); 0.4%; R: Boyer (1972, VII, 259-280)
<i>(TKT)</i>	transketolase 2.2.1.1; Cavaliere et al. (1975); Belyaeva et al. (1978); 2 × 80
<i>TPI</i>	triosephosphate isomerase 5.3.1.1; Alber et al. (1980); 2 × 27, 2%; R: Boyer (1972, VI, 272-354)
<i>(ZWF)</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.1.1.49; Yue et al. (1969); 4 × 51, 0.04%; R: Levy (1979)

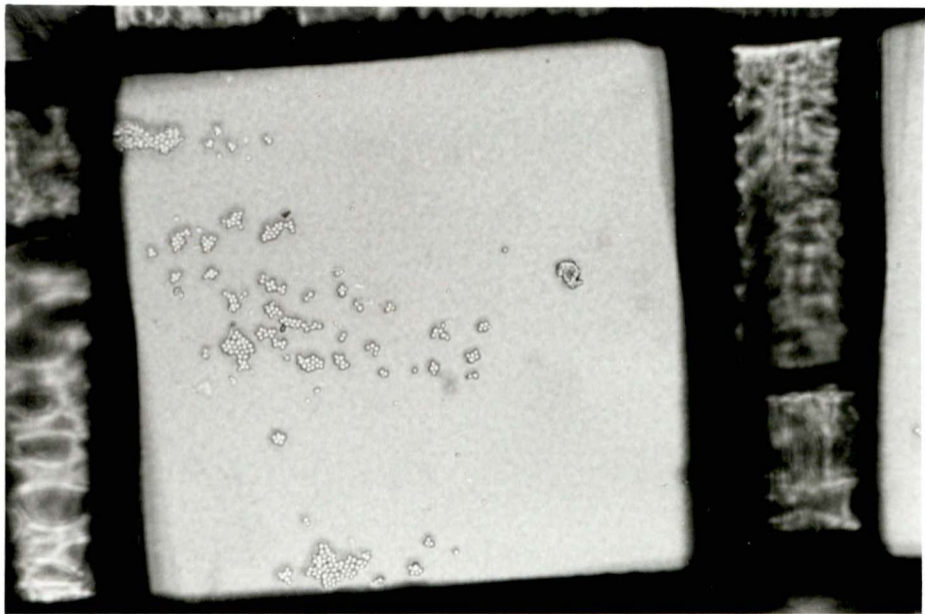
1. ANFINSEN, C.B., (1973), *Science* 181, 223-230.
2. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D., *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc N.Y. & L. Chap.3: Macromolecules, : Structure, Shape, and information.
3. PAULING, L., ITANO, H.A., SINGER, S.J., WELLS, I.C., (1949), *Science*, 110, 543-548.
4. INGRAM, V.M., (1957), *Nature*, 180, 326-328.
5. FINCK, J.T., PERUTZ, H.F., BERTLES, J.F., DOBLER, J., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 718-722.
6. WEINBERG, R., (1984), *Pour la science*, 75, 12-26.
7. DOOLITTLE, R.F., (1979), *Protein evolution in The Proteins*, 3ème éd., Vol.4, New-York Academic Press, 1-118.
8. LEWIN, B., *Genes*, Chap.7 tRNA: the translational adaptor.
9. LEHMAN, I.R., BESSMAN, M.J., SIMMS, E.S., KORNBERG, A., (1958), *J. Biol. Chem.*, 233, 163.
10. DE LUCIA, P., CAIRNS, J., (1969), *Nature*, 224, 1164-1166.
11. LEHNINGER, A.L., *Biochimie Flammarion Médecine-Sciences*, Chap. 32. Replication et transcription du DNA.
12. LEWIN, B., *Genes* Chap.8. Ribosome translation factory: subunit assembly is linked to topology.
13. ROHL, NIERHAUS, (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 729-737.
14. KILBEY, B.J., (1975), *Methods in Cell Biology*, Vol XII Yeast Cells, Chap.11. Mutagenesis in Yeast.
15. PRINGLE, J.R., (1975), *Methods in Cell Biology*, Vol XII Yeast Cells, Chap.12. Induction, selection and experimental uses of t^s and other conditionnal mutants of Yeast.
16. LACROUTE, F., (1975), *Methods in Cell Biology*, Vol XII Yeast Cells, Chap.13. The use of mutants in metabolic studies.
17. STRUHL, K., (1983), *Nature*, 305, 391-397.
18. FINCK, G.R., (1970), *Methods in Enzymology*, Vol 17A, The Biochemical Genetics of Yeast, 59-78, Academic Press New-York.
19. PETES, T.D., (1980), *Ann. Rev. Bioch.*, 49, 845-876.
20. MORTIMER, K.D., *Mol. Biol. of the Yeast Saccharomyces*, CSHL (1981).
21. SHORTLE, D., HABER, J.E., BOTSTEIN, D., (1982), *Science*, 217, 371-373.
22. SHORTLE, D., NOVICK, P., BOTSTEIN, D., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4889-4893.
23. LEWIN, B., *Genes*, Chap.2 What is a gene: a biochemical vue.
24. HOROWITZ, N.H., (1948), *Genetics*, 33, 612
25. HOROWITZ, N.H., (1950), *Advan. Genet.*, 3, 33
26. HOROWITZ, N.H., LEUPOLD, U., (1951), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 16, 65
27. ESPOSITO, M.S., ESPOSITO, R.E., (1969), *Genetics*, 61, 79

28. WEISLOGEL, P.O., BUTOW, R.A., (1970), Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,
67, 52
29. BAYLISS, F.T., VINOPAL, R.T., (1971), Science, 174, 1339.
30. SINGH, A., MANNEY, T.R., (1974), Genetics, 77, 651
31. COX, J.H., STRACK, H.B., (1971), Genetics, 67, 5
32. JARVICK, J., BOTSTEIN, D., (1973), Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
70, 2046
33. HAWTHORNE, D.C., FRIIS, J., (1964), Genetics, 50, 829
34. SINGH, A., SHERMAN, F., (1974), Genetics, 77, s60
35. VENKOV, P.V., HADJILOV, A.A., BATTANER, E., SCHLESSINGER, D., (1974),
Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 599
36. HARTWELL, L.H., (1967), J. of Bacteriol., 93, 1662-1670.
37. LITTLEWOOD, B.S., (1975), Methods in Cell Biology Vol XI Yeast
Cells, Chap. 15. Methods for selecting auxotrophic and tempera-
ture-sensitive mutants in Yeasts.
38. KESSIN, R.H., WILLIAMS, K.L., NEWELL, P.C., (1974), J. Bacteriol.,
119, 776.
39. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D.,
Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc N.Y. & L.,
Chap. 2. Small molecule, energy, and biosynthesis.
40. LEHNINGER, A. L., Biochimie Flammarion Médecine-Sciences,
Chap. 16. La glycolyse.
41. LEHNINGER, A. L., Biochimie Flammarion Médecine-Sciences,
Chap. 17. Le cycle de l'acide tricarboxylique et la voie du
phosphogluconate.
43. SCHOPF, W., (1978), Pour la science, novembre 1978, 64-82.
44. KABACK, D.B., OELLER, P.W., STEENSMA, H.Y., HIRSCHMAN, J., RUEZINSKY, D.,
COLEMAN, K.G., PRINGLE, J.R., (1984), Genetics, 108, 67-90.
45. GANCEDO, C., GANCEDO, J.M., SOLS, A., (1968), Eur. J. Biochem.,
5, 165-172.
46. LEHNINGER, A.L., Biochimie Flammarion Médecine-Sciences,
Chap. 15 Principes de bioénergétique et cycle de l'ATP.
47. HAARASILTA, S., OURA, E., (1975), Eur. J. Biochem., 52, 1-7;
48. GANCEDO, J.M., GANCEDO, C., (1979), Eur. J. Biochem., 101, 455-460.
49. NURSE, P., (1985), TIG Février 1985, 51-54.
50. PRINGLE, J.R., HARTWELL, L.H., (1981), The molecular biology of
the Yeast *Saccharomyces*. Life cycle and inheritance.
Cold Spring Harbor Laboratory.
The *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle.
51. HARTWELL, L.H., CULOTTI, J., PRINGLE, J.R., BRIAN, J.R., (1974),
Science, 183, 46-51.
52. HARTWELL, L.H., CULOTTI, J., REID, B., (1970), Proc. Natl. Acad. Sci.
USA., 66, 352-359.

