

ETUDES SUR LA SUPPRESSIVITÉ DES MUTANTS A DEFICIENCE
RESPIRATOIRE DE LA LEVURE. II. ETAPES DE LA
MUTATION GRANDE EN PETITE PROVOQUEE
PAR LE FACTEUR SUPPRESSIF¹

BORIS EPHRUSSI,² HEDWIG JAKOB ET SIMONE GRANDCHAMP

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

Received December 9, 1965

LORSQUE l'on croise une levure normale (Grande) avec une petite suppressive, la déficience respiratoire caractéristique du mutant, est imposée à une fraction des zygotes et à leur descendance (EPHRUSSI, MARGERIE-HOTTINGUER et ROMAN 1955). Il est facile de le constater en étalant ces zygotes sur du milieu gélosé: au bout de quelques jours d'incubation on observe la formation de colonies dont une fraction, qui est fonction du degré de suppressivité du parent "petite" choisi, sont des petites colonies.

On pouvait se demander si le devenir différent des zygotes d'un même croisement est dû à des différences de constitution dont l'origine remonterait à l'hétérogénéité de l'une au moins des souches parentales ou si, au contraire il est dû à l'intervention de facteurs aléatoires, affectant différemment des zygotes, tous essentiellement identiques et tous capables du même choix.

Dans ce qui suit, nous rappellerons d'abord quelques résultats acquis et donnerons des résultats nouveaux qui montrent que la première de ces hypothèses seule ne suffit pas à rendre compte des phénomènes observés. Nous décrirons ensuite les résultats d'expériences suggérées par la deuxième hypothèse. Elles ont pour point de départ l'observation que dans les croisements en question les zygotes donnent naissance à plusieurs types de colonies qui semblent refléter les étapes de l'action du facteur suppressif (EPHRUSSI et GRANDCHAMP 1965), étapes qui peuvent être affectées par les facteurs externes. Disons dès maintenant que ces expériences ont révélé l'existence d'un état cellulaire nouveau (probablement identique à "l'état instable" décrit par EPHRUSSI et HOTTINGUER [1951]) qui n'est ni celui de "grande" ni celui de "petite" connus jusqu'ici.

Le fait que les deux états stables de "grande" et "petite" soient reliés par un état transitoire, réversible, que nous avons qualifié de "prémutionnel" nous paraît devoir trouver son explication dans des relations de répression mutuelle entre les deux facteurs postulés antérieurement, facteur normal requis pour la synthèse des enzymes respiratoires et facteur suppressif. Outre qu'une telle interprétation invoque des mécanismes biochimiques bien établis chez d'autres microorganismes elle trouve un appui dans le fait que, le développement de la

¹ Ce travail a bénéficié de subventions de la Fondation Rockefeller et de la National Science Foundation.

² Adresse actuelle: Western Reserve University, Cleveland, Ohio, U.S.A. 44106.

suppressivité est apparemment déclenché par la perte du facteur normal. Cette conclusion est tirée d'expériences qui seront décrites dans le prochain mémoire de cette série. Nous tenons à en faire connaître les résultats avant de présenter les détails de l'interprétation esquissée.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

(a) *Nomenclature*: Dans ce mémoire nous allons employer les abréviations suivantes: Grande, G; petite, p; petite neutre, p_n ; petite suppressive, p_s . p a été employé dans le mémoire I de cette série (EPHRUSSI et GRANDCHAMP 1965) pour désigner les "petites cytoplasmiques." Entre temps l'usage s'est répandu d'utiliser les symboles p pour désigner les mutations des loci géniques entraînant la déficience respiratoire et P pour le gène sauvage (SHERMAN et EPHRUSSI 1962), p^+ et p^- indiquant la présence ou l'"absence" du facteur cytoplasmique. Pour des raisons que l'on verra, cette nomenclature est d'application difficile dans l'analyse qui fait l'objet de ce mémoire. Nous continuerons donc à utiliser ci-dessous le terme p pour "petite" en insistant sur le fait qu'il s'agit de "petites cytoplasmiques" (actuellement désignées par les symboles Pp^-).

FN : facteur génétique normal. FS : facteur suppressif.

(b) *Souches*: *Grandes*. C-982-19d, de signe α exigeant l'histidine et le tryptophane, C-982-19b-1a, de signe a, exigeant l'uracile et la méthionine. On trouvera l'origine de ces souches dans les travaux d'EPHRUSSI *et al.* (1954) et EPHRUSSI et GRANDCHAMP (1965), respectivement.

"*Petites*". Toutes les souches sont dérivées des précédentes. Petites neutres : C-982-19b-1a A ; C-982-19dA₁. Petites suppressives : C-982-19dp 6/6-2 ; C-982-19dp 6/6-9 ; C-982-19dp 6/6-12 ; C-982-19dp 6/6-20; C-982-19dp 6/6-A₁₉; C-982-19dp 6/6-M 15-1B-20/9 et C-982-19dp 6/6-M 15-1B-2/16. Les degrés de suppressivité de ces souches sont définis dans le texte. Dans ce qui suivra la première partie de leur dénomination sera omise.

(c) *La technique des croisements* et le milieu minimum DH utilisé pour la détection des protothrophes sont ceux décrits par JAKOB (1962).

(d) *Milieux*. Les milieux utilisés pour les cultures stock et pour la détermination du % p des souches G sont ceux décrits par EPHRUSSI et GRANDCHAMP (1965).

De plus, les milieux suivants ont été utilisés : (1) DHG : DH + 3 % (vol) de glycérol; (2) DH 0,13 : DH + 1,3 g/l de glucose; (3) DHG 0,13 : DH + 3 % de glycérol + 1,3 g/l de glucose; (4) DHac 0,13 : DH + 2,6 g/l d'acétate de sodium + 1,3 g/l de glucose.

Le milieu (1) au glycérol, substrat non fermentescible, permet la croissance des seules G. Les milieux (3) et (4) sont des milieux dits différentiels, permettant en général de distinguer G et p par leur différence de taille. La croissance des p s'arrête lorsque la faible quantité de glucose dans le milieu est épuisée alors que les G continuent de croître aux dépens du glycérol ou de l'acétate de sodium.

Ainsi la capacité d'une cellule de proliférer sur glycérol et la taille de la colonie formée sur le milieu différentiel représentent deux critères habituels de la nature G ou p d'une cellule. Un troisième critère est la coloration des G et l'absence de coloration des p par le chlorure de tétrazolium (TZ).

(e) La coloration par le TZ et la détermination du degré de suppressivité (% S) ont été décrites précédemment (EPHRUSSI et GRANDCHAMP 1965), mais ici le % S n'a pas été corrigé, l'erreur ainsi commise étant négligeable.

(f) Sauf mention spéciale, toutes les expériences ont été effectuées à 30°C.

