ÉTUDE DU CONTROLE GENETIQUE DU CARACTERE "COLONIE LISSE" CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIÆ* HANSEN

P. GALZY et C. BIZEAU

Station de Technologie Agricole, Centre de Recherches Agronomiques du Midi, Montpellier

Received 24.viii.64

1. INTRODUCTION

Au cours d'un travail précédemment exposé (Galzy, 1964a), des mutants faciles à caractériser par leur morphologie coloniale sur des milieux gélosés où le substrat carboné n'est pas fermentescible (acide lactique, acide acétique, éthanol, etc.), ont été mis en évidence. Ils ont été appelés "colonie lisse". Ces mutants sont en outre caractérisés par une croissance plus rapide sur acide lactique et sur éthanol. Ils sont, de ce fait, sélectionnés au cours de cultures successives sur des milieux synthétiques où ces substrats constituent la seule source de carbone. Leur étude est considérablement facilitée par leur morphologie coloniale; il est rare, en effet, qu'une modification physiologique importante (vitesse de croissance sur acide lactique) soit liée à une caractéristique morphologique facilement repérable. Il est d'autre part assez simple d'obtenir ces mutations puisqu'elles sont sélectionnées dans des conditions de culture bien définies.

Le présent travail s'est fixé 2 objectifs: étudier le contrôle génétique du caractère "colonie lisse" chez la levure; déterminer si les mutations sélectionnées sont toujours les mêmes ou au contraire différent en fonction du substrat utilisé.

2. MATERIEL ET METHODES

(a) Milieux de culture

Un milieu synthétique liquide ayant comme seule source de carbone l'acide lactique ou l'éthanol a été utilisé. La préparation de ce milieu (milieu G) a été décrite précédemment (Galzy, 1964b).

Le phénotype des diverses souches (colonie lisse ou colonie plissée) est testé sur un milieu gélosé 4 pour cent. à base d'yeast extract Difco 0,5 pour cent. et d'acide lactique 0,5 pour cent. dont le pH est réglé entre 5 et 6 à l'aide de potasse (milieu C). Le même milieu est également utilisé en remplaçant l'acide lactique 0,5 pour cent. par l'éthanol 0,5 pour cent. (milieu E).

(b) Matériel biologique

Les deux souches utilisées présentent des besoins en facteurs de croissance complémentaires (Clavilier, L., 1962); elles proviennent du laboratoire du Professeur Roman. Leurs génotypes sont les suivants:

4021 D3	<i>a</i>	<i>ad</i> ₃₋₆	<i>ad</i> ₂	<i>hi</i> ₁	<i>tr</i> ₁	<i>me</i> ₁
6153 C9	α	<i>ad</i> ₃₋₃	<i>ad</i> ₆	<i>ur</i> ₁	...	...

Pour simplifier la nomenclature, elles seront appelées au cours de l'exposé D et C respectivement.

Ces souches sont complémentaires pour uracile, méthionine et tryptophane ce qui rend leur croisement aisé. Elles ont toujours donné des ségrégations régulières pour leurs divers marqueurs.

(c) *Techniques génétiques*

Les croisements sont effectués dans un tube à essais contenant un milieu de culture liquide (yeast extract 0,5 pour cent., glucose 0,5 pour cent.). Après 24 heures, on observe de nombreuses figures de copulation. Les deux souches parentes présentent des besoins en facteurs de croissance différents; la culture est étalée sur un milieu synthétique ne contenant pas ces facteurs mais pouvant contenir éventuellement les facteurs dont les deux souches ont besoin (milieu minimum). Les cellules diploïdes issues du croisement donnent une colonie alors que les parents haploïdes ne poussent pas.

La dissection des asques est effectuée au micromanipulateur de Fonbrune en chambre de Hawthorne suivant la technique de Johnston et Mortimer (1958). Il est possible d'effectuer ainsi l'analyse des tétrades. Les souches sont mises à sporuler sur milieu de Fowel modifié.

La ségrégation des marqueurs a été testée, ce qui a permis d'éliminer les ségrégations aberrantes ou les contaminations. Les souches sont ensemencées sur milieu gélosé contenant tous les facteurs de croissance moins un. La ségrégation du signe est étudiée en croisant avec une souche test et en cherchant les figures de copulations sous le microscope.

3. CONTROLE GENETIQUE DE LA MUTATION

" COLONIE LISSE "

(a) *Mutants sélectionnés sur acide lactique*

A l'origine, les souches C et D présentent des colonies plissées dans les étalements sur les milieux gélosés à base d'acide lactique ou d'éthanol comme seule source de carbone. Des mutants " colonies lisses " ont été obtenus à partir de chacune d'entre elles. Afin d'être assuré que chaque mutation provient d'un événement génétique indépendant, nous avons procédé comme suit: quelques clones plissés d'origine monocellulaire sont isolés par étalement sur milieu gélosé à base d'acide lactique et prélèvement d'une colonie plissée. Ces clones plissés sont cultivés indépendamment sur un milieu liquide à base d'acide lactique (G lactate). Après avoir effectué une dizaine de générations cellulaires, ces cultures sont étalées sur un milieu solide à base d'acide lactique. Le prélèvement d'une seule colonie lisse à partir de chaque clone, permet d'affirmer que chaque colonie isolée provient d'un événement mutationnel indépendant.

