COMPLEMENTATION ENTRE MUTANTS A DEFICIENCE RESPIRATOIRE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: ETABLISSEMENT ET REGULATION DE LA RESPIRATION DANS LES ZYGOTES ET DANS LEUR PROCHE DESCENDANCE

HEDWIG JAKOB

Laboratoire de Génétique Physiologique du CNRS, Gif-sur-Yvette (Seine et Oise), France

Received January 22, 1965

AU cours de leurs recherches sur les mutants à déficience respiratoire chez la levure, EPHRUSSI et ses collaborateurs (1949–1955) ont pu établir que la synthèse des enzymes respiratoires est sous le contrôle à la fois de gènes mendéliens et d'un facteur cytoplasmique. La déficience respiratoire peut être provoquée soit par la mutation d'un seul gène, soit par la perte ou l'inactivation du facteur cytoplasmique. On connaît deux classes de mutants à déficience respiratoire: (1) les mutants chromosomiques ou "petites ségrégantes" (CHEN, EPHRUSSI et HOTTINGUER 1950; SHERMAN 1963; SHERMAN et SLONIMSKI 1964) chez lesquels la déficience est due à la présence d'un seul gène récessif; (2) les mutants cytoplasmiques ou "petites végétatives" qui présentent une hérédité non mendélienne (EPHRUSSI et collaborateurs, 1949; WRIGHT et LEDERBERG 1957) où les déficiences, toujours multienzymatiques (SLONIMSKI 1953), sont attribuées à la perte ou à l'inactivation du facteur cytoplasmique. D'après leur comportement dans le croisement avec une levure à respiration normale ces derniers mutants peuvent être classés en deux catégories: les "petites suppressives" imposant le caractère de "petite" aux zygotes et à leur descendance végétative et les "petites neutres" donnant des zygotes à descendance végétative presque exclusivement composée de cellules à respiration normale (EPHRUSSI, HOTTINGUER et ROMAN 1954).

Alors que le croisement entre deux mutants cytoplasmiques neutres conduit toujours à la formation de zygotes "petites," dont la descendance végétative est entièrement composée de cellules "petites," le croisement soit entre un mutant chromosomique et un mutant cytoplasmique neutre, soit entre deux mutants chromosomiques non alléliques conduit à la formation de zygotes dont la grande majorité donne une descendance végétative composée de cellules "grandes," capables de synthétiser les enzymes respiratoires. On en a inféré que, en l'absence du gène dominant, le facteur cytoplasmique présent chez les mutants chromosomiques demeure "inactif."

L'expression de la fonction respiratoire peut être suivie dès la réunion dans une même cellule, le zygote, des déterminants génétiques requis pour la synthèse normale des enzymes respiratoires. L'établissement de la respiration peut être étudié dans les zygotes, immédiatement après leur formation et dans leur proche descendance végétative. Cette étude présente un intérêt tout particulier pour

comprendre comment le système respiratoire, non fonctionnel dans les deux cellules parentales, peut devenir fonctionnel dans les cellules issues de leur fusion.

L'objet du présent travail est de déterminer quelques unes des relations entre les divers gènes mutés et le facteur cytoplasmique, et l'influence de ces gènes et des effets biochimiques qu'entraîne leur mutation, sur les mécanismes impliqués dans le développement de la fonction respiratoire.

MATERIEL ET TECHNIQUES

L'étude de l'établissement de la respiration dans les croisements entre deux mutants capables de se compléter a été effectuée, suivant le schéma expérimental type représenté dans la figure 1. Elle porte sur des zygotes (formés en un temps court, au plus égal à 1,5 heures) immédiatement après leur formation (temps zéro, t_0) et pendant 20 heures sur leur proche descendance (à des intervalles de temps de 2 heures).

1. *Nomenclature*: Les abréviations suivantes seront utilisées:

"G": cellules "grandes," normales du point de vue des enzymes respiratoires.

c.f.c.: Nombre de cellules ou de groupes de cellules formant une colonie.

Temps de latence "TL 250": Temps en heures écoulé depuis la formation des zygotes pour que la vitesse de respiration aux dépens de l'éthanol atteigne $250 \mu\text{l O}_2/\text{heure}/10^8$ c.f.c. "grandes". (Consommation d' O_2 mesurée dans l'appareil de Warburg pendant l'adaptation respiratoire, en l'absence de source exogène d'azote, entre la quatrième et la sixième heure).

La nomenclature et les symboles que nous utiliserons sont ceux adoptés par SHERMAN et EPHRUSSI (1962). P et p désignent respectivement gène sauvage dominant et son allèle récessif muté.

ρ^+ et ρ^- désignent la présence ou l'"absence" du facteur cytoplasmique.

ρ^-_n indique que le mutant cytoplasmique est neutre (EPHRUSSI, HOTTINGUER et ROMAN 1955; EPHRUSSI et GRANDCHAMP 1965). Les mutants ρ^- utilisés dans ce travail étaient tous neutres, c'est-à-dire que le croisement avec une souche $P\rho^+$ donne une descendance diploïde entièrement composée de cellules normales du point de vue respiratoire. Dans ce qui suivra nous omettrons partout l'indice n .

Les souches utilisées appartiennent aux quatre types suivants (CHEN, EPHRUSSI et HOTTINGUER 1950): (a) Type sauvage, "grande": $P\rho^+$; (b) Mutants chromosomiques, "petites ségrégantes": $p_x\rho^+$; (c) Mutants cytoplasmiques neutres, "petites végétatives": $P\rho^-_n$; (d) Mutants doubles neutres, "petites doubles": $p_x\rho^-_n$.

2. *Souches*: Les croisements ont toujours été effectués entre des souches haploïdes et auxotrophes. Les mutants chromosomiques proviennent, à l'origine, des souches isolées par CHEN et par PITTMAN. Les gènes ont été étudiés par HAWTHORNE et MORTIMER (1960) et par SHERMAN (1963). La nomenclature utilisée est celle de ces derniers auteurs.

Mutants cytoplasmiques neutres:

C-982-19 dA₁ $\alpha P\rho^- tr_1 hi_1$

55R-5-3C-11 $\alpha P\rho^- ur$

Mutants chromosomiques:

1275-2B $\alpha p_1\rho^+ ad_3$ (provenant de D. HAWTHORNE)

H.J.11-5A-3/3 $\alpha p_1\rho^+ ad_3 hi_1$ (provenant d'un croisement de la souche précédente).

D.243-2B-5/3 $\alpha p_2\rho^+ ad_1 ly_2$ (provenant de F. SHERMAN)

H.J.18-1A $\alpha p_2\rho^+ hi_1$ (provenant d'un croisement de la souche précédente).

SG2-1C $\alpha p_3\rho^+ ad_1 ly_2$ (provenant d'un croisement de la souche F. SHERMAN, D213-9B).

H.J.22-26C $\alpha p_3p_7\rho^+ hi_1$ (provenant d'un croisement des souches H.J.18-1A et SG2-1C.)

Au cours de la multiplication végétative des souches de "petites ségrégantes", des "petites doubles" ($p_x\rho^-$) prennent toujours naissance. Lors du croisement avec une cellule $P\rho^-_n$ les cellules de type $p_x\rho^-$ forment des zygotes à descendance entièrement "petites". Il était important pour

notre étude de travailler avec des souches de "petites ségrégantes" contenant peu de cellules $p_x\rho^-$. Par sous-clonage des souches originales nous avons isolé des clones des mutants $p_5\rho^+$ et $p_7\rho^+$ contenant environ 5 à 30% de cellules $p_x\rho^-$. Il n'a pas été possible d'isoler une souche $p_1\rho^+$ contenant une proportion de "petites doubles" ($p_1\rho^-$) inférieure à 70%.

"Petites doubles" neutres: Toutes les "petites doubles" sont des mutants spontanés issus par multiplication végétative des mutants chromosomiques énumérés ci-dessus; ils n'en diffèrent du point de vue génétique, que par le caractère ρ^- . Toutes ces "petites" sont neutres et ont été choisies parmi de nombreux clones ρ^- isolés:

1275-2B-13	$\alpha p_1\rho^- ad_8$
H.J.11-5A-3/3-15	$\alpha p_1\rho^- ad_8 hi_1$
D.243-2B-5/3-a	$\alpha p_7\rho^- ad_1 ly_2$
H.J.18-1A-a	$\alpha p_7\rho^- hi_1$
SG2-1C-1	$\alpha p_5\rho^- ad_1 ly_2$

Souches diploïdes: Ces souches sont issues du croisement entre deux mutants capables de se compléter. Elles ne diffèrent des souches que nous étudierons plus loin que par le grand nombre de générations cellulaires effectuées depuis la formation des zygotes. Elles sont prototrophes et normales du point de vue des enzymes respiratoires ("grandes").

H.J.17 issue du croisement entre SG2-1C et C-982-19dA₁ (α/α ; p_5/P ; ρ^+ ; $ad_1/+$; $ly_2/+$; $tr_1/+$; $hi_1/+$).

H.J.18 issue du croisement entre D-243-2B-5/3 et C982-19dA₁ (α/α ; p_7/P ; ρ^+ ; $ad_1/+$; $ly_2/+$; $tr_1/+$; $hi_1/+$).

3. Composition des milieux de culture:

Milieux complets:

YPG: yeast extract Difco 10 g; Bacto-peptone Difco 10 g; glucose 20 g; eau distillée, 1000 ml.