(g) La technique de microdissection sera décrite plus bas.

RÉSULTATS

Quasi-identité des zygotes d'un même croisement: Il a été montré antérieurement que la formation, dans un croisement $G \times p_s$ à la fois de zygotes à descendance normale et de zygotes à descendance mutante, n'était due ni à l'absence

de mélange cytoplasmique qui ferait que certains zygotes n'auraient pas reçu le facteur suppressif (EPHRUSSI *et al.* 1954), ni au croisement préférentiel entre les petites choisies et les petites spontanées, toujours présentes dans la souche parentale G (EPHRUSSI *et al.* 1955). On a alors pensé que la formation de zygotes à descendances différentes (colonies grandes et petites) pourrait être attribuée à ce que la plupart des souches p_s sont en réalité des mélanges de deux types cellulaires, p_n et p_s hautement suppressive. Les proportions relatives de ces deux types définiraient le degré de suppressivité de la souche, de sorte que tout croisement du type considéré comprendrait en réalité deux croisements différents : (a) $G \times p_n$ et (b) $G \times p_s$ hautement suppressive.

Or, un certain nombre d'observations relatées ailleurs (EPHRUSSI *et al.* 1954) semblait aller à l'encontre de cette manière de concevoir les degrés de suppressivité et on a montré dans le mémoire précédent (EPHRUSSI et GRANDCHAMP 1965) que ceux-ci se retrouvent sur le plan cellulaire. En d'autres termes, toutes les cellules d'un clone suppressif transmettent leur degré de suppressivité et donc apportent au zygote le même FS. L'essentiel de l'hétérogénéité des zygotes n'est pas due à l'hétérogénéité du parent "petite". Reflèterait-elle l'hétérogénéité du parent normal ? Une réponse négative à cette question est apportée par les résultats de clonages de G.

Par exemple, dans une expérience, 9 jeunes colonies formées à la suite de l'étalement de la souche G, C-982-19b-1a sur le milieu gélosé, ont été prélevées et immédiatement testées par croisement avec la souche p 19dp 6/6-7, dont le degré de suppressivité est d'environ 27 %. Les pourcentages des zygotes qui ont donné naissance à des colonies p ont été dans les neuf croisements, respectivement 19,3 ; 19,6 ; 20,8 ; 22,6 ; 22,7 ; 23,0 ; 24,4 ; 26,6 et 28,0. (Ces pourcentages ne sont affectés que de très faibles erreurs, les comptages ayant porté sur environ 1000 colonies pour chaque croisement). De toute évidence, ces chiffres ne révèlent pas d'hétérogénéité significative au sein de la souche G clonée.

La formation de zygotes à descendance différente ne peut donc être attribuée à des différences stables, c'est-à-dire décelables, entre les cellules de l'une des souches parentales et résulte donc de l'évolution différente de zygotes initialement quasi-identiques.

Types de colonies formés par les zygotes des croisements $G \times p_s$: Nous avons déjà rappelé les raisons qui nous font croire que le FS doit être présent dans pratiquement tous les zygotes des croisements $G \times p_s$.

Nous allons montrer maintenant que la simple observation des colonies formées par ces zygotes, particulièrement après coloration au TZ (OGUR *et al.* 1957), révèle l'action du FS dans beaucoup de colonies qui ne peuvent être classées comme des petites.

Faisons un croisement $G \times p_s$, étalons-le sur le milieu DHG 0,13 et, après 4½ jours d'incubation, colorons les colonies formées. Leur examen permet de constater que, par leur aspect et leur coloration, elles constituent un spectre presque continu de formes dont les grandes et les petites typiques ne représentent que les deux extrémités, reliées par une série d'intermédiaires. L'ensemble des colonies peut être classé dans les 4 catégories modales suivantes (figure 6) :

(1) Grandes : légèrement rugueuses, à contours réguliers légèrement brunâtres, se colorant entièrement en rouge par le TZ.

(2) petites : nettement plus petites, plates, lisses et blanches, ne se colorant pas par le TZ.

(3) Festonnées : (EPHRUSSI et HOTTINGUER 1951) présentant, sauf pour les contours très irréguliers, les caractéristiques des G : en particulier, elles se colorent par le TZ.

(4) petites abcédées : de même taille que les petites ou de taille légèrement supérieure, mais présentant une excroissance centrale. Celle-ci apparaît tantôt comme une toute petite pointe, tantôt comme une petite ou une grosse sphère. L'excroissance présente une surface plus rugueuse et est plus teintée que les parties qui l'entourent. Nous avons vérifié que toutes les cellules de la colonie sont bien prototrophes. La coloration au TZ d'une petite abcédée, à grosse excroissance, permet de distinguer 3 parties : une auréole blanche, une grosse masse centrale blanche ou très faiblement colorée, et un sommet rouge. L'importance de la partie colorée varie d'une colonie à l'autre et se présente comme une pointe, une plaque ou une calotte unique. Plus rarement elle est constituée par plusieurs points rouges (ce type de colonie a été indubitablement déjà observé par PITTMAN (1959), à la suite de l'irradiation de la levure par les rayons UV).

La description que nous venons de faire, donne un tableau statique tel qu'il se présente lorsque la coloration au TZ est appliquée après 4½ jours d'incubation à 30°C. Ce délai passé, il ne change pratiquement plus. Au contraire, des observations plus précoces permettent de constater des changements de l'aspect des colonies. Ainsi, certaines colonies que l'on classerait comme festonnées après 2 jours d'incubation sont classées comme G au bout de 4½ jours. Les petites abcédées commencent par présenter l'aspect de petites. Leur protubérance centrale caractéristique n'apparaît, en général, qu'au troisième jour. On a alors l'impression que l'abcès se développe au sein d'une colonie petite par la prolifération dans son centre de quelques G résultant de "réversions" qui, à un moment donné, percent la surface et continuent à s'y multiplier et, de plus, que le développement d'une grande ou d'une festonnée, ne diffère de celui d'une petite abcédée que par l'importance de cette prolifération. Remarquons toutefois qu'alors que l'on ne peut pas douter qu'une partie au moins de ces transformations, en particulier de festonnées en grandes et de petites abcédées en festonnées, est due à la sélection dans les populations mixtes qui constituent ces colonies, l'idée que l'évènement de base est une mutation réverse dans une colonie petite s'avère, comme on le verra par la suite, trop simple.