Les mutants isolés ont été croisés chacun avec une souche sauvage à phénotype plissé. Les diploïdes obtenus sont plissés et l'analyse des tétrades révèle une ségrégation (2 plissées-2 lisses) monofactorielle. Le croisement en retour des descendants lisses avec le parent muté donne toujours des diploïdes lisses dont la descendance est entièrement lisse. Chaque fois que cela a été possible, les deux souches lisses provenant d'un même asque ont été croisées avec leur parent lisse ou ont été croisées entre elles.

Dans la partie supérieure droite du tableau 1 nous indiquons le nombre de ditypes parentaux (P) ditypes recombinés (R) et tétratypes (T) suivant la représentation : $\frac{P : R}{T}$.

La partie gauche du tableau donne le pourcentage de recombinaison et le pourcentage de tétratype.

TABLEAU 1
Résultats des divers croisements impliquant les gènes pl

	pl_1	pl_2	pl_3	pl_4	pl_5	pl_7	pl_8
pl_1		$\frac{4:1}{24}$	$\frac{4:3}{3}$	$\frac{2:1}{6}$	$\frac{0:2}{5}$	$\frac{0:1}{5}$	$\frac{2:4}{3}$
pl_2	45-83		$\frac{0:0}{6}$	$\frac{18:23}{9}$	$\frac{4:3}{7}$	$\frac{1:2}{4}$	$\frac{1:6}{0}$
pl_3	63-20	50-100		$\frac{2:0}{8}$	$\frac{2:1}{6}$	$\frac{2:3}{8}$	$\frac{1:3}{6}$
pl_4	45-67	55-18	40-80		$\frac{1:2}{6}$	$\frac{1:1}{4}$	$\frac{5:3}{2}$
pl_5	64-71	46-50	45-67	55-67		$\frac{1:4}{9}$	$\frac{1:2}{2}$
pl_7	58-83	57-57	54-62	50-67	61-64		$\frac{1:3}{6}$
pl_8	61-33	86-0	60-60	40-20	60-40	60-60	

Des tests d'allélisme ont été effectués pour 16 mutations indépendantes en croisant systématiquement les mutants entre eux; pour ceux qui étaient de même signe, des descendants de leur croisement respectif avec une souche sauvage ont été utilisés. Sept gènes non alléliques ont été ainsi mis en évidence: pl_1 , pl_2 , pl_3 , pl_4 , pl_5 , pl_7 et pl_8 . L'allèle muté récessif est désigné par pl et l'allèle sauvage plissé par PL.

L'étude des relations de linkage entre les divers loci est résumée dans le tableau 1. Les sept gènes ne sont pas liés étroitement; cependant le nombre d'asques étudiés n'est pas très élevé et il n'est pas possible de conclure à une absence totale de liaison. L'étude de la ségrégation des gènes de la série pl avec le gène tr_1 qui est situé à une unité du centromère du 4ème chromosome (Hawthorne et Mortimer, 1960) permet de mettre en évidence la liaison de certains d'entre eux avec le centromère (tableau 2). Les trois gènes pl_2 , pl_4 et pl_8 sont liés au centromère et se trouvent donc sur des chromosomes différents puisqu'ils ne sont pas liés entre eux.

(b) Mutants sélectionnés sur éthanol

La sélection sur acide lactique de mutants colonie lisse et l'étude de ces mutants ont permis de mettre en évidence un nombre élevé de gènes

indépendants. Il est donc permis de se demander si les mutants “ colonies lisses ” sélectionnés sur éthanol et sur acide lactique sont les mêmes ou correspondent au contraire à la mutation de loci différents. Pour aborder ce problème, des mutants ont été isolés après culture prolongée de la souche D sur éthanol.

Le phénotype des diploïdes obtenus dans chaque croisement est indiqué par les lettres P (plissé) ou L (lisse). La dernière colonne donne le gène mis en évidence.

Ces mutants sont désignés par le nom de la souche d'origine suivi de la lettre L et d'un numéro d'ordre. Les précautions décrites au paragraphe précédent ont été prises afin d'être assuré que les 25 mutants isolés correspondent tous à des mutations indépendantes. Ces mutants ont servi ensuite à effectuer des tests fonctionnels d'allélisme en utilisant les souches tests suivantes :

CL ₁	α	<i>pl</i> ₁	<i>ad</i> ₃₋₃	<i>ad</i> ₆	<i>ur</i> ₁
3/18 <i>a</i>	α	<i>pl</i> ₂	<i>ur</i> ₁	...	...
150/5 <i>b</i>	α	<i>pl</i> ₃	<i>ur</i> ₁	...	...
21/2 <i>c</i>	α	<i>pl</i> ₄	<i>ur</i> ₁	<i>tr</i> ₁	...
CL ₄	α	<i>pl</i> ₅	<i>ad</i> ₃₋₃	<i>ad</i> ₆	<i>ur</i> ₁
CL ₈	α	<i>pl</i> ₇	<i>ad</i> ₃₋₃	<i>ad</i> ₆	<i>ur</i> ₁
175/1 <i>b</i>	α	<i>pl</i> ₈	<i>ur</i> ₁	<i>me</i> ₁	...