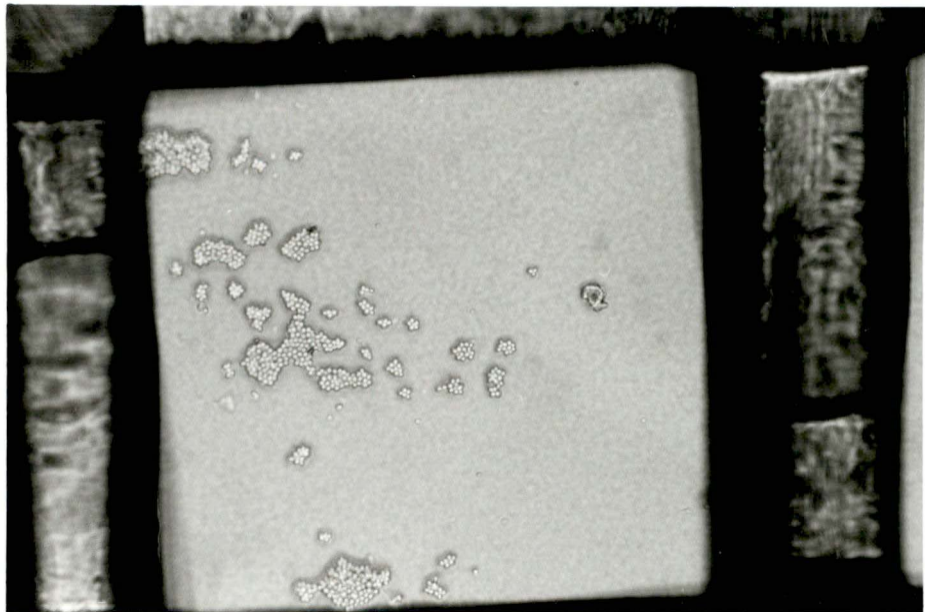
53. HARTWELL, L.H., MORTIMER, K.D., CULOTTI, J., CULOTTI, M., (1973), *Genetics*, 74, 267-286.
54. DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N., GINSBERG, H.S., WOOD, B.J., *Microbiology 2ème éd.*, (1970).
55. DEPELCHIN, A., cours de microbiologie, FNDP Namur, (1984).
56. CIRIACY, M., BREITENBACH, I., (1979), *J. Bacteriol.*, 139, 152-160.
57. COOPER, T.G., *The molecular biology of the Yeast Saccharomyces Life cycle and inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory (1981), *Transport in Saccharomyces cerevisiae*.
58. FRAENKEL, D.G., *The molecular biology of the Yeast Saccharomyces, Life cycle and inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1981), *Carbohydrate Metabolism*.
59. CLIFTON, D., FRAENKEL, D.G., (1982), *Biochem.*, 21, 1935.
60. HARRIS, C.E., KOBES, R.D., TELLER, D.C., RUTTER, W.J., (1969), *Biochem.*, 8, 2442.
61. SCHERRER, K., IMAIZUMI-SCHERRER, M.T., REYNAUD, C.A., THERWATH, A., (1979), *Molec. Biol. Rep.*, 5, 5-28.
62. KEITH, J.M., (1983), *Enzymes of nucleic acid synthesis and modification, Vol. II, RNA Enzymes*, 111-134, CRC Boca Raton, Florida.
63. KIM, C.H., SARMA, R.H., (1977), *Nature*, 270, 223-227.
64. MUTHUKRISHNAN, S., BOTH, C.W., FURUICHI, Y., SHATKIN, A.J., (1975), *Nature*, 255, 33-37.
65. DARNELL, J.E., (1979), *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 22, 327-353.
66. KRUG, R.M., BRONI, B.A., BOULOY, M., *Cell*, 18, 329-334.
67. BOTH, G.W., BANERJEE, A.K., SHATKIN, A.J., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 1189-1193.
68. SHATKIN, A.J., (1976), *Cell*, 9, 645-653.