YPGA: milieu précédent additionné de 40 mg/l de sulfate d'adénine.

Ye 3%: yeast extract Difco 5 g; glucose 30 g; eau distillée 1000 ml.

3 S: yeast extract Difco 10 g; PO₄H₂K, 1 g; SO₄(NH₄)₂, 1,2 g; glucose, 60 g; eau distillée 1000 ml.

3 S+E: milieu précédent additionné de 1% d'une solution d'ergostérol-Tween (250 mg d'ergostérol + 25 ml de "Tween 80" + 75 ml d'éthanol).

Milieu minimal Go (selon GALZY et SŁONIMSKI, 1957):

SO₄Mg₂, 0,5 g; SO₄(NH₄)₂, 2,0 g; PO₄H₂K, 1,0 g; PO₄H₂NH₄, 6,0 g; ClNa, 0,1 g; Cl₂Ca, 0,1 g; pantothénate de Ca, 0,002 g; thiamine, 0,002 g; inositol, 0,002 g; pyridoxine, 0,002 g; acide nicotinique, 0,0005 g; biotine, 0,00002 g; chlorure ferrique, 0,002 g; eau distillée 1000 ml.

Ce milieu de base a été utilisé pour la préparation des milieux:

Go 3%: additionné de 3% de glucose,

GoD: additionné de 0,25% de glucose et de 2% (v/v) de glycérol,

GoGly: additionné de 2% (v/v) de glycérol.

Les milieux ont tous été gélifiés à 2%.

4. *Température de culture:* Les croisements et les cultures en milieu liquide ont toujours été effectués à 25°C; les cultures sur milieu gélifié à 30°C.

5. *Croisements:* Les croisements ont été effectués selon la technique de formation des zygotes synchrones (JAKOB 1962) légèrement modifiée. Au lieu d'utiliser des cultures ayant atteint la phase stationnaire de croissance, nous avons toujours croisé des cellules provenant de cultures (milieu YPG) en phase logarithmique (ayant atteint une densité de 4×10^7 cellules/ml). En effet, dans les cultures de mutants chromosomiques $p_x\rho^+$ apparaissent toujours des mutants réverses $P\rho^+$ présentant, en phase stationnaire de croissance, un fort avantage sélectif; la présence de tels mutants, normaux du point de vue de la respiration, est gênante pour notre étude. Les croisements (6×10^7 cellules/ml de chacune des deux souches parentales) ont été effectués en milieu Ye 3% en fioles d'Erlenmeyer de 6 litres contenant 600 ml de milieu. Les cellules ont été centrifugées 2 heures après le mélange des souches parentales puis, 30 minutes plus tard, le milieu a été renouvelé. Les zygotes ont été récoltés une heure et demie après ce traitement soit quatre heures après le mélange des deux souches parentales. A ce moment, le mélange de population contient environ 1 à 5% de zygotes (% déterminé par comptage direct). Les fusions

FIGURE 1.—Schéma expérimental type. Deux souches "petites" capables de se compléter, haploïdes, auxotrophes, de signe a et α respectivement sont croisées. Les zygotes diploïdes, "grandes" prototrophes, résultant du croisement sont ensemencés en milieu minimal glucosé où ils se multiplient. Le dénombrement des types cellulaires présents dans la culture et l'étude de leur respiration est effectué à intervalles réguliers, (voir 5 etc...). Voir MATÉRIEL ET TECHNIQUES, paragraphe 5.

ultérieures entre cellules des types parentaux sont arrêtées par refroidissement dans la glace et lavage du mélange de copulation à l'eau glacée. La grande majorité des zygotes étudiés sont formés de façon synchrone, la plupart des fusions se produisant entre la troisième et la quatrième heure. Ils constituent les échantillons du "temps zéro" (t_0) de toutes nos expériences.

6. *Multiplication végétative des zygotes*: Les croisements ont toujours été effectués entre deux souches haploïdes auxotrophes, de signes opposés, marquées par des déficiences biochimiques récessives différentes, les zygotes étudiés étant ainsi toujours prototrophes. Au "temps zéro" le mélange de copulation est ensemencé dans le milieu minimal glucosé Go 3% (densité initiale en zygotes $1,5 \text{ à } 2 \times 10^5/\text{ml}$), dans lequel seuls les zygotes et les cellules qui en sont issues se multiplient. Nous avons vérifié par des comptages directs au microscope et par étalement que, dans ce milieu minimal, les cellules auxotrophes des types parentaux ne sont plus capables de fusionner pour former de nouveaux zygotes et qu'elles se divisent au maximum une fois. Les cultures sont aérées à 25° . Des échantillons sont prélevés à des temps variables entre zéro et 24 heures (figure 1). Toutes les expériences ont été exécutées selon ce schéma. (Dans quelques expériences les cultures ont été conservées dans la glace pendant la nuit puis, réchauffées rapidement à 25° avant d'être remises en culture aérée. Nous avons vérifié que ce procédé ne modifiait ni la vitesse de croissance, ni les mesures manométriques décrites ci-dessous).

7. *Cultures en conditions d'anaérobiose*: Quelques cultures de souches "grandes" prototrophes ont été effectuées selon la technique décrite par SHORTMAN et FUKUHARA (1963). Après 20 divisions cellulaires environ, en anaérobiose, les cellules ont été lavées rapidement à 0°C . Elles ont été ensuite étudiées dans les mêmes conditions de culture (milieu Go 3% aéré) que les zygotes.

8. *Étalement sur milieux gélosés: dénombrement des différents types de colonies*. Tous les échantillons étudiés ont été étalés à la surface de différents milieux gélosés. Ces milieux permettent de connaître d'une part, le nombre total de cellules, qu'elles soient auxotrophes ou prototrophes (milieux complets) et d'autre part, celui des cellules prototrophes (milieu minimal). Sachant par ailleurs, que seules les cellules normales du point de vue respiratoire sont capables de croître aux dépens du glycérol comme seule source carbonée, nous pouvons connaître le nombre de cellules "grandes" et "petites".

Nous avons déterminé pour chacun des échantillons le nombre de cellules ou plus exactement de groupes de cellules formant une colonie, *c.f.c.*, après étalement sur les milieux suivants:

(a) *GoGly*, contenant comme seule source carbonée le glycérol. Seules les cellules prototrophes, normales du point de vue respiratoire au moment de l'étalement, forment une colonie.

(b) *GoD* contenant du glycérol et une faible quantité de glucose. Toutes les cellules prototrophes, qu'elles soient ou non pourvues des enzymes respiratoires au moment de l'étalement, peuvent croître aux dépens du glucose. On dénombre sur ce milieu, d'une part des colonies de petite taille provenant de cellules prototrophes génotypiquement "petites", d'autre part des colonies de grande taille. Une partie de ces dernières colonies peut provenir de cellules phénotypiquement "petites" au moment de l'étalement mais génotypiquement "grandes". Ces cellules peuvent acquérir, au cours du développement des colonies, la capacité respiratoire et croître alors aux dépens du glycérol pour former une colonie de grande taille. Il peut en résulter une discordance entre le nombre de *c.f.c.* "grandes" prototrophes déterminé sur les deux milieux *GoGly* et *GoD*, discordance qui fixe, à chaque moment, le phénotype des cellules à génotype "grande". Ainsi, dans l'exemple consigné dans le tableau 1, les échantillons prélevés aux temps " t_0 " et " t_2 " présentent cette discordance alors qu'au temps " t_0 " elle n'existe plus: génotype et phénotype sont alors, au moment de l'étalement, ceux d'une cellule "grande".

(c) *YPG*: milieu complet glucosé. Toutes les cellules qu'elles soient auxotrophes ou prototrophes croissent sur ce milieu.

(d) *YPGly*: milieu complet ne contenant que du glycérol; toutes les cellules "grandes" qu'elles soient prototrophes ou auxotrophes forment une colonie. L'étalement sur ce milieu permet de contrôler l'absence dans la culture, de mutations réverses du type p_p^- à p_p^+ . Si de telles mutations s'étaient produites avec une fréquence appréciable on devrait trouver ici un nombre plus élevé de colonies "grandes" que sur le milieu *GoD* ("grandes" prototrophes). Dans les cultures parentales (toujours étalées sur ce milieu) la fréquence des mutants réverses était toujours inférieure à $1 \text{ pour } 10^5$.

Les comptages sur les deux milieux glucosés *GoD* et *YPG* ont toujours été faits après coloration au chlorure de tétrazolium (OGUR, ST. JOHN et NAGAI 1957). Toutes les colonies colorables sont classées parmi les "grandes". Les comptages ont porté sur environ 400 colonies et ont été

TABLEAU 1

Nombre de colonies (c.f.c.) $\times 10^8$ "grandes" et "petites" dénombrées sur les différents milieux. Croisement $p_7\rho^+ \times p_1\rho^-$

Temps écoulé depuis la formation des zygotes	Prototrophes			Auxotrophes et prototrophes		
	GoGly	GoD		YPGly	YPG	
	"grandes"	"grandes"	"petites"	"grandes"	"grandes"	"petites"
0 hr (t_0)	0	0,2	0,009	0	0,2	0,8
2,0 hr (t_2)	0,01	0,3	0,05	0,03	0,4	0,8
6,0 hr (t_6)	1,5	1,8	0,2	2,0	1,9	1,5

Les échantillons sont prélevés dans le milieu de culture Go 3% et lavés deux fois à l'eau avant l'étalement. Les valeurs expérimentales n'ont pu être déterminées qu'à $\pm 10\%$ près.

effectués après 4 jours de croissance sur les milieux glucosés et après 5 jours sur les milieux contenant uniquement du glycérol.