Nous mentionnerons dès maintenant que, bien que les petites abcédées contiennent des cellules colorables par le TZ, ces colonies ne donnent pas toujours une croissance lorsqu'on les repique sur un substrat non fermentescible, alors que des G normales prolifèrent toujours. Ainsi 15 à 30 % des petites abcédées bien caractérisées, formées à la suite de l'étalement du croisement C-982-19b-1a \times 20/9 sur milieu DHG 0,13 ne donnent pas de croissance dans le glycérol liquide et ne donnent souvent aucune colonie colorable lorsqu'on les réévale, en entier, sur le milieu DHG 0,13. Il n'en est pas de même des petites abcédées formées par les zygotes du même croisement sur milieu DHac 0,13 : celles-ci donnent toujours une croissance dans le glycérol liquide et for-

ment, lors du réétalement sur milieu DHG 0,13, non seulement des colonies petites, mais encore des colonies colorables.

Les cellules qui constituent le "sommets rouge" des petites abcédées, ne sont, de toute évidence, pas des G banales.

Il n'est donc pas étonnant que les quatre types modaux de colonies soient reliés par des formes intermédiaires et que leur classement ne soit pas toujours aisé. Cette difficulté est particulièrement grande pour la distinction entre grandes et festonnées, car le festonnage peut présenter tous les degrés. On rencontre quelquefois également des colonies que l'on hésite à classer comme festonnées plutôt que comme petites abcédées. Cependant, la plupart du temps, cette classification se fait sans hésitation, les petites abcédées et les festonnées étant généralement séparées par une nette différence de taille. C'est pourquoi dans les statistiques dont il sera question, nous ne distinguerons que trois classes : colonies petites, petites abcédées et l'ensemble des grandes et festonnées.

Relation entre degré de suppressivité et fréquence des différents types de colonies: La très grande proportion de colonies festonnées et de petites abcédées dans les croisements $G \times p_s$, la grande rareté de ces mêmes types de colonies dans les croisements $G \times p_n$, montrent d'emblée que leur formation est due à la présence du FS dans les zygotes des croisements dont un des parents est une p_s .

Y a-t-il une relation simple entre degré de suppressivité de la p utilisée dans un croisement et la fréquence des différents types de colonies formés par les zygotes ?

Les statistiques effectuées de la manière indiquée sur les colonies formées dans des conditions standard par les zygotes des croisements d'une même G avec plusieurs p différant nettement par leur degré de suppressivité, permettent de constater que chaque croisement est caractérisé par des fréquences relatives particulières des différents types de colonies. Ceci ressort des chiffres du tableau 1 qui résume l'ensemble de nombreuses statistiques effectuées depuis trois ans sur huit croisements différents, pour lesquels on s'est toujours servi des cultures stock, et encore plus clairement des figures 1 et 2 où l'ensemble des données concernant les croisements avec les p 20/9 et dp 6/6-12 (% S = 70 et 45 respectivement) sont représentées graphiquement.

TABLEAU 1

Valeurs moyennes des fréquences relatives des différents types de colonies pour l'ensemble des divers croisements avec la souche grande, C-982-19b-1a (Milieu DHG 0,13)

Croisements avec	% grandes	% petites abcédées	% petites
2/16	2,2 (1-3,6)	2,8 (0,4-7,6)	95,0 (91-98)
20/9	9,0 (1,1-17)	23,0 (9,6-36,4)	68,0 (47-81)
12	39,5 (20-59)	15,5 (10,5-28)	45,0 (27,8-67)
2	74,7 (62-85)	9,0 (3,5-14)	16,2 (9,8-26,8)
A ₁₉	78,0 (67-87)	7,0 (4-14)	15,0 (10-22,8)
9	87,7 (78-95)	5,2 (0,3-11,4)	7,2 (3,7-11,4)
19dA ₁ (p_n)	98,2	0,3	1,5
19d (G)	99,0	0	1,0

Entre parenthèses, limites de variation.

Dans la première figure ces données sont groupées dans l'ordre des % S croissants, mesurés dans les différentes expériences ; dans la deuxième elles sont classées par ordre chronologique ; ceci met en évidence l'étendue des variations d'une expérience à l'autre. En comparant les deux parties de la figure 1 on constatera la constance des fréquences relatives des G et petites abcédées pour les deux croisements étudiés et ceci malgré les variations considérables du % S d'une expérience à l'autre. Deux remarques s'imposent ici. La première est que (malgré les difficultés de classement dont nous avons parlé plus haut), le dénombrement des petites abcédées fournit de toute évidence une mesure valable. La deuxième concerne les causes des variations considérables de la mesure du % S d'une même souche p d'une expérience à l'autre. On sait, (EPHRUSSI *et al.* 1954) que le % S d'une souche donnée peut subir de fortes variations au cours de la propagation végétative prolongée. Ces variations, qui sont héréditaires, sont le plus souvent dans le sens d'une diminution. Les variations dont nous parlons ici sont sans doute d'une autre nature car il s'agit de mesures indépendantes effectuées souvent sur de gros échantillons d'une même culture stock ou de cultures stock différentes, mais qui ne sont séparées que par un très petit nombre de générations cellulaires. Aussi, lorsque l'on regroupe les données de la figure 1 selon l'ordre chronologique, comme nous l'avons fait dans la figure 2, on voit que le plus gros des variations observées n'indique pas de tendance systématique à l'accroissement ou à la diminution du % S, c'est-à-dire qu'il s'agit de variations fortuites. Nous savons aujourd'hui qu'au moins une très grande partie de ces variations est due à des différences non contrôlées de notre milieu différentiel.