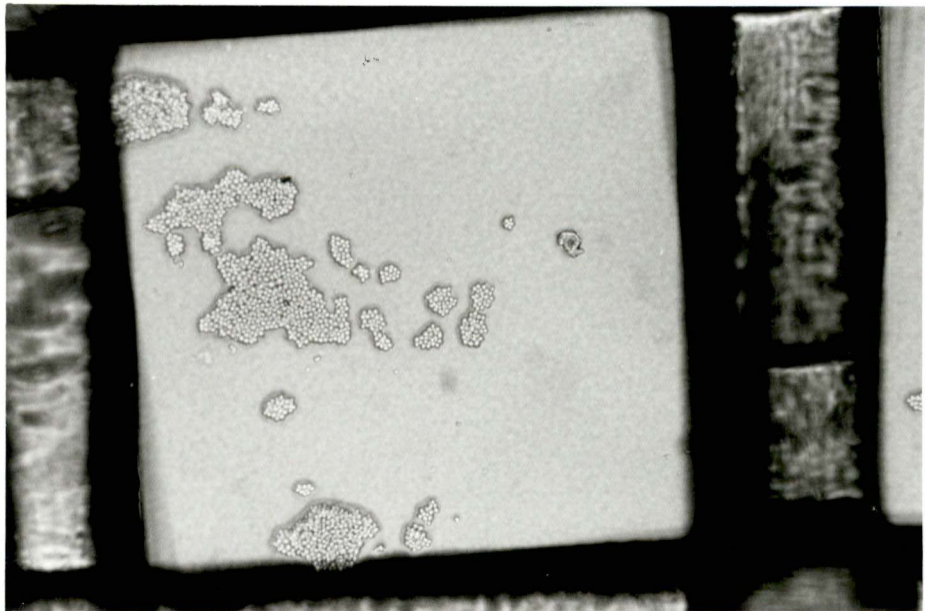
7



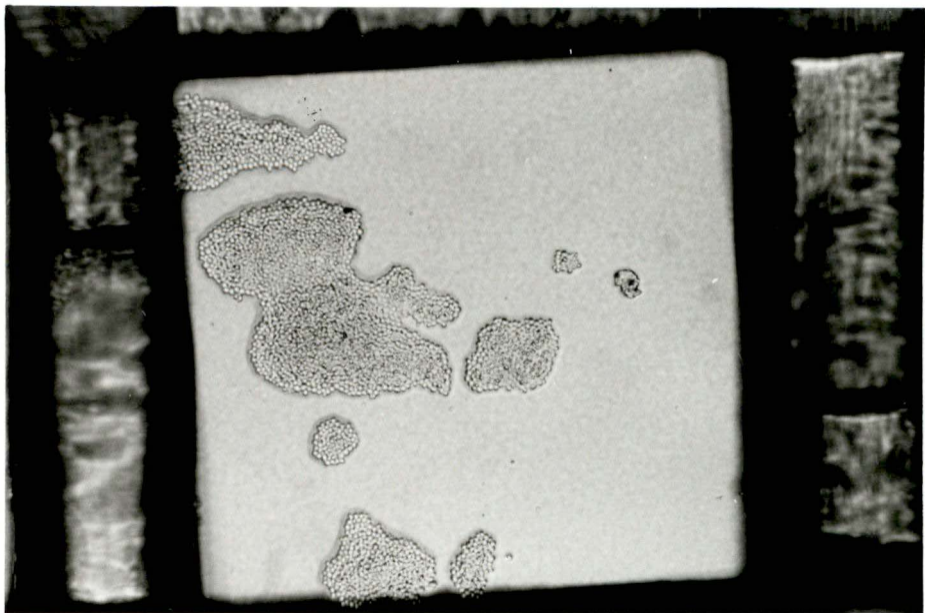
Ia



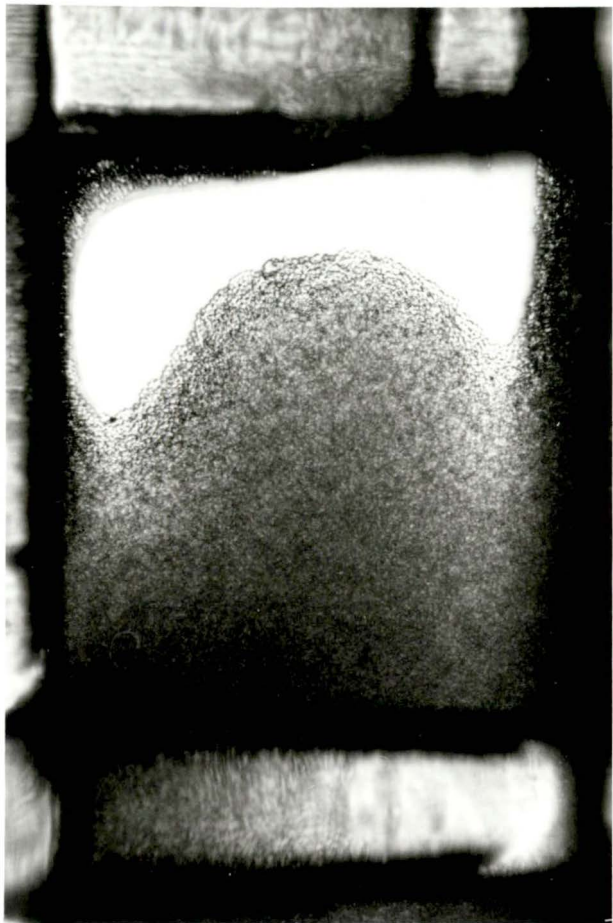
I6

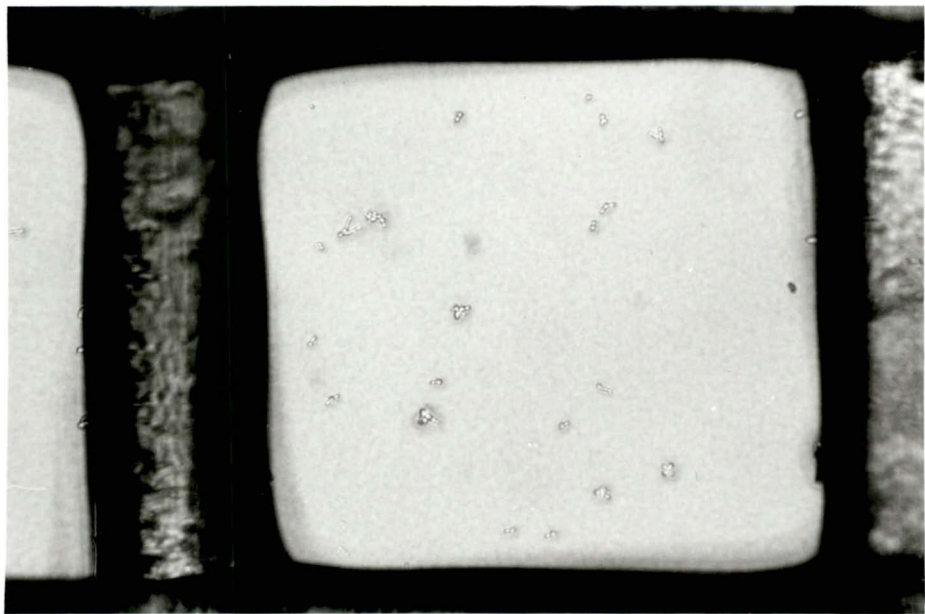


1c