Nous avons choisi comme unité de référence la colonie ou le c.f.c. bien que cette unité puisse ne pas correspondre, à tout moment, au nombre de cellules du type considéré effectivement présent dans la culture (voir ci dessus). Cependant un contrôle microscopique direct permet de vérifier que, dans les différents croisements, la plupart des zygotes se trouvent isolés au milieu de "grappes" de cellules haploïdes et que les colonies se développent, en général, à partir d'un seul zygote. De même, on peut vérifier par comptage direct que les cellules diploïdes, provenant de la division des zygotes sont en général seules ou associées par deux. Il n'y a pas formation de gros groupes au cours de leur multiplication végétative. Au cours du temps le rapport entre nombre de c.f.c. et nombre de cellules comptées directement reste constant. Les valeurs obtenues ont toujours été comparées entre elles et les erreurs systématiques, dues à l'unité de référence, sont du même ordre de grandeur pour les différents croisements étudiés.

9. *Mesures manométriques*: Les mesures manométriques ont été effectuées selon la méthode de Warburg. Nous avons utilisé l'éthanol (2, 5% v/v) comme seule source d'énergie. (Le glucose ne pouvait être utilisé comme source d'énergie à cause de la présence dans les échantillons étudiés de nombreuses cellules "petites" non fusionnées. Ces "petites" utilisent le glucose par fermentation et les variations des taux de dégagement de CO_2 fausseraient inévitablement la détermination de la consommation d' O_2 due à respiration des zygotes (SLONIMSKI 1958)). Les mesures sont faites sur les cellules en l'absence de source d'azote exogène, dans les conditions utilisées habituellement pour l'étude de l'adaptation respiratoire de cellules provenant de cultures en anaérobiose (SLONIMSKI 1956). Les vitesses de la consommation d' O_2 ont été déterminées sur une suspension de cellules dans du tampon phosphate/phtalate/succinate 0,1 M à pH 4,3 dans les conditions où la constante d'absorption de premier ordre du CO_2 est d'environ de $0,8 \text{ min}^{-1}$ (SLONIMSKI 1958).

Les mesures ont toujours été effectuées en double, pendant 6 heures, pour chacun des échantillons étudiés. Dans ces conditions de mesure il n'y a pas de changement notable du nombre de c.f.c. entre le début et la fin de la mesure. La plupart du temps les échantillons lavés ont été conservés 24 heures dans la glace avant la mesure. Ni mortalité, ni changement de vitesse de consommation d' O_2 n'interviennent pendant ce temps.

RESULTATS

Les cinétiques d'apparition de la respiration dans les différents croisements entre cellules "petites" capables de se compléter ont été étudiées immédiatement après la formation des zygotes et après des temps d'incubation croissants dans le milieu minimal glucosé (Go 3%) (figure 1).

A titre d'exemple examinons les résultats obtenus pour deux des croisements

FIGURE 2.—Vitesses de respiration aux dépens de l'éthanol ($\mu\text{l O}_2/\text{h}/10^8$ c.f.c. "grandes") mesurées pendant 6 heures dans l'appareil de Warburg. En haut: "Grandes" (souche H.J.17) après culture en anaérobiose. Echantillons prélevés après des temps variables de croissance en milieu Go 3% aéré: $\times t_0$, $\bigcirc t_2$, $\bullet t_4$, triangle blanc t_6 et polygone t_8 heures. En bas: croisement entre souches $p_5 p^+$ $\times$ $p_7 p^+$. Mesures effectuées sur des échantillons prélevés après des temps variables de croissance en milieu Go 3% aéré. $\times t_0$, $\bigcirc t_{0.5}$, triangle blanc t_1 , polygone t_2 , et $\bullet t_8$ heures.

étudiés (figure 2 et tableau 2). Les mesures manométriques ont été effectuées dans l'appareil de Warburg selon la technique décrite. Nous avons choisi comme unité de mesure de la vitesse de respiration, la consommation d'oxygène exprimée en $\mu\text{l}/\text{heure}/10^8$ c.f.c. "grandes" dénombrées sur milieu GoD, (diploïdes prototrophes de génotype "grandes"). (Pour obtenir le QO_2 , les valeurs sont à diviser par environ 2,5; 1×10^8 c.f.c. équivalent à 2,5 mg de matière sèche pour une levure diploïde "grande" cultivée dans nos conditions expérimentales).

L'évolution de la vitesse de respiration au cours de l'adaptation mesurée en l'absence de source exogène d'azote varie énormément suivant le temps écoulé depuis la formation des zygotes. En effet, dans le croisement étudié dans la figure 2 les zygotes (t_0) ne respirent pas: la consommation d' O_2 est nulle et le reste pendant les six heures de mesure. Après une heure de croissance dans le milieu minimal glucosé (t_1) la vitesse de respiration est notable pendant la première heure de mesure et, fait remarquable, elle s'accélère énormément par la suite. (La vitesse maximale est atteinte après 6 heures et nous avons vérifié qu'au cours des 4 heures suivantes elle ne change pas notablement). Par contre, après 8 heures de croissance dans le milieu Go 3% (t_8), la vitesse de respiration des cellules est importante dès la première heure mais elle ne s'accélère que peu par la suite.

A " t_s " les cellules ont perdu la propriété de pouvoir développer une vitesse de respiration très intense, propriété qui a été révélée au cours de l'adaptation à " t_1 ."

Pour tenir compte de cette propriété remarquable nous avons choisi comme mesure de référence, la vitesse de respiration aux dépens de l'éthanol, mesurée dans l'appareil de Warburg (en l'absence de source exogène d'azote) entre la 4ème et la 6ème heure.

Dans l'expérience du tableau 2 les résultats sont similaires. On voit en outre ici que les cellules parentales non fusionnées, présentes en grand nombre dans le mélange de copulation ainsi étudié, ne respirent que très faiblement. Des corrections tenant compte de cette faible consommation d'O₂ ont été effectuées pour toutes les mesures. (Ces corrections sont toujours peu importantes pour les consommations d'O₂ enregistrées lorsque les échantillons contiennent des cellules qui respirent (t_1 , t_2), mais elles sont relativement fortes lorsque la consommation d'O₂ enregistrée est très faible (t_0)).

Notons que les résultats des mesures manométriques et ceux de l'étalement sur milieu ne contenant que du glycérol (GoGly), sur lequel seules les cellules normales du point de vue des enzymes respiratoires forment des colonies, con-

TABLEAU 2

Respiration aux dépens de l'éthanol des zygotes et de leur proche descendance.
Croisement $p_5p^+ \times Pp^-$ (souches SG2-1C et C982-19dA₁)

Intervalle de temps (heures) pendant lequel la mesure est faite dans l'appareil de Warburg	Temps en heures écoulé depuis la formation des zygotes					Témoins*	
	0 (t_0)	0,5 ($t_{0,5}$)	1,0 ($t_{1,0}$)	1,5 ($t_{1,5}$)	2,0 ($t_{2,0}$)	p_5p^+	Pp^-
0-1 Mesure non corrigée	(35,0)	(91,2)	(198,0)	(209,8)	(211,0)		
Mesure corrigée	9,0	59,2	157,0	179,0	170,0	3,2	2,4
1-2	8,6	58,0	166,0	232,0	240,0	3,9	3,5
2-3	9,6	80,0	273,0	362,0	351,0	3,1	4,2
3-4	9,0	80,0	273,0	362,0	351,0	3,1	4,2
4-5	7,4	155,0	520,0	580,0	607,0	3,5	4,9
5-6 Mesure non corrigée	(16,2)	(241,8)	(720,0)	(753,0)	(785,0)		
Mesure corrigée	3,4	226,0	700,0	736,0	766,0	2,7	0
Moyenne/hr entre 4 et 6 = mesure de référence	5,4	190,0	610,0	658,0	686,0	3,1	2,5
Nombre de zygotes ou cel- lules diploïdes "grandes" sur lequel la mesure a été faite†	0,47.10 ⁸	0,38.10 ⁸	0,30.10 ⁸	0,40.10 ⁸	0,30.10 ⁸	2,2.10 ⁸	2,2.10 ⁸
Nombre de c.f.c. dénombrés sur GoGly§	0,08.10 ⁸	0,34.10 ⁸	0,36.10 ⁸	0,44.10 ⁸	0,28.10 ⁸	0	0
Nombre de colonies réél- lement comptées sur milieu GoD	569	458	398	484	399	0	0

Mesures effectuées dans l'appareil de Warburg. La consommation d'O₂ est exprimée en μ l et calculée par heure par 1×10^8 centres formateurs de colonies "grandes" dénombrés sur milieu GoD. Entre parenthèses, mesures non corrigées pour la consommation d'O₂ des cellules des types parentaux présentes dans chacun des échantillons.

* Cellules parentales ayant servi pour le croisement. μ l O₂/10⁸ c.f.c.

† c.f.c. sur milieu GoD dans la cupule de l'appareil de Warburg.