Lorsque l'on considère l'ensemble de nos résultats, on constate qu'en règle

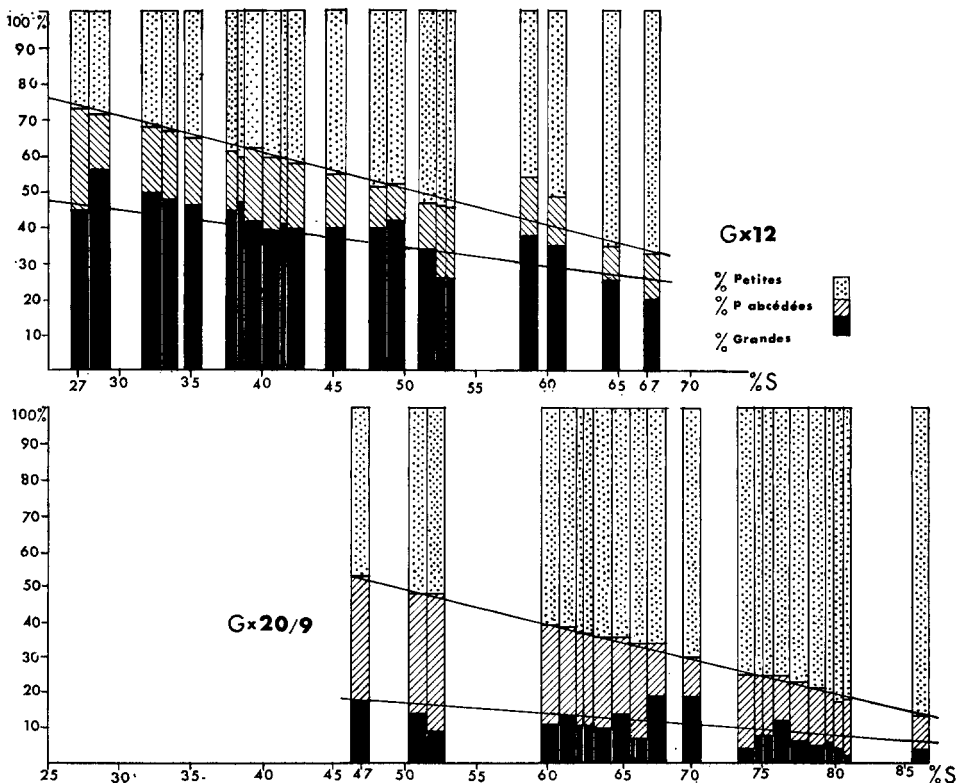


FIGURE 1.—Variation de la fréquence des différents types de colonies avec le degré de suppressivité. Croisements de deux souches p_s (12 et 20/9) avec une même souche G (19b-1a).

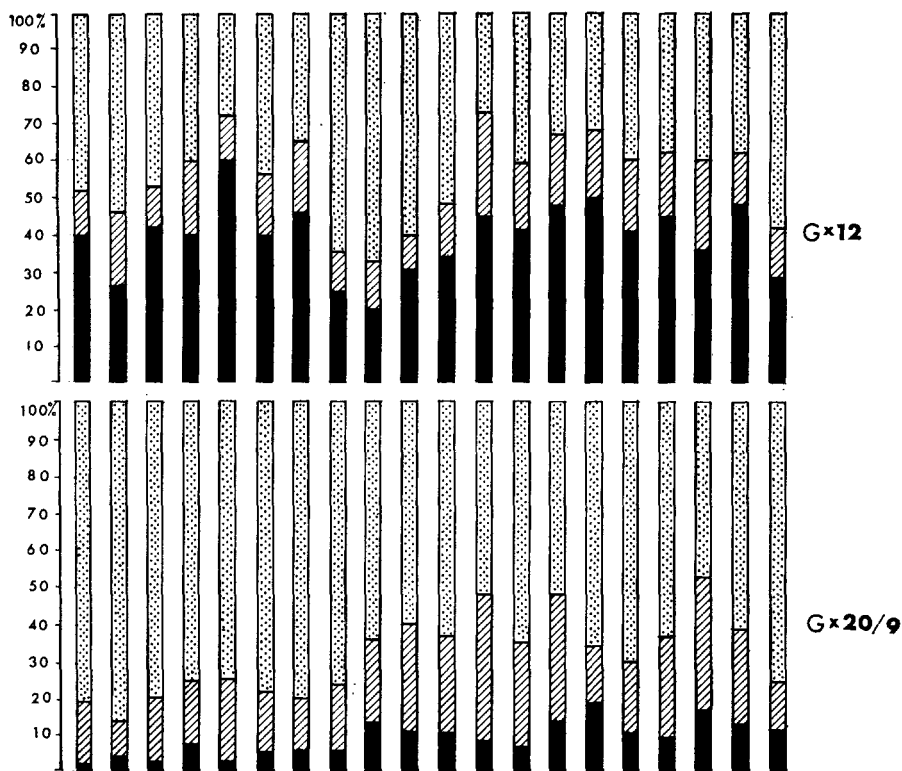


FIGURE 2.—Variation de la fréquence des différents types de colonies d'une expérience à l'autre. Les résultats, portant sur une période de 3 ans sont groupés par ordre chronologique. (Les symboles sont ceux de la figure 1).

générale, plus le % *S* d'une souche est élevé, plus petite est la fraction des colonies petites abcédées (figure 3).

Il faut remarquer toutefois que cette relation (1) n'est clairement reconnaissable que dans les croisements avec les souches dont la suppressivité est supérieure à 50 %. (Dans les cas des % *S* inférieurs elle est apparemment obscurcie par le fait que les colonies ayant au début de leur développement les caractéristiques de petites abcédées se confondent fréquemment, au moment de l'examen avec les *G*) ; (2) ne se dégage clairement que pour des souches étroitement apparentées, comme celles que nous étudions ici et qui, toutes, représentent des clones d'une même *p*. Même dans ce cas, elle comporte des exceptions. Cependant, lorsque l'on compare des souches d'un même degré de suppressivité, mais d'origine plus éloignée, cette règle ne s'applique plus et, en fait, on s'aperçoit que le tableau des manifestations de la suppressivité (en dehors bien entendu du pourcentage des *p* pris comme mesure du % *S*) peut être différent d'une souche à l'autre.

On n'en donnera qu'un exemple ; le croisement de notre souche *dp* 6/6-2 avec la *G* 19b-1a, donne 16 % de *p*, 9 % de petites abcédées et 75 % de *G* et festonnées, cette dernière catégorie

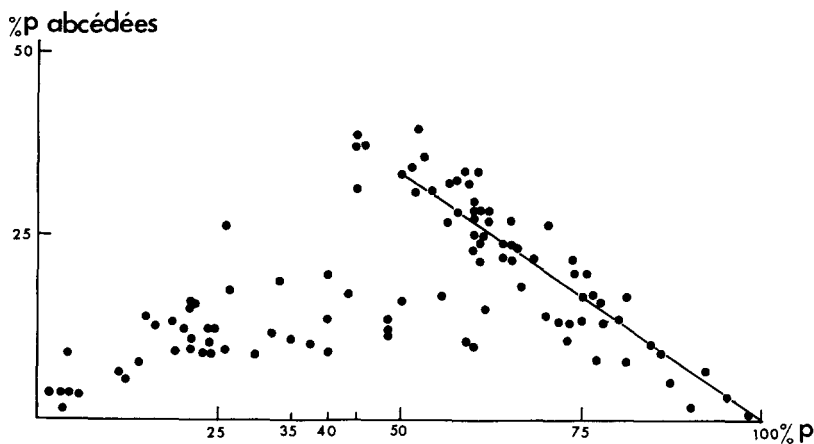


FIGURE 3.—Relation entre % S et fréquence des petites abcédées.

comprenant environ une festonnée pour cinq G. Le croisement d'une autre p avec la même G peut conduire à la formation d'autant de p , mais la répartition des types de colonies colorées sera tout autre, les festonnées étant beaucoup plus nombreuses que les petites abcédées et les G. *Il est clair, somme toute, que le % de p n'est qu'un des paramètres de la suppressivité et que celle-ci ne subit pas que des variations quantitatives.*

Variations expérimentales des manifestations de la suppressivité: La valeur mesurée du % S, ainsi que les autres manifestations de la suppressivité sont affectées par les conditions dans lesquelles sont placés les zygotes des croisements $G \times p_s$.