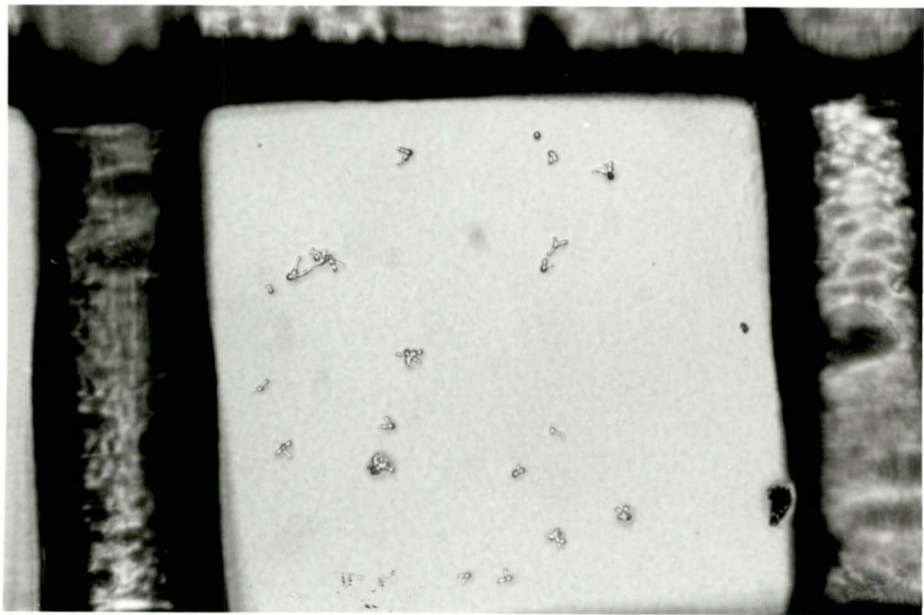


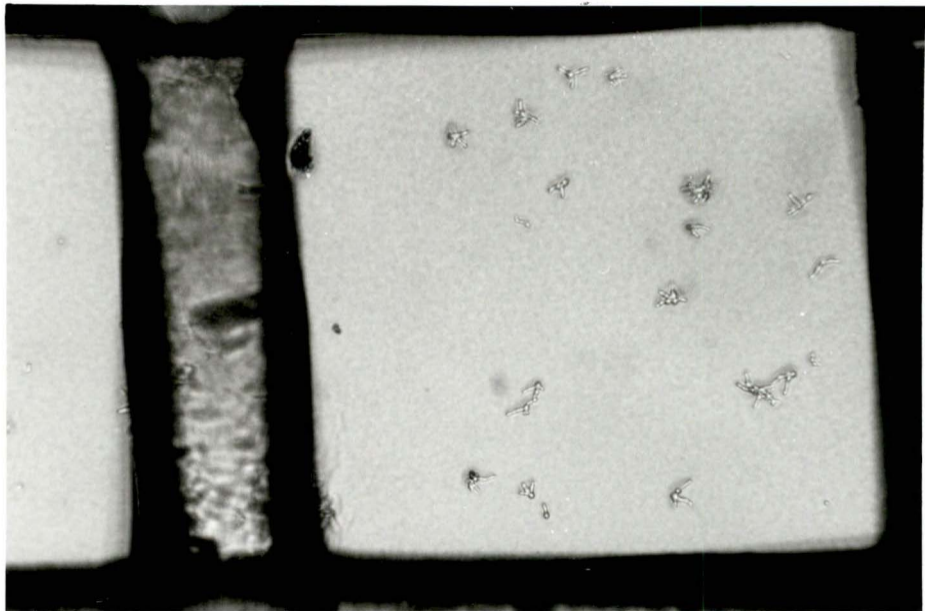
I d



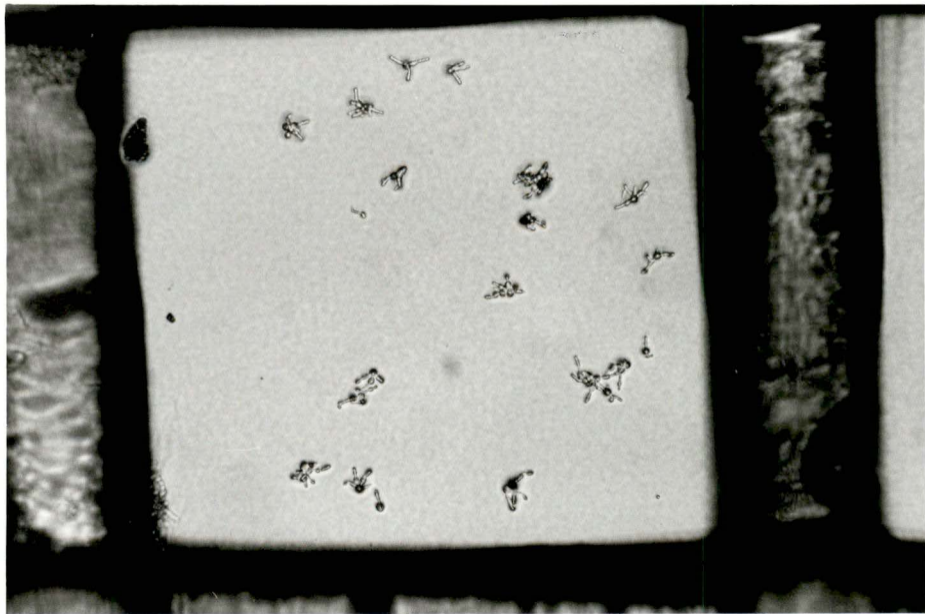


II a

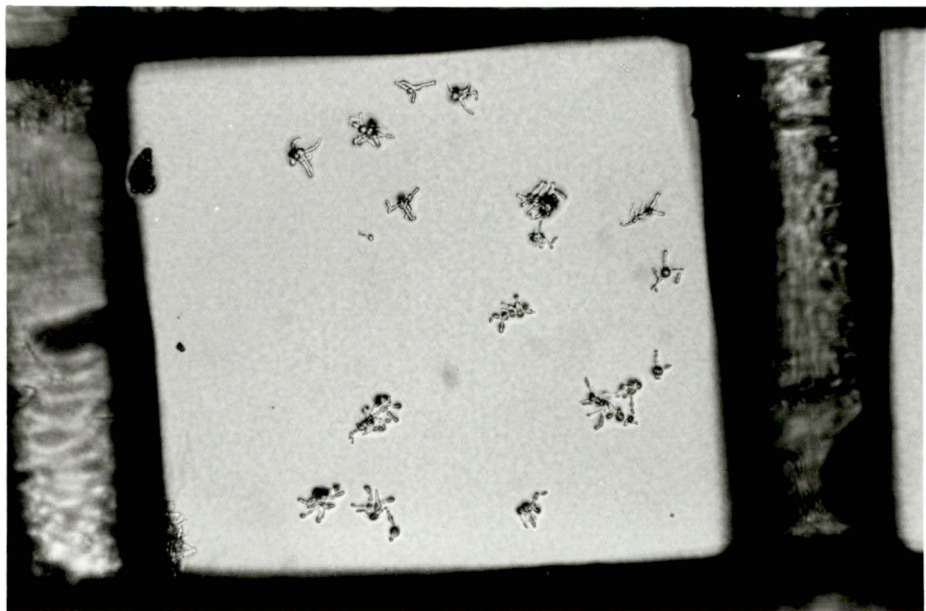




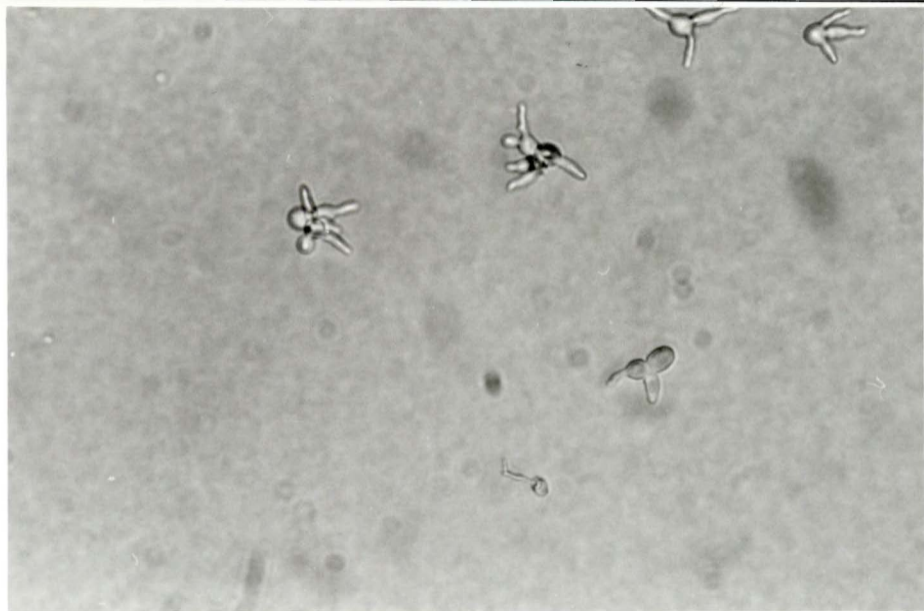