§ Dans le même échantillon.

cordent, (tableau 2). Lorsqu'aucune consommation d'O₂ n'est décelable (temps zéro) une très faible proportion des cellules formant une colonie "grande" sur milieu glucosé (GoD) est capable d'utiliser le glycérol seul pour la croissance. Au moment où la respiration s'établit (0,5 heure dans l'expérience décrite) la consommation d'O₂ devient mesurable dans l'appareil de Warburg et on trouve alors le même nombre de colonies "grandes" sur les deux milieux GoD et GoGly. Toutes les cellules "grandes" présentes dans la culture ont acquis, en même temps, la capacité respiratoire: la consommation d'O₂ enregistrée est due à l'ensemble de ces cellules.

Nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus avec des cellules diploïdes "grandes" (issues de cellules ayant le génotype "grande" depuis de nombreuses générations), maintenues en culture en absence d'air pendant environ 20 générations. De telles cellules sont dépourvues des enzymes respiratoires. Dans le milieu Go 3% aéré (t_0) ces cellules se divisent. L'adaptation respiratoire, c'est-à-dire la biosynthèse des enzymes respiratoires, le développement des structures mitochondriales ainsi que l'accélération de la vitesse de la consommation d'O₂ y est induite par l'oxygène (SLONIMSKI 1956; YOTSUYANAGI 1962). On peut voir dans la figure 2 (haut) que dans ce cas, la vitesse de la consommation d'oxygène, mesurée dans l'appareil de Warburg, est nulle pour les échantillons prélevés à t_0 et reste nulle pendant les 6 heures de mesure manométrique. Par contre les cellules prélevées après 2 ou 4 heures d'incubation dans le milieu Go 3% respirent dès la première heure de mesure, et la vitesse de la consommation d'O₂ s'accélère légèrement au cours des 6 heures de mesure (mesure toujours effectuée en l'absence de source exogène d'azote). La valeur maximale atteinte, entre la 4ème et la 6ème heure est de 250 μ l/heure/10⁸ c.f.c. "grande." Nous avons choisi cette valeur comme valeur de référence et, dans les expériences que nous allons décrire, nous avons défini comme *temps de latence* "TL 250" le temps écoulé depuis la formation des zygotes pour que cette valeur soit atteinte.

Notons encore ici, pour n'y revenir que plus loin, qu'au moment de l'établissement de la respiration dans les zygotes (temps t_1 et t_2 , figure 2) les cinétiques observées sont tout à fait remarquables. Nous ne savons pas actuellement si ces cinétiques sont caractéristiques de la respiration de tout zygote ou si au contraire elles sont particulières pour les zygotes issus de la fusion de "petites." Nous n'avons pu étudier jusqu'ici la respiration des zygotes issus du croisement d'une cellule "grande" (P_p^+) avec une "petite cytoplasmique neutre" (P_p^-), la respiration des cellules parentales "grandes" non fusionnées présentes en grand nombre dans le mélange de copulation étant trop importante pour connaître celle des zygotes.

I. *Délais précédant l'établissement de la respiration dans les zygotes*

Nous avons étudié la cinétique d'apparition de la respiration immédiatement après la formation des zygotes. Dans aucun des croisements entre mutants capables de se compléter les zygotes, au moment de leur formation, ne consomment une quantité d'oxygène suffisante pour être mesurable dans l'appareil de Warburg. Des temps de latence plus ou moins longs précèdent le fonctionnement effectif du système respiratoire.

1. *Complémentation dans les croisements entre différents mutants chromo-*

FIGURE 4.—Courbes de croissance en milieu Go 3% du témoin "grandes" (×) et des zygotes de divers croisements. A gauche croisements: ■ $P\rho^- \times p_5\rho^+$; ○ $P\rho^- \times p_7\rho^+$; □ $P\rho^- \times p_1\rho^+$; A droit croisements: ■ $p_7\rho^+ \times p_5\rho^+$; triangle noir $p_1\rho^+ \times p_5\rho^-$; □ $p_1\rho^+ \times p_7\rho^+$; ○ $p_7\rho^+ \times p_1\rho^-$; polygone $p_5p_7\rho^+ \times P\rho^-$; triangle blanc $p_7\rho^+ \times p_5\rho^-$.

Les délais différents d'apparition de la respiration ne s'expliquent pas par des différences des taux de croissance des zygotes. Tous se divisent, dans nos conditions expérimentales, immédiatement après leur formation avec un temps de génération d'environ 2 heures (figure 4). Seule la culture de cellules venant d'anaérobiose présente un temps de latence d'environ 2 heures avant que la division se fasse au même rythme que pour les zygotes.

Quant aux caractéristiques biochimiques, connues, des mutants chromosomiques utilisés, elles ne peuvent seules expliquer les temps de latence observés (0,7, 4,7 et 11,5 heures). En effet, alors que les souches $p_5\rho^+$ et $p_7\rho^+$ se distinguent par la présence ou l'absence de cytochrome *b* et de succino-cytochrome-c-réductase (tableau 3) la mutation aux loci p_1 et p_7 respectivement, entraîne les mêmes déficiences multienzymatiques (à la fois absence de cytochrome *a* et *b*). Des différences d'une autre nature doivent donc exister entre ces derniers mutants.

Nous discuterons la signification de ces faits après avoir étudié les croisements entre les autres mutants capables de se compléter.

2. *Complémentation dans les croisements entre deux mutants chromosomiques non alléliques ou entre un mutant chromosomique et une "petite double" portant un gène muté non allèle.* Les délais précédant l'apparition de la respiration ont été déterminés pour toutes les combinaisons possibles. Les résultats sont résumés dans le tableau 4 et dans la figure 5.

Il apparaît clairement que:

(a) Bien qu'il suffise que l'un ou l'autre des partenaires apporte le facteur cytoplasmique ρ^+ au zygote pour que les cellules respirent finalement, l'association préalable entre ρ^+ et le gène muté influence considérablement la durée du temps de latence. Ainsi dans les deux croisements réciproques $p_5\rho^+ \times p_7\rho^-$ et $p_5\rho^- \times p_7\rho^+$ ces temps de latence "TL 250" sont très différents, respectivement de 0,4 et 6,8 heures ou encore, dans les deux croisements $p_5\rho^+ \times p_1\rho^-$ et $p_5\rho^- \times p_1\rho^+$ ces "TL 250" sont de 0,4 et 8,0 heures respectivement.

(b) Lorsque le facteur ρ^+ est apporté par le partenaire portant la mutation au locus p_5 , "TL 250" est toujours inférieur à une heure quel que soit le gène complémentaire. Ceci reste vrai, même si l'autre parent apporte également ρ^+ .

TABLEAU 4

Temps de latence "TL 250" des différents croisements (en heures)

Croisement	TL	Croisement	TL	Croisement	TL	Croisement	TL
Observé							
$p_5\rho^+ \times P\rho^-$	0,7	$p_7\rho^+ \times P\rho^-$	4,7	$p_1\rho^+ \times P\rho^-$	11,5	$p_5p_7\rho^+ \times P\rho^-$	1,9
$p_5\rho^+ \times p_7\rho^+$	0,5	$p_7\rho^+ \times p_5\rho^+$	0,5	$p_1\rho^+ \times p_5\rho^+$	0,5	$p_5p_7\rho^+ \times p_1\rho^-$	2,2
$p_5\rho^+ \times p_7\rho^-$	0,4	$p_7\rho^+ \times p_5\rho^-$	6,8	$p_1\rho^+ \times p_5\rho^-$	8,0		
$p_5\rho^+ \times p_1\rho^+$	0,5	$p_7\rho^+ \times p_1\rho^+$	3,9	$p_1\rho^+ \times p_7\rho^+$	3,9		
$p_5\rho^+ \times p_1\rho^-$	0,4	$p_7\rho^+ \times p_1\rho^-$	3,9				
Calculé pour l'ensemble des croisements							
	0,5		4,8		9,7		2,0

Les temps de latence soulignés d'un trait sont ceux de croisements effectués entre souches de mutants chromosomiques dont l'un présente une caractéristique ("TL 250" plus court) épistatique. Les croisements effectués entre mutants ségrégants et mutants cytoplasmiques ($P\rho^-$) représentent les moyennes obtenues pour au moins trois croisements. Les autres croisements ont été, pour la plupart, effectués une seule fois.

Ainsi "TL 250" est de 0,5 heure dans le croisement $p_5\rho^+ \times p_7\rho^+$ ou dans le croisement $p_5\rho^+ \times p_1\rho^+$.

(c) Lorsque ρ^+ est apporté au zygote par une souche $p_7\rho^+$, le "TL 250" est toujours d'environ 5 heures. Ceci reste vrai même si l'autre parent apporte également ρ^+ ($p_7\rho^+ \times p_1\rho^+$ "TL 250" = 4,0 heures) à l'exception du croisement effectué avec les souches $p_5\rho^+$. Comme nous venons de le voir, les deux croisements $p_7\rho^+ \times p_5\rho^-$ et $p_7\rho^+ \times p_5\rho^+$ ont respectivement des "TL 250" de 6,8 et 0,5 heures. Aucun délai intermédiaire n'a été observé et cependant, du point de vue génétique, "petite double" $p_5\rho^-$ et "petite ségrégante" $p_5\rho^+$ utilisées ici, ne diffèrent que par le caractère ρ .