Nous n'étudierons ici que les effets de la température et du remplacement du glycérol par l'acétate de sodium dans le milieu de culture.

Les résultats d'une expérience dans laquelle les zygotes de plusieurs croisements étaient incubés à la fois à 30°C et à 18°C sont donnés dans le tableau 2 et la figure 4. On peut voir que le nombre de zygotes qui ont donné naissance à des colonies est le même aux deux températures et que, cependant, les fréquences relatives des trois types de colonies y sont très différentes : dans les croisements avec les deux souches les plus suppressives, l'élévation de la température a pour conséquence

TABLEAU 2

Influence de la température sur les fréquences relatives des différents types de colonies formés par les zygotes des croisements entre la grande C 982-19b-1a et différentes petites

Croisements avec	Incubation à 30°C				Incubation à 18°C			
	Nombre de colonies par 0,1 ml étalé	% grandes	% petites abcédées	% petites	Nombre de colonies par 0,1 ml étalé	% grandes	% petites abcédées	% petites
20/9	43	9,0	19,2	71,8	42	0,4	2,5	95,0
12	83	46,7	13,3	40,0	98	15,1	3,9	81,0
2	61	85,0	3,5	11,4	60	53,1	6,4	40,5
9	89	96,0	0,3	3,7	80	82,4	7,1	10,5
19dA ₁ (p_n)	66	98,0	0,4	1,0	76	98,1	0,9	1,0

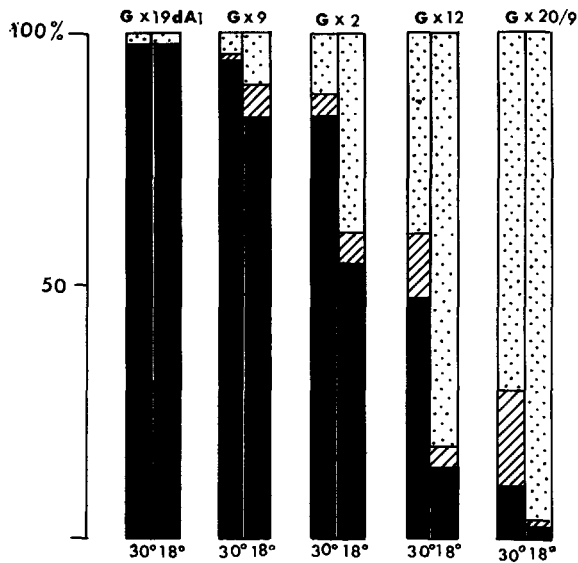


FIGURE 4.—Fréquence des différents types de colonies formés dans cinq croisements à deux températures (30° et 18°C) ($G \times p$). Les symboles sont ceux de la figure 1.

la diminution du % des petites avec augmentation corrélative des pourcentages des deux catégories colorées (petites abcédées et grandes) ; dans les deux croisements avec des p faiblement suppressives, la même variation de la température conduit à la diminution à la fois des petites et des petites abcédées.

Somme toute, sous l'influence des variations de la température, le "spectre" caractéristique de chaque croisement se déplace comme un tout, c'est-à-dire comme s'il était constitué par une séquence de formes interconvertibles : petites \rightleftharpoons petites abcédées \rightleftharpoons festonnées \rightleftharpoons grandes.

Des variations analogues peuvent être provoquées par le changement du milieu de culture. Le tableau 3 donne les fréquences relatives des différents types de colonies formés par les zygotes de plusieurs croisements dans une expérience où les mélanges de copulation ont été étalés simultanément sur les trois milieux : DH 0,13 ; DHG 0,13 et DHac 0,13. Ce tableau permet de voir que, pour un croisement donné, le nombre de zygotes qui ont formé des colonies est le même sur les trois milieux. Cependant, alors que les étalements sur les deux premiers milieux fournissent des résultats sensiblement identiques, ils donnent des résultats très différents sur le troisième : le pourcentage de p est toujours moindre sur DHac 0,13. (Il semble que cet effet ne se retrouve pas si au lieu d'acétate de Na on utilise l'acétate de K.)

Dans l'expérience qui vient d'être décrite, la concentration d'acétate de sodium a été choisie pour être à peu près équivalente à celle du glycérol. Dans une autre expérience, on a utilisé toute une gamme de concentrations d'acétate de sodium. Les résultats des étalements de trois croisements sont donnés dans la figure 5 : la fréquence des petites diminue lorsque la quantité d'acétate augmente, pour se stabiliser à un plateau dont le niveau est d'autant plus haut que la suppressivité du parent petite est plus élevée et qui ne semble pas pouvoir être dépassé. Cependant, le fait

TABLEAU 3

Fréquences relatives des différents types de colonies formés sur les milieux: (a) DH 0,13; (b) DHG 0,13; DHac 0,13 par les zygotes de divers croisements avec la souche grande C 982-19b-1a

Croisements avec	Milieu	Nombre de colonies par 0,1 ml étalé	% grandes	% petites abscedées	% petites
2/16	a	114	3,3	2,9	94
	b	109	6,3	5,3	89
	c	126	4,3	17,7	78
20/9	a	99	11,5	35,5	53
	b	89	12,2	30,0	57,8
	c	75	16,1	54,4	29,5
12	a	108	35,4	19,0	45,6
	b	102	37,8	18,2	44,0
	c	104	46,8	32,2	21,0
A ₁₉	a	68	71,4	7,8	20,8
	b	73	71,5	5,4	23,1
	c	68	75,8	10,5	13,7
2	a	83	76,7	7,7	15,6
	b	89	79,8	7,3	12,9
	c	78	83,8	10,5	5,7
19dA ₁ (p _n)	a	71	99,5	0,25	0,3
	b	67	99,0	0	1,0
	c	83	98,0	0	2,0
19d (G)	a	106	99,4	0,3	0,3
	b	95	99,3	0,0	0,7
	c	119	100,0	0	0

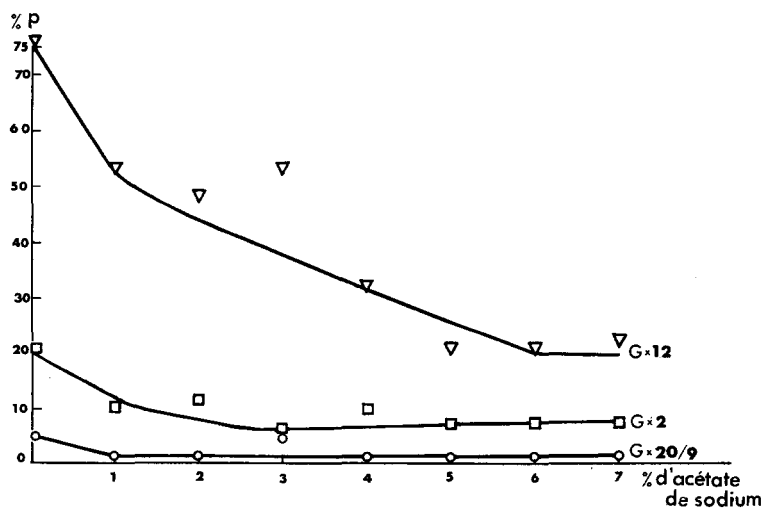


FIGURE 5.—Variation de la fréquence des colonies petites (% S) formées dans trois croisements $G \times p_n$, en fonction de la concentration de l'acétate de sodium dans le milieu.

que l'acétate de sodium exerce une action inhibitrice sur la croissance de la levure nous empêche d'être plus affirmatifs sur ce dernier point.