IIc



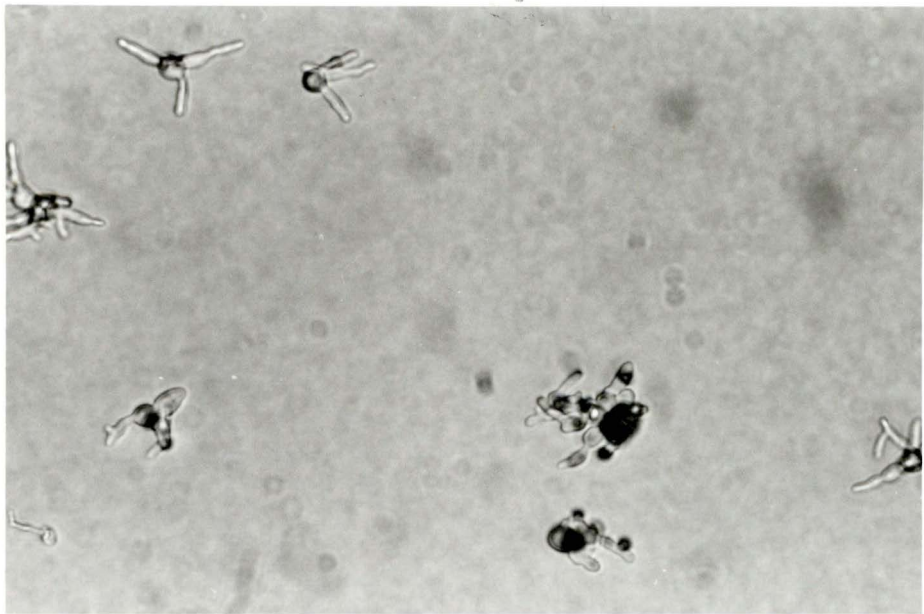
II d



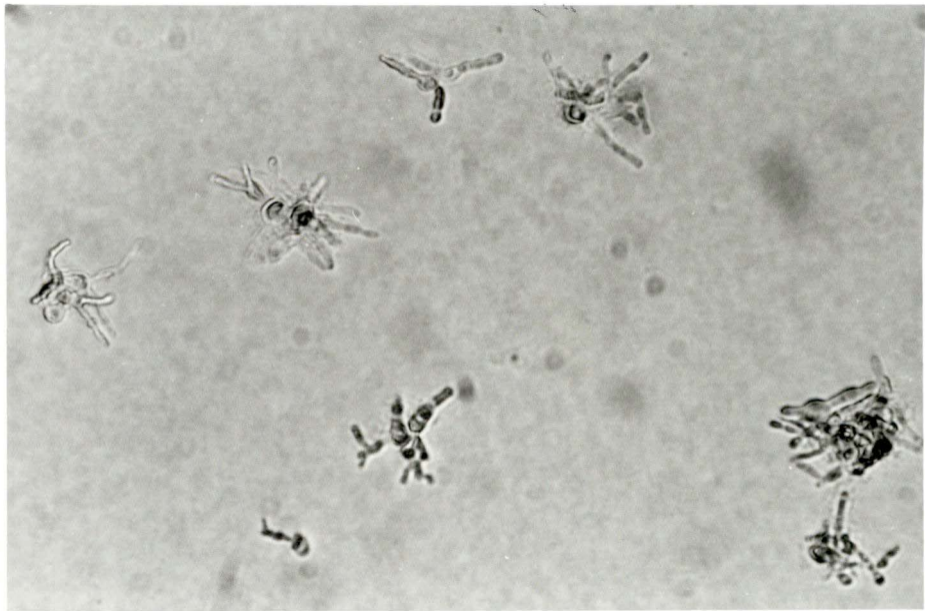
II 2



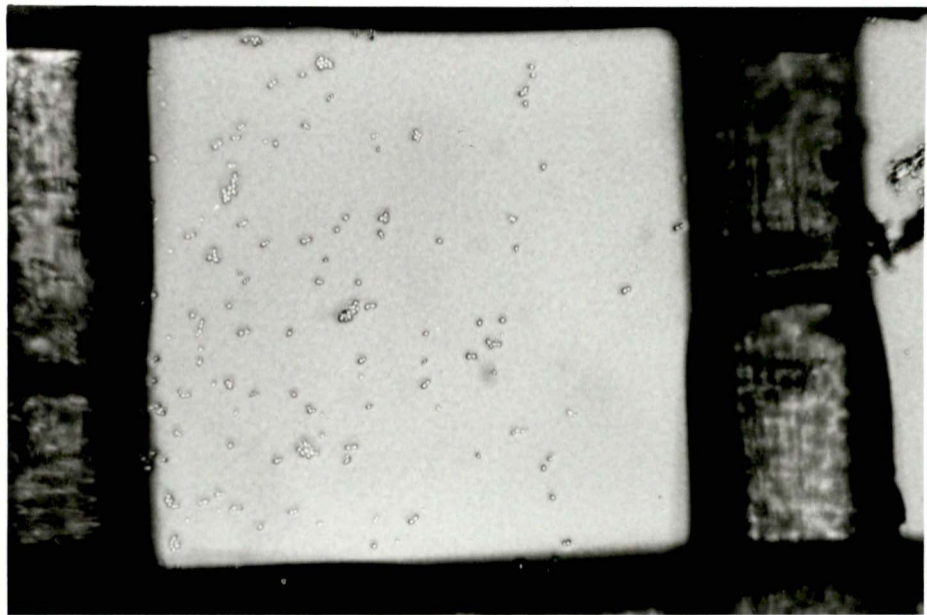
II f



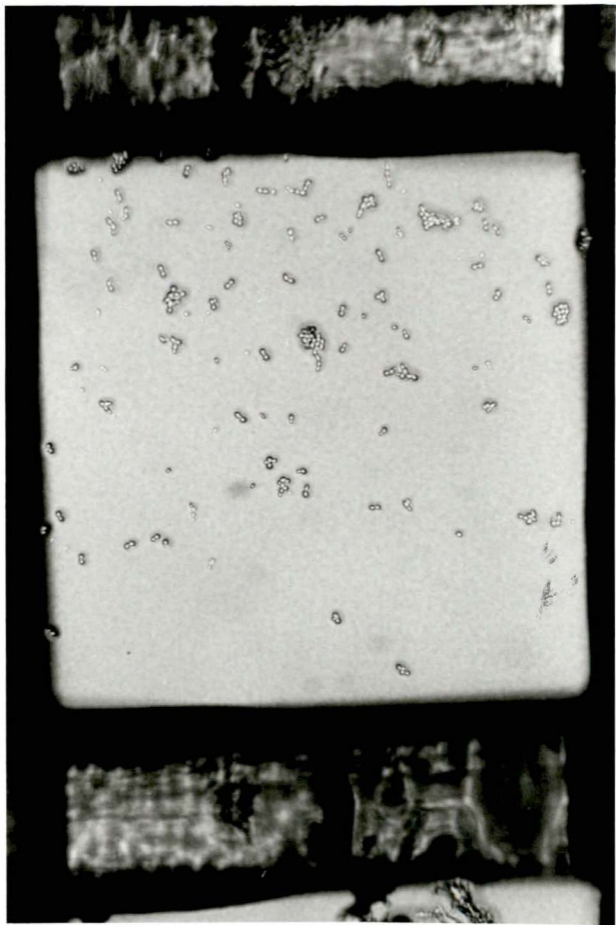
811