(d) Dans les croisements où le seul parent qui apporte ρ^+ au zygote porte la mutation $p_1(p_1\rho^+)$ le "TL 250" est au moins de 8 heures. Soulignons encore une

FIGURE 5.—Croisements d'une souche $p_5\rho^+$ (SG2-1C) avec diverses autres souches capables de la compléter. Evolution des vitesses de respiration aux dépens de l'éthanol ($\mu\text{O}_2/\text{h}/10^8 \text{ c.f.c. "G"}$) mesurées entre la 4ème et la 6ème heure dans l'appareil de Warburg, au cours des 12 heures suivant la formation des zygotes. (Echantillons prélevés au cours de la croissance en milieu Go 3% aéré). Le temps de latence "TL 250" est partout inférieur à une heure.

fois le fait remarquable qu'aucun délai intermédiaire n'a été observé même dans le croisement avec une souche $p_s\rho^-$, alors que le croisement de cette même souche $p_s\rho^+$ avec un partenaire $p_s\rho^+$ ramène le délai à moins d'une heure.

Notons encore ici que, comme précédemment, les différences observées ne peuvent être attribuées à des taux de croissance différents. Quel que soit le croisement, les zygotes se multiplient immédiatement après leur formation, le temps de génération étant d'environ deux heures dans tous les cas étudiés (figure 4).

D'autre part, nous avons vérifié que les différences des exigences nutritionnelles des souches auxotrophes utilisées, n'entraînaient pas non plus de changement du "TL 250." Dans les croisements effectués entre souches $p_r\rho^+$ (H.J. 18-1A et D243-2B-5/3) et souches $P\rho^-$ (55R-5-3C-11 et C982-19dA₁) marquées par des déficiences biochimiques différentes, le "TL 250" est toujours resté voisin de 5 heures.

Nous arrivons ainsi à la conclusion que, bien que le facteur cytoplasmique ρ^+ soit physiologiquement inactif au moment de la formation du zygote et qu'il dépende, dans sa fonction, de la présence des gènes dominants du type sauvage, *il existe apparemment une étroite interaction entre génome muté et facteur ρ^+ au sein d'une même cellule.* Le délai nécessaire pour que le système respiratoire devienne fonctionnel est déterminé par une caractéristique de chacune des associations gène-facteur cytoplasmique, dont les potentialités ne sont démasquées qu'au moment de la formation du zygote. Lorsque le facteur ρ^+ est apporté au zygote par chacune des deux cellules parentales, l'association génome muté-facteur cytoplasmique caractérisée par le délai le plus court impose toujours et de façon absolue, ce délai au zygote et à sa proche descendance.

3. *Complémentation dans les croisements entre mutant chromosomique portant deux gènes mutés et d'autres mutants.* A partir des souches $p_s\rho^+$ et $p_r\rho^+$ que nous venons d'étudier, nous avons construit une souche haploïde "petite ségré-gante" mutante à la fois pour les deux loci p_s et p_r ($p_s p_r \rho^+$). Cette souche présente à l'examen spectroscopique, une très faible bande de cytochrome *b* (tableau 3). A ce point de vue la mutation au locus p_r n'est pas entièrement épistatique. Quant au délai précédant l'apparition de la respiration dans les zygotes résultant du croisement de la souche $p_s p_r \rho^+$ avec une "petite cytoplasmique" $P\rho^-$ ou avec une "petite double" $p_r \rho^-$ il est de deux heures (Tableau 4). Toutes les souches étant haploïdes, le dosage des gènes réalisé dans les croisements entre $p_s\rho^+$ et $p_r\rho^-$ d'une part, et entre $p_s p_r \rho^+$ et $P\rho^-$ d'autre part, est le même. Le système respiratoire devient fonctionnel dans les deux cas, mais cependant les "TL 250" sont nettement différents. Lorsque ρ^+ se trouve en présence, au sein d'une même cellule, à la fois avec les deux gènes mutés, le délai est intermédiaire entre celui observé lorsque ρ^+ est en présence de chacun de ces gènes seuls (0,5 et 4,8 heures). Contrairement à ce que nous avons vu dans le paragraphe précédent: ni l'un ni l'autre des gènes n'est épistatique dans ce cas particulier.

Ce résultat vient renforcer encore la conclusion que l'association préalable au sein d'une même cellule du facteur cytoplasmique "inactif" avec le génome muté, détermine des potentialités particulières, caractéristiques pour chacune des associations, démasquées seulement au moment où les gènes dominants du type

sauvage, requis pour que le système puisse devenir fonctionnel, sont apportés à la cellule. L'expression des gènes mutés s'exerce apparemment sur le facteur cytoplasmique ρ^+ , dans une cellule dépourvue de la fonction respiratoire, avant même que l'expression phénotypique de cette fonction soit accomplie.

II. *Particularités de la regulation de la respiration au moment de son établissement: "effect d'accélération transitoire"*

L'étude des cinétiques d'adaptation respiratoire des cellules "grandes" venant d'acquérir la capacité respiratoire révèle que celles-ci sont le siège de phénomènes tout à fait particuliers : comme nous l'avons déjà mentionné, au moment où le système devient fonctionnel, l'évolution de la vitesse de respiration, mesurée en l'absence de croissance (figure 2) est remarquable. En effet, les cellules du témoin ("grandes" ayant effectué de nombreuses générations depuis la formation des zygotes) adaptées à la respiration, atteignent une vitesse maximale de la consommation d'O₂ de 250 μ l/heure/10⁸ c.f.c. alors que les "grandes", immédiatement issues des zygotes résultant de la fusion de deux "petites" capables de se compléter, respirent avec des vitesses beaucoup plus fortes. Par exemple, dans le croisement entre souches $p_s\rho^+$ et $p_r\rho^+$ (figure 2) les cellules respirent une ou deux heures après la formation des zygotes avec une vitesse initiale (première heure de mesure dans l'appareil de Warburg) plus grande que celle du témoin, et cette vitesse atteint, en fin d'adaptation (entre la quatrième et la sixième heure de mesure dans l'appareil de Warburg) une valeur maximale de 1500 μ l/h/10⁸ c.f.c. soit une valeur six fois plus élevée que celle du témoin. Cependant, cette forte accélération de la vitesse de respiration n'est que transitoire. En effet, dans ce croisement, 8 heures après la formation des zygotes, les vitesses de respiration, en fin d'adaptation sont devenues identiques à celles du témoin.

Les mêmes phénomènes remarquables se retrouvent pour tous les croisements effectués avec le souche $p_s\rho^+$ (figure 5), les valeurs maximales, en fin d'adaptation, étant en général atteintes pour les cellules prélevées dans la culture (figure 1) 2 heures après la formation des zygotes. Ces valeurs, toujours supérieures à celles du témoin, sont quelque peu variables d'un croisement à l'autre. Le temps nécessaire pour que la vitesse de respiration mesurée en fin d'adaptation devienne normale, c'est-à-dire identique à celle des cellules ayant le génotype "grande" depuis de nombreuses générations, varie entre 8 et 15 heures.

Les mêmes particularités se retrouvent aussi dans les autres croisements étudiés (figures 3 et 6) quel que soit le temps de latence, même lorsque 8 à 10 heures (soit 4 à 5 générations cellulaires) séparent le moment de la formation des zygotes de celui de l'établissement de la respiration (croisements où ρ^+ est apporté avec le gène p_r). Dans tous les cas on observe une période transitoire pendant laquelle les vitesses de respiration mesurées en fin d'adaptation sont excessivement élevées. Elles ne deviennent que progressivement identiques à celles du témoin.

Ces particularités ne peuvent être attribuées à une surestimation de la vitesse de respiration due au choix de notre unité de référence qui est, comme nous l'avons vu, la colonie (c.f.c.). En effet, on pourrait penser que chacune des colonies est issue, dans le témoin, de deux cellules au

FIGURE 6.—Evolution des vitesses de respiration aux dépens de l'éthanol mesurées entre la 4ème et la 6ème heure dans l'appareil de Warburg ($\mu\text{l O}_2/\text{h}/10^8$ c.f.c. "grandes"). Cette évolution est suivie au cours des 24 heures suivant la formation des zygotes pour 3 croisements présentant des "TL 250" très différents. (Echantillons prélevés au cours de la croissance en milieu Go 3% aéré). La vitesse maximale atteinte par les cellules "grandes" du témoin (grande aérée en milieu Go 3% après culture en anaérobiose) est de $250 \mu\text{l O}_2/\text{h}$ alors que pour les trois croisements étudiés on observe des vitesses maximales bien plus élevées.

maximum alors qu'elles auraient pour origine dans les croisements des groupes plus importants de cellules. Nous avons déjà vu, qu'à l'examen microscopique direct on n'observe pas de tels groupes. D'autre part, dans le croisement $p_5p^+ \times p_1p^+$ la vitesse maximale de respiration en fin d'adaptation (figure 6) est atteinte 2 heures après la fusion des cellules parentales, à un moment où chacun des zygotes n'a donné naissance qu'à un seul bourgeon (figure 4), et cette vitesse devient identique à celle du témoin 10 à 12 heures après le début de l'expérience. Or, dans le croisement $p_1p^+ \times p_5p^-$ par exemple, la vitesse maximale de respiration est atteinte 16 heures après le début de l'expérience, après au moins 5 à 6 générations cellulaires, à un moment où dans le croisement précédent les "grandes" respirent déjà avec la même vitesse que les cellules du témoin. Il ne peut donc s'agir d'une erreur systématique due à la formation de groupes importants de cellules après bourgeonnement des zygotes.