Les changements du milieu de culture conduisent donc, comme les changements de température, à des modifications des fréquences relatives des différents types de colonies caractéristiques de chacune des souches suppressives.

Quel est le dénominateur commun aux actions des deux facteurs que nous avons fait varier dans les expériences précédentes ? L'abaissement de la température cause, bien entendu, un ralentissement de la vitesse de multiplication cellulaire. Tel est aussi, très nettement, l'effet de l'acétate de Na (figure 6).

Pour s'en assurer, il suffit de comparer les colonies formées par les zygotes d'un même croisement sur les milieux DHG 0,13 et DHac 0,13 (figure 6) ; on constate que le diamètre des grandes est considérablement plus petit sur le milieu à l'acétate, alors que celui des petites, incapables d'utiliser l'acétate, n'est pas changé par rapport à ce qu'il est sur le milieu au glycérol. (Notons en passant que les grandes formées sur DHac 0,13 et, à un moindre degré les petites ont des contours moins réguliers et une surface plus rugueuse que sur DHG 0,13. Enfin, l'aspect des petites abcédées sur les deux milieux est très différent : elles présentent sur DHG 0,13 une auréole beaucoup plus distincte et un dôme moins élevé). Nous avons par ailleurs vérifié par des mesures de la densité optique que la croissance des G est sensiblement plus rapide dans le milieu synthétique liquide DH contenant 0,2 % de glucose que sur le même milieu contenant 0,2 % de glucose + 2,6 % d'acétate de sodium, alors que les vitesses de croissance des *p* sont égales sur les deux milieux. L'addition de 3 % de glycérol au milieu 0,2 % de sucre n'affecte au contraire pas la vitesse de croissance des G.

Comme l'abaissement de la température, l'addition d'acétate de Na freine donc très nettement le développement des colonies et cependant l'action de ces deux facteurs sur les fréquences des différents types de colonies est de signe contraire : le premier augmente la proportion des *p*, le second la réduit. Il n'y a donc pas de relation *simple* entre vitesse de multiplication et évolution des zygotes.

Quel que soit le mécanisme intime des variations observées, les expériences décrites s'accordent à montrer que *le sort d'au moins une grande fraction des zygotes, sort défini par la nature de leur descendance (colonie), n'est pas rigide-ment fixé dès la fusion des cellules parentales, car il peut être affecté par les conditions de culture.*

Nature des événements qui donnent naissance aux divers types de colonies: On a vu dans ce qui précède que toutes les colonies formées à la suite d'un croisement $G \times p_s$ forment un spectre quasi-continu de types coloniaux dans lequel la seule discontinuité appréciable est due à la petite taille des petites abcédées. Lorsque les conditions de culture sont modifiées, ce spectre se déplace comme un tout, comme si les colonies des différents types ne représentaient que différentes étapes d'une évolution commune, de sorte que le tableau observé à un moment donné serait l'équivalent d'un instantané pris au cours du développement hétérochrone d'une population de colonies. Bref, tout se passe comme si la genèse des divers types de colonies reflétait des variations purement quantitatives de l'action du FS.

Une telle gradation quantitative peut être conçue de deux manières.

Puisqu'il a été montré que la formation de colonies festonnées et de petites abcédées par des cellules normales traitées par l'acriflavine (EPHRUSSI *et al.* 1951) ou par les rayons ultra-violetts (PITTMAN 1959) est due à l'induction par ces