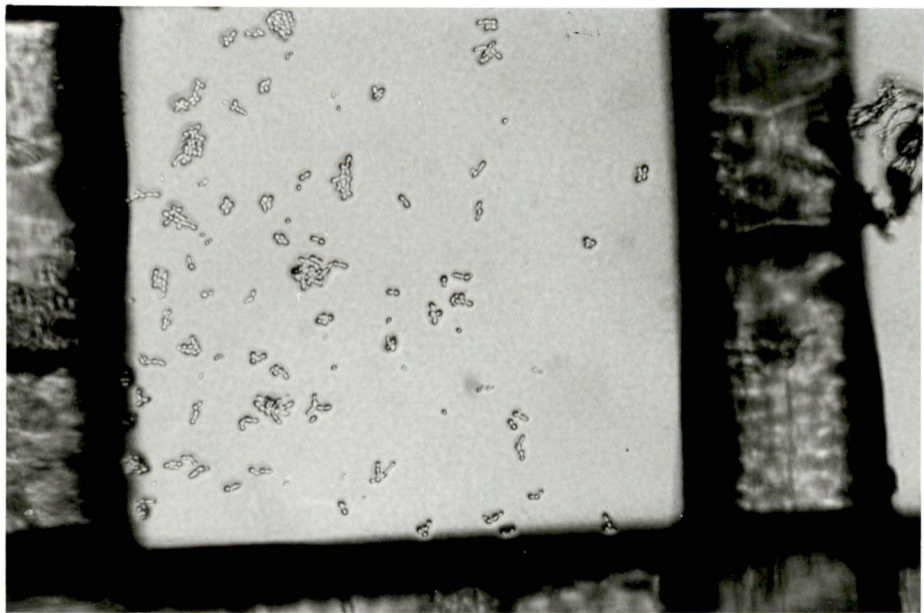
Ik



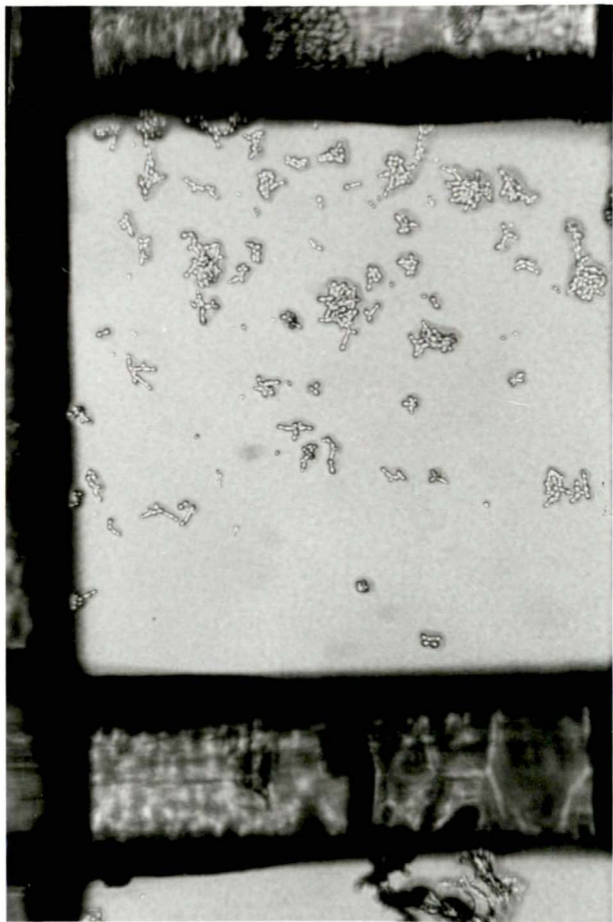
III a



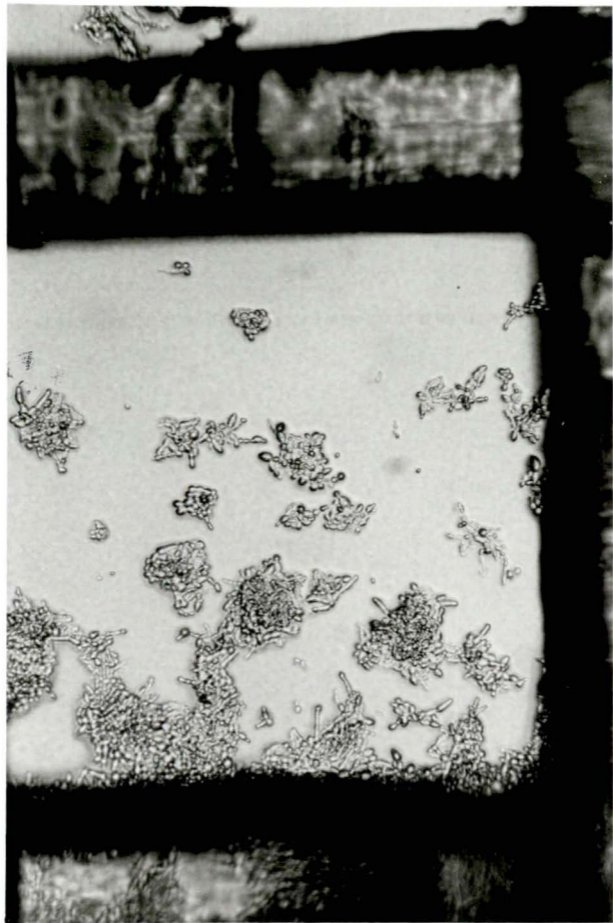
9. III



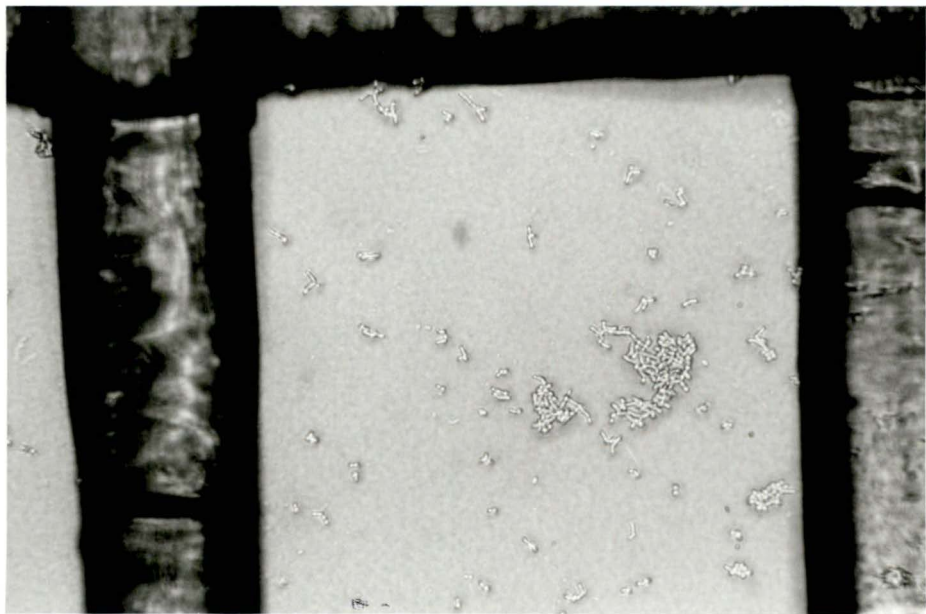
IIIc