D'autre part, ces particularités ne peuvent être attribuées à la présence de cellules haploïdes "petites" non fusionnées: une très faible consommation d' O_2 étant enregistrée dans les contrôles effectués à l'aide des cellules haploïdes parentales (tableau 2), et dans les croisements entre souches "petites" ne se complétant pas (tableau 5). Une expérience de reconstitution comportant l'addition dans la cupule de l'appareil de Warburg de quantités variables de cellules "petites" résultant de croisements de ce dernier type, à des cellules "grandes" témoin, n'ont pas donné des valeurs différentes de celles enregistrées pour les cellules témoin seules (tableau 5).

Nous pouvons conclure que le système respiratoire d'une "grande" venant d'acquérir la capacité respiratoire fonctionne en état d'accélération transitoire. *Tout se passe comme si, dans le zygote et dans sa proche descendance aucun*

mécanisme de régulation n'intervenait, celui-ci ne s'enclenchant qu'après des temps variables de fonctionnement effectif de la respiration cellulaire.

DISCUSSION

L'expression de la fonction respiratoire dans les cellules venant de recevoir les déterminants génétiques requis pour la synthèse normale des enzymes respiratoires ne représente de toute évidence qu'une étape finale d'un processus cellulaire très complexe. L'ensemble des expériences qui viennent d'être décrites imposent essentiellement la conclusion que l'expression phénotypique de la respiration dans les zygotes, immédiatement après leur formation, ne dépend pas seulement de la présence des gènes dominants requis pour la synthèse des enzymes respiratoires, mais que l'expression de chacun de ces gènes chromosomiques est toujours conditionnée par son association préalable dans la cellule, avec le facteur cytoplasmique. Avant l'intégration fonctionnelle des enzymes respiratoires, des étapes intermédiaires, différentes suivant le gène étudié, prennent place. Ces étapes sont décelées par les délais différents précédant le fonctionnement effectif de la respiration.

La corrélation entre la formation des enzymes et la possibilité de leur fonctionnement est difficile à établir. Dans leurs travaux sur les mutants à déficience respiratoire, SLONIMSKI (1953), EPHRUSSI et SLONIMSKI (1955) et SHERMAN et SLONIMSKI (1964) ont été amenés à se demander si l'effet primaire des différentes mutations étudiées, dont le phénotype est toujours dû à l'absence de plusieurs enzymes normalement liées aux particules sédimentables, porte sur la synthèse de ces enzymes elles-mêmes ou si, au contraire, ces déficiences multienzymatiques ne représentent qu'un effet secondaire d'une mutation, localisée ailleurs, par exemple au niveau de l'ultrastructure de la mitochondrie.

Les expériences de complémentation que nous venons de rapporter ne nous permettent pas de répondre de façon décisive à cette question, mais elles apportent cependant quelques données nouvelles sur la nature des phénomènes se produisant lors de la mise en place des enzymes de la chaîne respiratoire.

Si l'effet primaire de la mutation porte sur la synthèse des enzymes respiratoires elles-mêmes, on peut envisager que l'absence de respiration observée chez les mutants chromosomiques est due à un mécanisme de répression, qui prévient l'expression fonctionnelle du génome, la complémentation ayant pour effet l'induction des différentes enzymes.

Les données relatives aux temps de latence précédant le fonctionnement effectif du système respiratoire, résumées dans le tableau 6, nous permettent d'exclure une telle interprétation. En effet: (1) Si l'on admet que tous les mutants, qu'ils soient cytoplasmiques ou chromosomiques apportent au zygote le répresseur, les temps de latence ("TL 250") différents observés, par exemple dans les deux croisements $p_{\delta\rho^+} \times P_{\rho^-}$ (0,5 heure) et $p_{1\rho^+} \times P_{\rho^-}$ (9,7 heures) où une même souche P_{ρ^-} a été utilisée, doivent être attribués à ce que des quantités différentes de répresseur sont apportées par chacun des deux mutants chromosomiques. Ceci implique que le "TL 250" du croisement, comportant ces deux mutants chromo-

TABLEAU 5

Respiration de "grandes" témoin (cultures aérobies en milieu Go 3%) avec ou sans addition de cellules "petites" provenant d'un croisement entre "petites doubles" ne se complémentant pas ($p_5\rho^- \times p_7\rho^-$)

Echantillon	Echantillon					
	Mélange de copulation: croisement $p_5\rho^- \times p_7\rho^-$ (1 ml)*	Cellules parentales seules		"grandes" H.J.-17	"grande" + 1 ml de mélange de copulation	"grandes" + $1,3 \times 10^8$ cellules $p_5\rho^-$ + $1,3 \times 10^8$ cellules $p_7\rho^-$
		$p_5\rho^-$	$p_7\rho^-$			
$\mu\text{l O}_2$	1,0	3,2	2,6	178	177,2	190,6

Les souches utilisées sont : "grandes" H.J.17; $p_5\rho^-$: SG2-1C-1; $p_7\rho^-$: H.J.18-1A-a; vitesse de respiration exprimée en $\mu\text{l O}_2/\text{hr}/10^8$ c.f.c. ($\mu\text{l O}_2$ entre troisième et quatrième heure de mesure dans l'appareil de Warburg). Aucune stimulation de la respiration n'est observée en présence de "petites."

* Le mélange de copulation contient par ml $0,02 \times 10^8$ zygotes et 2×10^8 cellules haploïdes parentales, soit 1×10^8 cellules de chacun des types parentaux.

somiques soit long, c'est-à-dire au moins égal à 9 heures. Or, les résultats obtenus sont incompatibles avec une telle interprétation : dans le croisement entre souches $p_5\rho^+$ et $p_7\rho^+$, "TL 250" est de 0,5 heure, c'est-à-dire le même que dans le croisement entre cette même souche $p_5\rho^+$ et $P\rho^-$.

(2) On ne peut pas mieux rendre compte des temps de latence observés dans les croisements entre deux mutants chromosomiques si l'on admet que seuls les mutants cytoplasmiques ($P\rho^-$) et ($p_x\rho^-$) apportent le répresseur, les mutants chromosomiques ($p_x\rho^+$) en étant dépourvus. En effet, s'il en était ainsi, les "TL 250" des croisements impliquant deux mutants chromosomiques non alléliques devraient être très courts et ceux ne comprenant qu'un seul de ces mutants devraient être longs. Or, comme nous l'avons vu plus haut, il n'en est rien.

Ce raisonnement peut être généralisé à l'ensemble des croisements étudiés.

Selon une autre hypothèse, la mutation chromosomique pourrait porter sur le nombre de "particules cytoplasmiques", nombre toujours inférieur à un seuil qui doit être atteint pour que la synthèse de la cytochrome oxydase soit normale. Supposons par exemple, que le seuil à atteindre soit de vingt et que les différents

TABLEAU 6

Temps de latence "TL 250" moyen calculé pour l'ensemble des croisements, déterminé pour chacun des mutants $p_x\rho^+$ dans le tableau 4

Souches croisées	$p_5\rho^+$	$p_5\rho^-$	$p_7\rho^+$	$p_7\rho^-$	$p_1\rho^+$	$p_1\rho^-$	$P\rho^-$
$p_5\rho^+$	∞	∞	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$p_5\rho^-$	∞	∞	4,8	∞	9,7	∞	∞
$p_7\rho^+$	0,5	4,8	∞	∞	4,8	4,8	4,8
$p_7\rho^-$	0,5	∞	∞	∞	—	∞	∞
$p_1\rho^+$	0,5	9,7	4,8	—	∞	∞	9,7
$p_1\rho^-$	0,5	∞	4,8	∞	∞	∞	∞
$p_5p_7\rho^+$	∞	∞	∞	∞	—	2,0	2,0

— indique croisements non effectués.

mutants apportent les nombres suivants de particules : $P\rho^-$ ou $p_x\rho^- = 0$; $p_1\rho^+ = 2$; $p_7\rho^+ = 5$; $p_s\rho^+ = 10$. On peut alors rendre compte des "TL 250" observés, en admettant toutefois que la particule cytoplasmique se multiplie avec un temps de génération différent de celui de la cellule elle-même et que le temps nécessaire pour atteindre le seuil de 20 particules n'est pas sensiblement différent que l'on apporte au zygote 5 particules comme dans le croisement $p_7\rho^+ \times P\rho^-$ ou 7 particules comme dans le croisement $p_7\rho^+ \times p_1\rho^+$. Bien qu'une telle interprétation soit formellement possible, l'existence de ces "particules cytoplasmiques" et le maintien d'un très petit nombre de ces particules, caractéristique pour chacun des mutants, nous semble très peu probable.

Remarquons ici, qu'il ressort clairement des données du tableau 6, que tous les mutants ρ^- ($P\rho^-$ et $p_x\rho^-$) se comportent de la même façon dans le croisement avec un même mutant $p_x\rho^+$. Ceci est compatible avec ce que nous savons des autres caractéristiques de ces mutants. Ils présentent tous les mêmes déficiences multi-enzymatiques (SHERMAN et SLONIMSKI 1964), les mêmes agents chimiques induisent leur formation, aussi bien dans les cultures de cellules normales ($P\rho^+$) que dans les cellules de "petites ségrégantes" ($p_x\rho^+$), la mutation est toujours irréversible et l'aspect des mitochondries en microscopie électronique présente les mêmes anomalies (YOTSUYANAGI 1962).