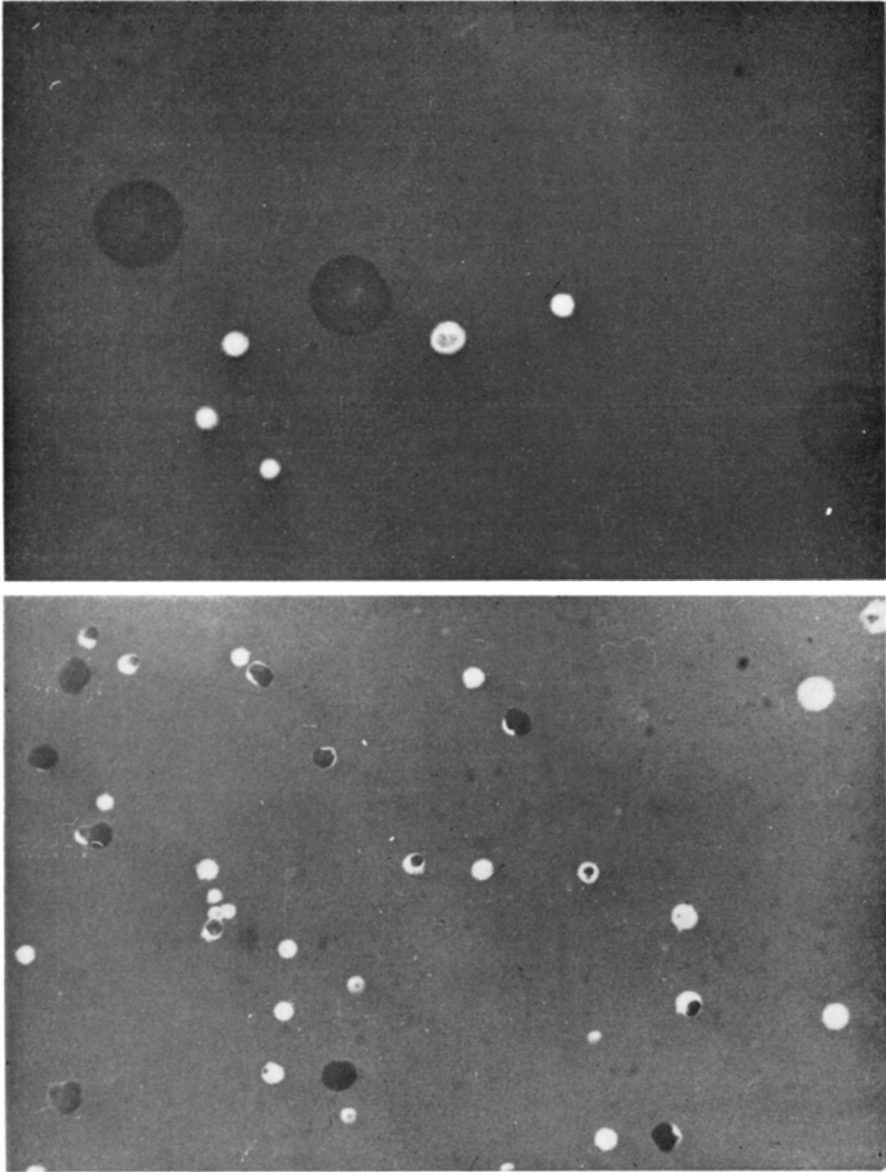


FIGURE 6.—Morphologie des colonies formées après 4 $\frac{1}{2}$ jours de croissance (1) sur milieu DHG 0,13 (en haut) (2) sur milieu DHac 0,13 après coloration par le TZ (Croisement G \times 20/9) (en bas). Colonies : *grandes* : entièrement rouges ; *petites abcédées* : présentant un point central ou une calotte rouge ; *petites* : entièrement blanches.

agents d'un état cellulaire instable se manifestant par un taux élevé de mutation Grande \rightarrow petite, et souvent transmis à la descendance, on peut penser que la formation de ces deux types de colonies dans les croisements G \times p_s est due à ce que le FS crée un état d'instabilité semblable dans les zygotes qui leur donnent

naissance. (Il a en effet été montré que le réétalement de telles colonies donne naissance à un mélange de colonies grandes et petites.) Rappelons que nous savons par ailleurs, qu'au départ, le FS est présent dans presque tous, sinon dans tous les zygotes et que les cellules normales ont toujours un avantage sélectif sur les mutants p . Que l'on considère les sorts différents des *différents zygotes d'un croisement placés dans les mêmes conditions*, ou le sort différent des *mêmes zygotes placés dans des conditions différentes*, on se trouve alors devant la même alternative : ces différences du devenir des zygotes sont-elles dues (a) aux fluctuations fortuites de la distribution dans le temps des événements mutationnels dont le taux est constant, mais dont les effets seraient amplifiés par la sélection ou (b) à des différences réelles entre les taux de mutation.

Prenons un cas concret, par exemple celui des expériences dans lesquelles les zygotes du croisement 19b-1a \times 20/9 évoluent sur deux milieux différents, DHG 0,13 et DHAc 0,13. Nous choisissons cet exemple parce que la comparaison des résultats observés sur les deux milieux nous servira plus bas à tester cette alternative. On se souviendra que le résultat notable d'une telle expérience est la proportion beaucoup plus grande de p sur le premier milieu. D'après l'hypothèse (a) cette différence, due à la sélection ne serait qu'apparente et le résultat observé dû à ce que la coloration au TZ ne permet pas de reconnaître les colonies ne contenant qu'une très faible proportion de cellules G.

Cette hypothèse apparaît *a priori* invraisemblable pour deux raisons :

(1) On a vu plus haut que l'acétate de sodium exerce une action inhibitrice sur la croissance des seules G alors que le glycérol n'affecte pas la vitesse de celle-ci. C'est donc sur l'acétate et non sur le glycérol que l'on s'attendrait à trouver moins de colonies colorables.

(2) Le pourcentage très élevé de p formé dans ce croisement implique un taux de mutation suffisamment élevé pour ne pas être compatible avec la formation d'environ 10 % de G apparemment normales.

Quoiqu'*a priori* cette hypothèse nous soit apparue invraisemblable elle a été soumise au test de l'expérience suivante. Les zygotes du croisement 19b-1a \times 20/9 ont été étalés sur un grand nombre de boîtes de deux séries, l'une contenant le milieu DHAc 0,13, l'autre le milieu DHG 0,13. Après deux, trois, quatre . . . etc. jours d'incubation à 25°C, quelques boîtes de chaque série ont servi : Les unes à établir le pourcentage de colonies colorables par le TZ (cette coloration n'étant possible qu'à partir du troisième jour, EPHRUSSI *et al.* 1956); les autres, à l'inoculation de toutes les colonies prélevées en entier (avec un bloc d'agar) dans des tubes contenant 5 cm³ de milieu DHG liquide. Ces tubes, incubés à 30°, sont observés au bout de trois semaines. Dans ces conditions, toute colonie contenant des G, même en nombre très petit et insuffisant pour être décelable par le test au TZ, doit donner naissance à une culture (test positif au glycérol) puisqu'il s'agit d'un milieu hautement sélectif où seules les G peuvent proliférer. L'hypothèse (a) de sélection prévoit qu'une fraction égale des colonies prélevées sur les deux milieux doit, quel qu'ait été leur âge au moment du prélèvement, donner un test positif au glycérol. Autrement dit, si les différents types de colonies qui se développent sur un milieu donné ne différaient, comme le suppose l'hypothèse de sélection, que par le moment où intervient la mutation grande \rightarrow petite, et si les deux

milieux comparés n'affectaient différemment que la sélection parmi les cellules des deux types nés avec la même fréquence, les courbes représentant la proportion de colonies ayant fourni un test positif au glycérol en fonction de l'âge des colonies devraient être deux droites horizontales qui se superposeraient et dont la hauteur ne dépendrait que de la valeur du taux de mutation.

Si, au contraire, la nature du milieu de culture affectait le taux de mutation, hypothèse (b), on devrait obtenir deux courbes différentes.

Toutefois, le plan d'expérience tel qu'il vient d'être décrit ne porte que sur des colonies âgées au minimum de deux jours et ne nous fournit pas la valeur au temps zéro. Pour obtenir cette valeur, il nous faut appliquer le test au glycérol aux zygotes individuels dès leur formation. Pour cela nous avons dilué le mélange de copulation de façon que seulement un tube sur cinq environ reçoive un zygote, le nombre exact de tubes ayant reçu un zygote étant déterminé par ensemencement d'une série de tubes contenant le milieu DH + 3 % de glucose, dans lequel tout zygote prototrophe, qu'il soit G ou p , peut proliférer. Une expérience témoin a été effectuée de la même manière avec le croisement $G \times p_n$ et, (pour la seule inoculation des zygotes) avec le croisement $G \times G$. Les résultats de cette expérience sont donnés par la figure 7 et par la partie supérieure du tableau 4.

Constatons d'abord que les zygotes du croisement $G \times p_n$ ($19dA_1$), ainsi que les clones (colonies) qu'ils engendrent sont toujours capables, quel qu'ait été le milieu où ils se sont formés, de proliférer aux dépens du glycérol : d'où les droites horizontales A et B de la figure 7.