Il apparait tout de suite que plusieurs mutations ont été retrouvées à la fois après sélection sur éthanol et après sélection sur acide lactiques. Parmi 25 mutants sélectionnés par culture prolongée sur éthanol, le gène *pl*₂, *pl*₅ et *pl*₇ ont été mis en évidence une fois chacun et le gène *pl*₄ 5 fois. Il est remarquable que 17 mutants sur les 25 étudiés aient muté pour des gènes nouveaux.

4. DISCUSSION

Au cours de la croissance sur acide lactique ou sur éthanol, des mutants caractérisés par la morphologie coloniale sont sélectionnés (Galzy, 1964*a*). L'étude du contrôle génétique du caractère “ colonie lisse ” montre qu'il est soumis à un mécanisme simple. Chez une souche haploïde de phénotype plissé, la mutation d'un seul gène PL→*pl* provoque l'apparition du phénotype lisse. Le gène muté est récessif devant son allèle sauvage ce qui facilite la réalisation de tests fonctionnels d'allélisme.

Plusieurs conclusions s'imposent :

1. Les loci impliqués dans le phénomène sont extrêmement nombreux. Or, la mutation de l'un quelconque de ces loci aboutit toujours à la réalisation d'un phénotype identique ou, tout au moins, très voisin.

2. Des clones ayant muté pour les loci *pl*₂, *pl*₄, *pl*₅ et *pl*₇ ont été sélectionnés par culture prolongée sur acide lactique et sur éthanol. Ce résultat est à rapprocher du fait que les différences de morphologie

coloniale entre souches sauvages et souches mutantes peuvent être mises en évidence indifféremment sur ces deux substrats. Il est donc possible que les mêmes mutations soient sélectionnées sur alcool et sur acide lactique.

3. Cependant, les fréquences d'isolement de mutations pour les divers loci ne semblent pas les mêmes quand la sélection a été faite sur acide lactique et sur éthanol. Dans le 1^o cas, le gène pl_4 n'avait été trouvé qu'une fois parmi 16 mutants alors que le gène pl_1 l'avait été 5 fois. Dans le 2^{ème} cas au contraire, pl_4 a été mis en évidence 5 fois et pl_1 n'a pas été retrouvé parmi 25 mutants étudiés.

Il paraît difficile d'admettre que tous les gènes mis en évidence aient un effet primaire identique. Il sera particulièrement intéressant de comparer au niveau physiologique le mode d'action des gènes pl_1 et pl_4 .

5. RESUME

L'étude de mutants "colonie lisse" sélectionnés par culture prolongée sur acide lactique a permis de mettre en évidence sept loci indépendants: la présence dans une souche haploïde de l'un quelconque des gènes mutés lui assure le phénotype lisse; les gènes mutés sont récessifs en présence de leur allèle sauvage. Trois loci (pl_2 , pl_4 et pl_8) sont liés au centromère. Les mutants "colonie lisse" sélectionnés par culture prolongée sur éthanol peuvent présenter une mutation pour l'un des loci précédents ou pour des loci nouveaux.

6. SUMMARY

A study of the "smooth colony" mutants selected by prolonged culture on lactic acid has shown that the causal genes can be mapped at seven independent loci. The presence of any one of these mutant genes in a haploid strain leads to the mutant phenotype. The mutant genes are recessive. Three of the seven loci (pl_2 , pl_4 and pl_8) show linkage with centromeres. "Smooth colony" mutants selected by prolonged culture on ethanol are the result of mutation at either one of these seven loci or at new loci.

7. BIBLIOGRAPHIE

- CLAVILIER, L. 1962. Recherches sur la spécificité génétique de l'inhibition par l'histidine des reversions chez la levure *S. cerevisiae*. *Thèse Paris*.
- GALZY, P. 1964a. Variations génétiques de la levure au cours de la croissance sur des substrats non glucidiques. *Heredity*, 19, 731-733.
- GALZY, P. 1964b. Etude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *S. cerevisiae*. *Thèse Ann. Techn. Agric.*, 13, 109-259.
- HAWTHORNE, D. C., ET MORTIMER, R. K. 1960. Chromosomes mapping in *Saccharomyces cerevisiae*; Centromère—Linked genes 1-2. *Genetics*, 1085-1110.
- JOHNSTON, J. R., ET MORTIMER, R. K. 1959. Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. *J. of Bacteriology*, 78, 2, 292.