La façon la plus simple de rendre compte de nos résultats expérimentaux de manière satisfaisante est d'envisager que les événements prenant place dans le zygote s'accomplissent nécessairement dans un ordre donné, l'action de chacun des gènes mutants étudiés portant sur une étape dont l'accomplissement nécessite un temps fixe. Une telle chaîne de synthèse séquentielle peut être schématisée de la façon suivante:

L'effet primaire de ce processus peut s'exercer, comme nous l'avons dit au début de cette discussion, (1) soit sur la biosynthèse des enzymes elles-mêmes, (2) soit au niveau de l'ultrastructure des mitochondries, l'absence des enzymes n'étant qu'un effet secondaire. La dernière de ces éventualités nous semble la plus simple, ce qui ne signifie pas que la première puisse être exclue.

Selon (1) on peut envisager que dans le processus séquentiel que nous venons de schématiser, les différentes enzymes nécessaires pour que le système de transport d'électrons de la chaîne respiratoire puisse fonctionner, doivent être fixées sur la membrane mitochondriale et être présentes nécessairement dans l'ordre $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow \text{etc.}$ D'après les études de GORMAN et de ses collaborateurs (1964) effectuées sur des cultures synchrones de levure il n'y aurait, à chaque génération cellulaire, qu'une seule période de synthèse pour chacune des enzymes, correspondant à une transcription ordonnée qui suivrait dans le temps, la réplication du DNA. Si la synthèse des enzymes qui nous intéressent ici se fait, à chaque génération cellulaire, dans l'ordre $E \rightarrow D \rightarrow C \rightarrow \text{etc.}$. . . et si ces enzymes sont détruites assez rapidement dans la cellule, on comprend que l'établissement de la respiration nécessite dans certains cas, 4 à 5 générations cellulaires. Du fait que les zygotes et les premiers bourgeons qui en sont issus se divisent de façon

synchrone, ces phénomènes sont, sans aucun doute, encore amplifiés. En outre, SCOPES et WILLIAMSON (1964) ont observé, dans des cultures synchrones de levure, une périodicité de la consommation d'oxygène. Leurs résultats pourraient être interprétés comme représentant la synthèse périodique d'une des dernières enzymes de la chaîne respiratoire par exemple de la cytochrome-oxydase.

Selon (2) l'effet direct des différentes mutations étudiées porterait toujours, mais en des sites différents, sur la morphogénèse des mitochondries, c'est-à-dire sur une même structure composée de divers éléments associés nécessairement dans un ordre donné et localisés dans les mitochondries. Ainsi la mutation ρ^- atteindrait toujours soit un point essentiel de cette structure, soit son unique matrice. Une telle manière de voir tient compte de l'irréversibilité de cette mutation et aussi du fait que la multiplication cellulaire est nécessaire pour l'induction de cellules ρ^- .

Chez les mutants chromosomiques étudiés ici, tous capables de mutation réverse, cette structure serait toujours présente mais sous des formes différemment altérées. Quoique nous ayons désigné jusqu'ici "le" facteur cytoplasmique par ρ^+ sans autre qualificatif, ρ^+ désignerait en réalité, suivant notre interprétation, cette structure cytoplasmique présentant des altérations différentes selon les gènes qui l'accompagnent. La présence d'une structure préformée, même incomplète, serait indispensable pour que la complémentation fonctionnelle soit possible, le temps nécessaire pour compléter la ou les premières structures étant le "TL 250".

On comprend alors pourquoi, dans les croisements où les deux partenaires apportent le facteur cytoplasmique ρ^+ , le "TL 250" du partenaire où ce temps est le plus court soit toujours imposé au zygote et à sa descendance.

Le cas particulier du mutant $p_s p_7 \rho^+$ où le "TL 250" est intermédiaire entre ceux observés pour les mutants $p_s \rho^+$ et $p_7 \rho^+$ respectivement, s'explique si l'on admet que, sous l'effet des interactions entre ces deux gènes, la structure est moins complète que lorsque p_s est seul, mais plus complète que lorsque p_7 est seul. En fait, cette structure permettrait la fixation du cytochrome *b* en quantités limitées. En effet, nous savons que le mutant $p_s p_7 \rho^+$ présente, à l'examen spectroscopique, une faible bande de cytochrome *b* alors que les mutants $p_7 \rho^+$ étudiés en sont dépourvus et que cette bande est, chez les mutants $p_s \rho^+$ aussi intense que celle observée pour une souche "grande". Il est donc plausible de penser que le cytochrome *b* est formé, mais que sa fixation sur la membrane mitochondriale est quantitativement limitée.

Un des corollaires d'une telle hypothèse est qu'en réalité la structure nécessaire à la fixation des différentes enzymes est reconstituée lors de la complémentation fonctionnelle, dans un ordre donné. Ainsi, dans les croisements effectués avec les mutants $p_7 \rho^+$ ou $p_1 \rho^+$, dépourvus à la fois des cytochromes *b* et *a*, le cytochrome *b* devrait être présent sur la membrane mitochondriale avant que le cytochrome *a* puisse y être fixé. L'apparition de cytochrome *b* doit pouvoir être décelée avant celle du cytochrome *a*.

Par ailleurs, les "TL 250" très longs, précédant l'apparition de la respiration dans quelques uns des croisements étudiés (temps pendant lequel le zygote

FIGURE 7.—Représentation schématique des différentes altérations subies dans la morphogénèse de la mitochondrie, selon l'hypothèse développée dans le texte. La "structure" serait composée d'éléments successifs qui seraient empilés nécessairement dans un ordre donné.

accomplit 4 à 5 générations cellulaires) s'expliquent assez bien si l'on pense à l'organisation très complexe de la mitochondrie. L'interprétation que nous venons de discuter et dont nous donnons une représentation schématique dans la figure 7, nous semble plus satisfaisante, à ce point de vue, que celle faisant intervenir les mutations dans la chaîne de biosynthèse des enzymes elles-mêmes.

Notons encore ici, que les mutations géniques aux loci p_s , ly_6 et ly_8 étudiées par SHERMAN (1963) entraînent en même temps l'état ρ^- . Il est possible que, comme le suggère cet auteur, ces gènes contrôlent la rétention ou la synthèse du facteur cytoplasmique. Selon notre hypothèse, les lésions causées par ces mutations doivent toucher des éléments de la structure, localisés très près du point touché par la mutation ρ^- . La mutation au locus p_i entraîne sans doute une situation analogue, puisqu'il n'a pas été possible, comme nous l'avons vu, d'isoler des souches contenant moins de 70% de mutants doubles ρ^- .

Enfin, comme nous l'avons déjà vu précédemment, les "grandes" immédiatement issues de la fusion de "petites" capables de se compléter présentent, après l'établissement de la respiration une très forte accélération des vitesses de respiration pendant l'adaptation (mesurées dans l'appareil de Warburg en l'absence de source d'azote exogène lorsque la respiration a lieu aux dépens de l'éthanol, c'est-à-dire dans des conditions où le glucose n'exerce pas de répression sur la synthèse des enzymes respiratoires). Nous savons que les teneurs en cytochrome-oxydase augmentent parallèlement aux vitesses de respiration : en fin d'adaptation, lorsque la vitesse de respiration atteint 1 500 $\mu\text{l O}_2/\text{heure}$ par exemple (figure 2), la quantité cytochrome-oxydase est 5 à 10 fois supérieure à celle de ces mêmes cellules "grandes" pleinement adaptées, mais ayant accompli

depuis la formation des zygotes quelques générations cellulaires de plus (SELS et JAKOB 1965). Il est probable que les autres enzymes de la chaîne respiratoire sont présentes aussi en quantités très élevées. Cependant, nous ne savons pas actuellement si le taux de synthèse des différentes enzymes est constant ou si des taux de synthèse très élevés correspondent aux vitesses de respiration exceptionnelles de ces "grandes" particulières.

Quel que soit le temps de latence "TL 250", on observe toujours une période transitoire pendant laquelle les cellules possèdent la propriété de pouvoir développer des vitesses de respiration très intenses, soit deux heures (lorsque l'un des partenaires du croisement est $p_s\rho^+$), soit seize heures (lorsque l'un des partenaires du croisement est $p_i\rho^+$) après la formation des zygotes. Cette propriété étant perdue par la suite, on peut envisager que l'expression de la fonction respiratoire est réduite dans une cellule normale et que le système de régulation, maintenant le taux de synthèse des enzymes à un niveau plus économique pour la cellule ne s'enclenche qu'après fonctionnement effectif de la respiration. Il se peut qu'un rétrocontrôle soit exercé par un produit du métabolisme respiratoire.

Remarquons encore que l'on n'observe jamais la très forte accélération des vitesses de respiration que nous venons de discuter, dans les cellules "grandes" au cours de l'adaptation respiratoire après culture en anaérobiose.

Enfin, quelle que soit la nature exacte des lésions subies chez les différents mutants chromosomiques ($p_x\rho^+$) et leur incidence sur la morphogenèse des mitochondries, des modifications morphologiques de l'ultrastructure de celles-ci n'ont pas été trouvées: le chondriome des deux mutants $p_s\rho^+$ et $p_r\rho^+$ est identique (YOTSUYANAGI 1962). Cependant, des différences beaucoup plus fines au niveau structural peuvent aisément être envisagées.