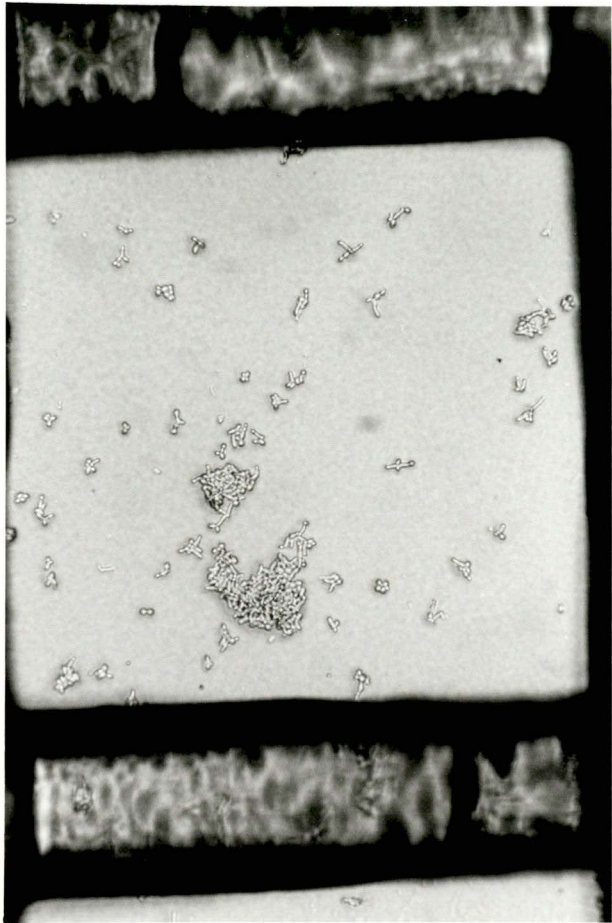
III d



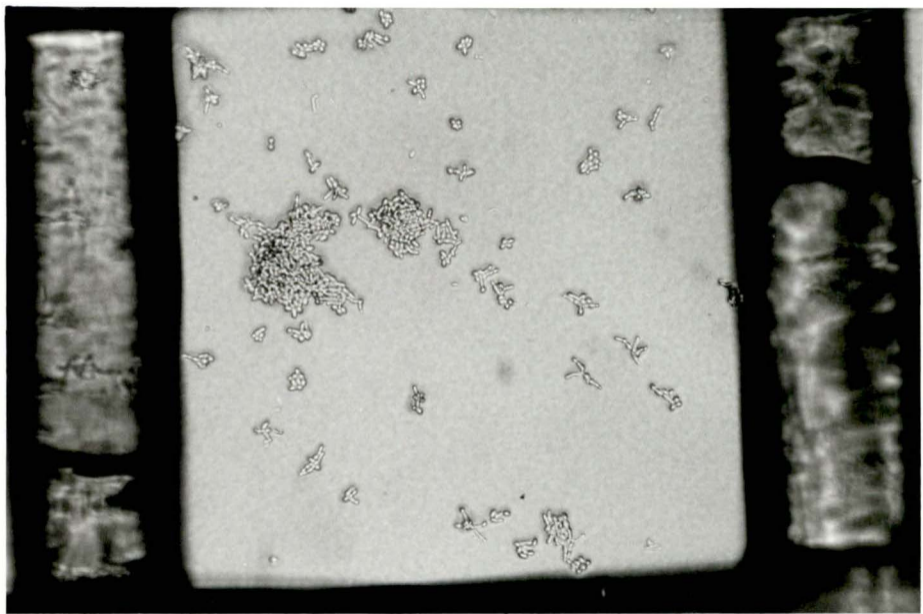
IIe



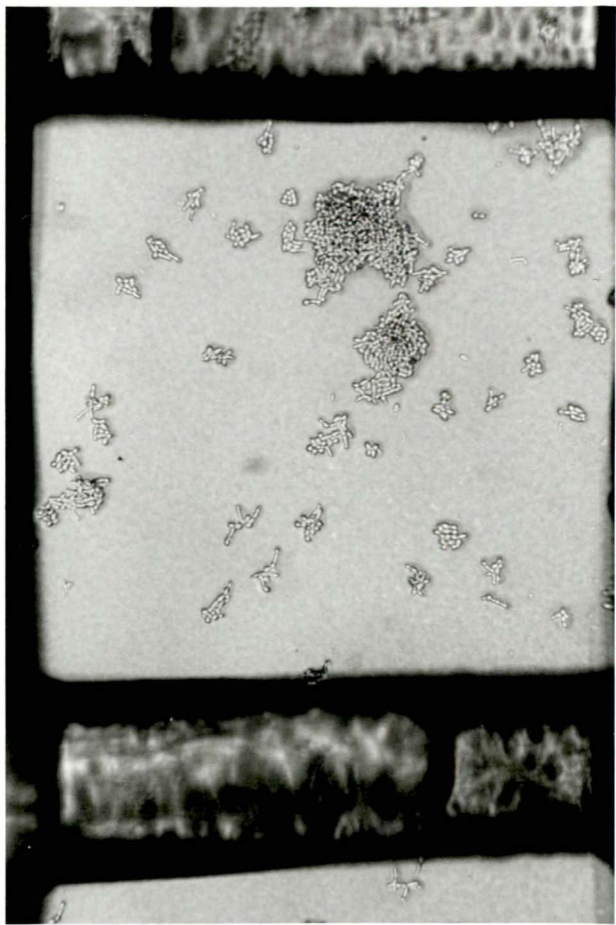
IVa



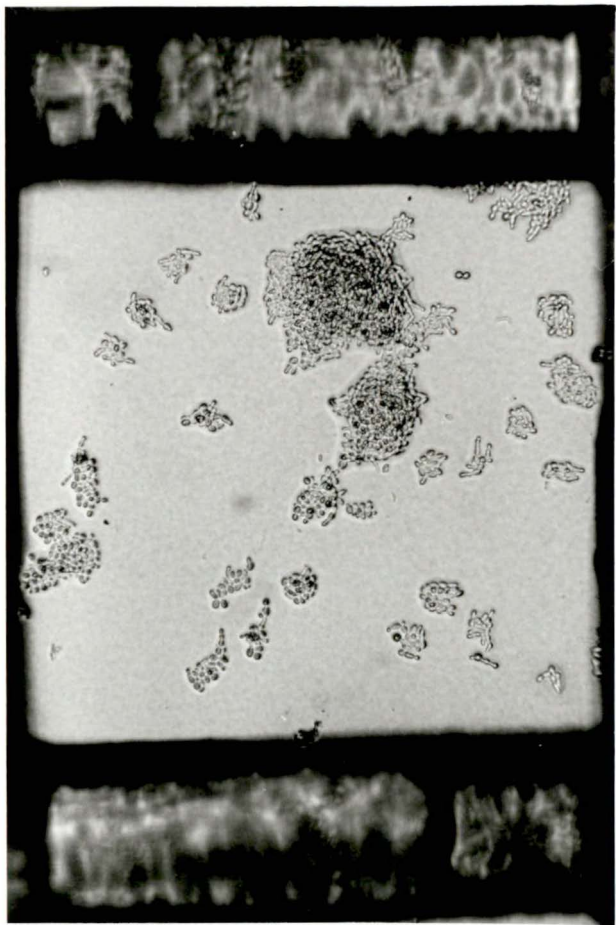
11/19



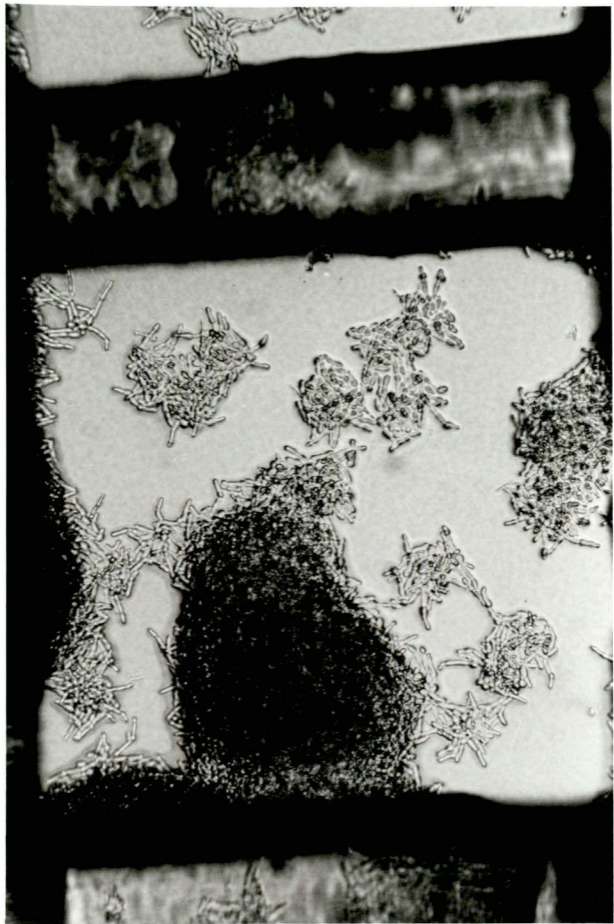
IVc



р
IV



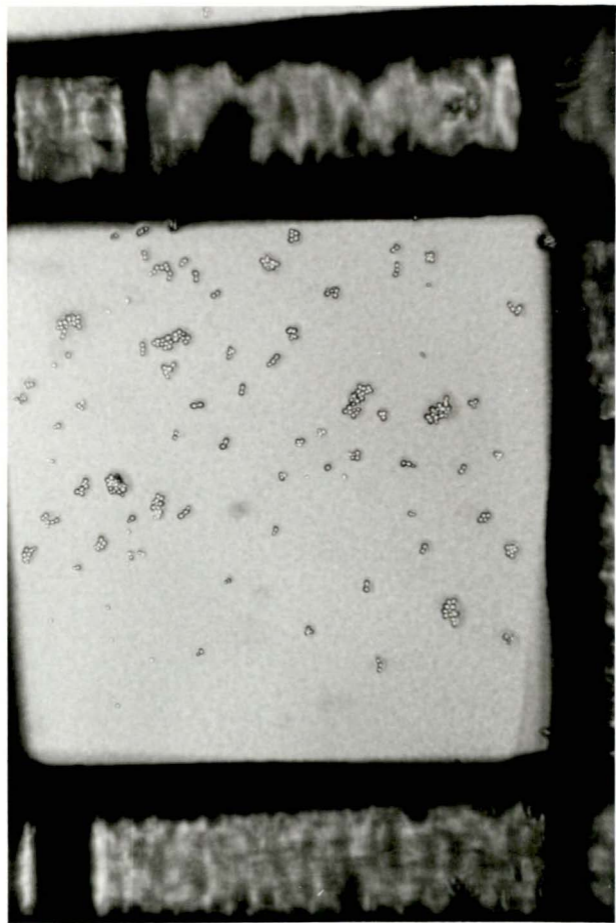
IVe



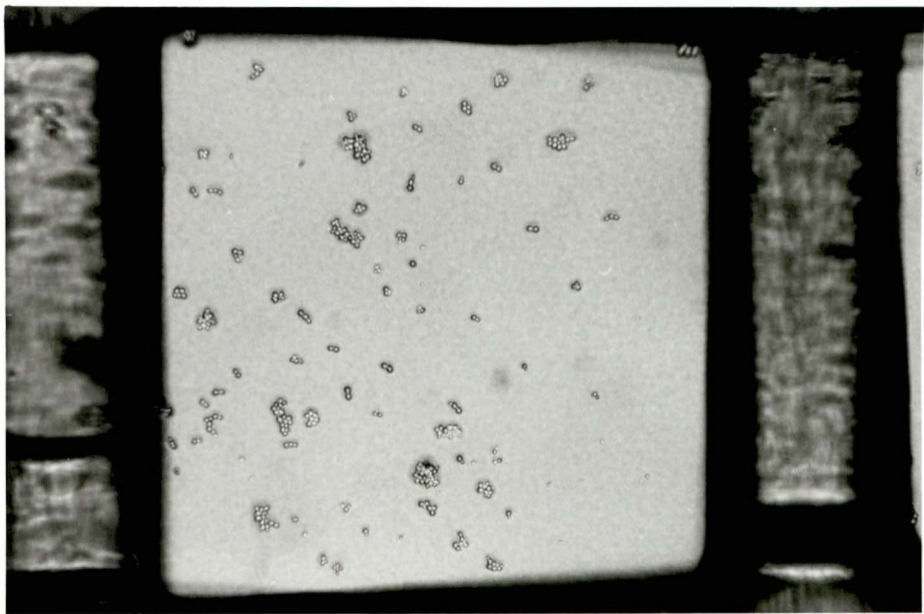
IV 8



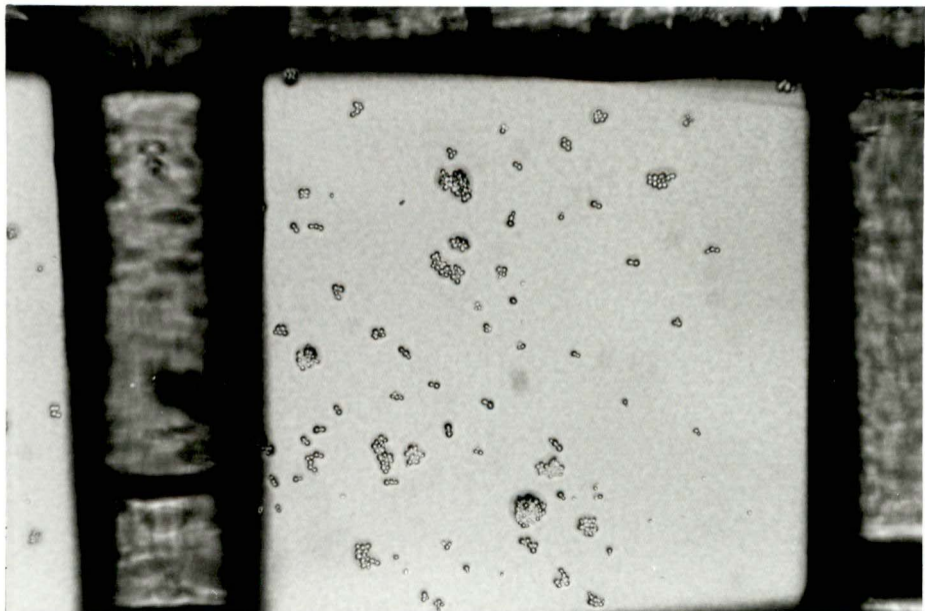
IVg



Ia



IIb



I_c