Nous exprimons notre profonde gratitude au PROFESSEUR B. EPHRUSSI et au PROFESSEUR P. SLONIMSKI ainsi qu'à MADAME S. GRANDCHAMP pour les précieux conseils qu'ils nous ont prodigués au cours de ce travail. Ce travail a bénéficié d'une subvention de la Fondation Rockefeller au Laboratoire de Génétique Physiologique, de la Convention de Recherche (N° 63 FR 127) de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Comité de Biologie Moléculaire.

RESUME

Les croisements entre mutants à déficience respiratoire capables de se compléter (mutants chromosomiques et mutants cytoplasmiques) ont permis d'étudier les relations entre divers gènes mutés et le facteur cytoplasmique et l'influence de ces gènes sur les mécanismes impliqués dans le développement de la fonction respiratoire.

L'établissement de la respiration a été étudié, par des mesures directes dans l'appareil de Warburg, dans les zygotes et dans leur descendance végétative immédiate. Il en ressort que: (1) Dans aucun des croisements les zygotes, au moment de leur formation ne respirent. Un délai précède l'acquisition de la capacité de former les enzymes respiratoires. (2) L'expression de chacun des gènes chromosomiques est conditionnée par son association préalable dans la cellule avec le facteur cytoplasmique, les délais observés étant caractéristiques pour chacune des associations gène-facteur cytoplasmique étudiées. Des relations

d'épistasie ont été mises en évidence. (3) Avant l'intégration fonctionnelle des enzymes respiratoires, des étapes intermédiaires, dont l'achèvement nécessite un temps fixe doivent être accomplies dans un ordre donné. On en a tiré quelques conclusions sur les mécanismes impliqués. Les effets de la mutation pourraient porter soit directement sur la synthèse des enzymes respiratoires, soit sur l'ultra-structure de la mitochondrie.

(4) Au moment où le système respiratoire devient fonctionnel dans la descendance des zygotes des vitesses de respiration 5 à 10 fois supérieures à celles d'une cellule "grande" normale sont observées en fin d'adaptation respiratoire. Tout se passe comme si, dans les zygotes et dans leur proche descendance aucun mécanisme de régulation n'intervenait.

SUMMARY

Two classes of mutants with respiratory deficiencies have been studied in these genetic studies of complementation: cytoplasmic (extrachromosomal mutants (ρ^-) and chromosomal (segregational) mutants.

A cross between two cytoplasmic mutants always leads to the formation of zygotes whose vegetative progeny is entirely composed of cells lacking the respiratory enzymes ("petites"). Crosses between a cytoplasmic mutant and a chromosomal mutant on the one hand, or between two nonallelic chromosomal mutants on the other hand, lead to the formation of zygotes, the great majority of which yield a vegetative progeny composed of cells having normal respiration.

The onset and the rate of respiration have been studied in crosses between haploid "petites" which are able to show complementation. Direct measurements of respiration were performed on zygotes immediately after their formation and followed for several generations of vegetative multiplication. Three nonlinked chromosomal loci (p_1 , p_5 , p_7) were studied in this manner.

From such genetic and physiological studies, the following conclusions emerge: (1) In none of the crosses could respiration be detected immediately in the newly-formed zygotes, although the method was sensitive enough to detect it if it had occurred. There was thus a lag period between zygote formation and the onset of respiration. (2) The duration of this lag period was different and specific for each of the chromosomal mutants studied, when each one was crossed with the same cytoplasmic mutant: the observed duration of the lag was 0.5, 4.8 and 9.7 hours for mutants p_5 , p_7 and p_1 respectively. (3) When a cross was made between two nonallelic chromosomal mutants of which one only lacked the cytoplasmic factor " ρ^+ ", the diploids ultimately respired. However, the duration of the lag period was determined by the previous association of gene and cytoplasmic factor in the haploid parent. Thus reciprocal crosses showed very different results: e.g., in the cross $p_5\rho^+ \times p_7\rho^-$, the lag was 0.5 hour, while in the cross $p_5\rho^- \times p_7\rho^+$ it was 4.8 hours. (4) In crosses between two nonallelic chromosomal mutants, each of which possessed the cytoplasmic factor " ρ^+ ", the duration of the lag was always identical to that of the mutant with the shorter period of delay, as described above in (2); an intermediate lag period was never observed.

Thus there was a strong interaction between the mutant chromosomes and the

cytoplasmic factor " ρ^+ " within the parental cell, which did not respire, even before the phenotypic expression of the respiratory function was accomplished by complementation in the zygote.

The observed specific lag periods are inconsistent with the hypothesis that the lack of respiration in "petites" is due to a repression mechanism which prevents the functional expression of the genome, and that complementation leads to the induction of different respiratory enzymes. Two hypotheses were advanced in order to explain these observations: (1) the primary effect of the mutations is to modify the "structure" of the mitochondria, thus indirectly affecting the electron transport system; (2) this primary effect is to block the biosynthesis or function of one of the components of the electron transport system. Upon functional complementation in zygotes, an ordered integration occurs within the mitochondria in association with gene expression.

In the progeny of all zygotes studied, the rate of O_2 uptake during adaptation was extremely high at the moment respiration was initiated. A reduced rate of O_2 uptake follows. This overshoot phenomenon is evidence that the respiration system initially functions in a derepressed state, after which a regulation mechanism is turned on.

BIBLIOGRAPHIE

- CHEN, S. Y., B. EPHRUSSI, et H., HOTTINGUER, 1950 Nature génétique des mutants à déficience respiratoire de la souche B-II de la levure de boulangerie. *Heredity* **4**: 337-351.
- EPHRUSSI, B., 1953 *Nucleo-cytoplasmic Relations in Microorganisms*. Clarendon Press, Oxford, England.
- EPHRUSSI, B., H. HOTTINGUER, et A. M. CHIMENES, 1949 Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie." *Ann. Inst. Pasteur* **76**: 351-368.
- EPHRUSSI, B., H. HOTTINGUER, et J. TAVLITZKI, 1949 Action de l'acriflavine sur les levures. II. Etude génétique du mutant "petite colonie." *Ann. Inst. Pasteur* **76**: 419-450.
- EPHRUSSI, B., M. HOTTINGUER, et H. ROMAN, 1954 Sur le comportement génétique des mutants à déficience respiratoire de la levure. 8ème Congr. Intern. Botan. 111-120.
- EPHRUSSI, B., et P. SLONIMSKI, 1955 Yeast mitochondria. *Nature* **176**: 1207-1209.
- EPHRUSSI, B., M. HOTTINGUER, et H. ROMAN, 1955 Suppressiveness: a new factor in the genetic determinism of the synthesis of respiratory enzymes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **41**: 1065-1071.
- EPHRUSSI, B., et S. GRANDCHAMP, 1965 Etudes sur la suppressivité. I. Existence de divers degrés de suppressivité. *Heredity* **20**: 1-7.
- GALZY, P., et P. SLONIMSKI, 1957 Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **245**: 2556.
- GORMAN, J., P. TARNO, M. LA BERGE, et H. HALVORSON, 1964 Timing of enzyme synthesis during synchronous division in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**: 43-49.
- HAWTHORNE, D. C., et R. K. MORTIMER, 1960 Chromosome mapping in *Saccharomyces*. Centromere-linked genes. *Genetics* **45**: 1085-1110.
- JAKOB, H., 1962 Technique de synchronisation de la formation des zygotes chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **254**: 3909-3911.
- OGUR, M., R. ST. JOHN, et S. NAGAI, 1957 Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science* **125**: 928-929.

- SCOPES, A. W., et D. H. WILLIAMSON, 1964 The growth and oxygen uptake of synchronously dividing cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Exptl. Cell Res. **35**: 361-371.
- SELS, A., et H. JAKOB, Régulation de la synthèse des enzymes respiratoires dans les zygotes issus du croisement de mutants à déficience respiratoire capables de se compléter. (En preparation.)
- SHERMAN, F., 1963 Respiration deficient mutants of yeast. I. Genetics. Genetics **48**: 375-385.
- SHERMAN, F., et B. EPHRUSSI, 1962 The relationship between respiratory deficiency and suppressiveness in yeast as determined with segregational mutants. Genetics **47**: 695-700.
- SHERMAN, F., et P. SLONIMSKI, 1964 Respiration deficient mutants of yeast. II. Biochemistry. Biochim. Biophys. Acta **90**: 1-15.
- SHORTMAN, K., et H. FUKUHARA, 1963 Metabolism of ribonucleic acid during respiratory adaptation in yeast. Biochim. Biophys. Acta, **76**: 501-524.
- SLONIMSKI, P., 1953 *Formation des enzymes respiratoires chez la levure*. Masson, Paris. ——— 1956 Adaptation respiratoire: développement du système hémoprotéique induit par l'oxygène. Proc. 3rd. Intern. Congr. Biochem. 242-252. ——— 1958 Respiration and the growth of yeast. Soc. Chem. Ind. (London) Monograph **3**: 7-20.
- WRIGHT, R., et J. LEDERBERG, 1957 Extranuclear transmission in yeast heterokaryons. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. **43**: 919.
- YOTSUYANAGI, Y., 1962 Etudes sur le chondriome de la levure. I. Variation de l'ultrastructure du chondriome au cours du cycle de la croissance aérobie. II. Chondriomes des mutants à déficience respiratoire. J. Ultrastructure Res. **7**: 121-140 et 141-158.