Il en est tout autrement de l'évolution des zygotes du croisement $G \times p_s$ (haute-ment suppressive 20/9). Les résultats obtenus avec ceux-ci infirment l'hypothèse (a) car, contrairement à la prévision, (1) la fraction des colonies qui donnent un test de croissance positif au glycérol est beaucoup plus grande parmi les colonies

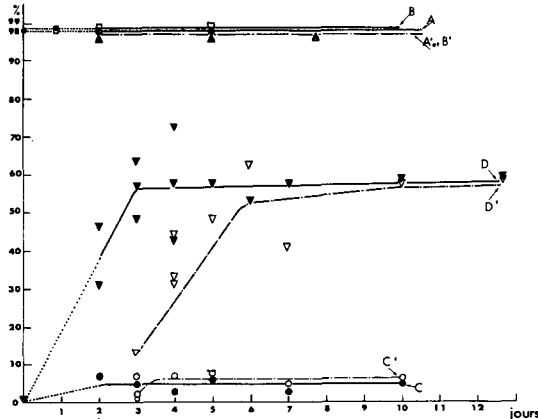


FIGURE 7.—Evolution en fonction du temps de la prolifération aux dépens du glycérol. Courbes : A et C des colonies des croisements $G \times p_n$ ($19dA_1$) et $G \times p_s$ (20/9) prélevées sur milieu DHG 0,13 ; B et D des colonies des mêmes croisements prélevées sur milieu DHAc 0,13. Courbes : A' et C' : % de colonies colorées formées par les deux croisements sur DHG 0,13. B' et D' : % de colonies colorées formées par les deux croisements sur DHAc 0,13.

TABLEAU 4

Relation entre test de la croissance aux dépens du glycérol (milieu DHG) des zygotes de divers croisements avec la grande C 982-19b-1a et colonies colorées formées sur milieu DHG 0,13

Croisements avec	Etalement sur DHG 0,13		Nombre de tubes inoculés (DH 3%)	Nombre de tubes positifs (DHG)	% tubes positifs	(% tubes positifs/ % colonies colorées) × 100
	% petites	% colonies colorées				
19d (G)	2,6	97,4	65	64	98,4	101
19dA ₁ (p _n)	1,0	99,0	81	80	98,7	99,3
20/9	89,4	10,6	55	1	1,8	16,4
12	53,1	46,9	52	15	28,8	61,2
20	38,0	62,0	26	3	11,5	18,6
2	16,0	84,0	77	36	46,7	55,4

prélevées sur milieu DHAc 0,13 (courbes C et D), (2) les deux courbes partent de zéro et n'atteignent un plateau qu'au troisième jour, plateau dont la hauteur correspond, à peu de chose près, pour chacun des milieux, à celui de la courbe de coloration au TZ. (Cette correspondance n'est d'ailleurs pas parfaite car certaines petites abcédées comme nous l'avons déjà indiqué ci-dessus et comme on le verra plus bas, ne prolifèrent pas lorsqu'on les inocule dans le glycérol). Cependant, avant le 5^{ème} jour, il y a un écart sensible entre ces courbes et celles des colonies colorées, les premières atteignant le plateau avant les secondes.

Revenant à la question à laquelle ces expériences devaient répondre, nous sommes amenés par ces deux constatations à conclure respectivement que (1) la différence des résultats fournis par les colonies prélevées sur les deux milieux doit être imputée à un évènement dont la fréquence est différente sur ces deux milieux et (2) que cet évènement ne peut pas être simplement la mutation grande → petite. *Autrement dit, la différence entre les populations de colonies observées sur les milieux DHG 0,13 et DHAc 0,13 est due à ce que ces milieux orientent différemment l'évolution des mêmes zygotes, ce qui révèle leur état particulier.*

Remarquons maintenant que le fait, qu'à une seule exception près, aucun des zygotes du croisement G × 20/9 n'a donné de test positif (c'est-à-dire une croissance suffisante pour provoquer un trouble visible dans le glycérol) pris conjointement avec les tests positifs donnés par tous les zygotes des croisements G × G et G × p_n, montre, indubitablement, que cette absence de croissance des premiers est liée à la présence du FS.

Remarquons par ailleurs, que le fait qu'un test négatif au glycérol soit donné par les zygotes qui, placés sur un milieu contenant du sucre, donneraient des colonies colorées, montre que *la nature même du test employé affecte celle des résultats obtenus lorsque ce test est appliqué à des cellules ayant reçu le FS.*

Les mêmes résultats ont été fournis par une expérience moins complète où les colonies étaient cultivées à 30°C. On se souvient qu'à cette température le nombre de colonies colorables est plus élevé qu'à 25°C sur DHG 0,13 et on obtient ainsi des chiffres plus valables.

Des colonies de deux âges (2 et 6 jours) formées sur DHG 0,13 ont été étudiées. Parmi les 347 colonies de 6 jours testées, 105, c'est-à-dire 30,2 % étaient colorables par le TZ et 15 sur 60

colonies testées, c'est-à-dire 25 % ont proliféré aux dépens du glycérol. Parmi les 60 colonies de 2 jours testées de la même façon, seules 5, c'est-à-dire 8,3 % ont poussé sur glycérol. (Les colonies de levure normale ne se colorent pas encore à cet âge).

D'autre part, parmi 414 colonies de 6 jours formées sur le milieu DHac 0,13 seulement 266, c'est-à-dire 64,2 % étaient colorables et 38 sur 60, c'est-à-dire 63,3 étaient capables de proliférer aux dépens du glycérol. Parmi les 48 colonies de 2 jours testées, seulement 16, c'est-à-dire 33,3 % ont proliféré aux dépens du glycérol.

Dans ce qui suit, nous garderons donc présente à l'esprit cette dernière conclusion qui nous interdit d'extrapoler les propriétés et l'évolution des zygotes d'un milieu à l'autre.

Avec cette réserve, constatons que la forme des courbes de la figure 7 qui traduisent l'évolution en fonction du temps, de la capacité des zygotes du croisement $G \times 20/9$ et des clones qui en sont issus de croître aux dépens du glycérol, s'accorde avec la description formelle suivante :

La première conséquence de la fusion d'une cellule normale, ayant la capacité de proliférer indéfiniment aux dépens du glycérol, avec une p_s hautement suppressive est le passage du zygote dans un état particulier caractérisé, (outre le fait que le milieu peut influencer son évolution), par l'abolition provisoire de cette capacité qui, au cours des générations suivantes effectuées sur un milieu contenant du sucre, mais non sur glycérol seul, réapparaît dans une fraction des clones, sensiblement égale au nombre de colonies colorées (comparer courbes C et C' et D et D').

Cette description convient également à une partie des zygotes des croisements de la G avec des p_s moins suppressives que 20/9. Les résultats relatifs à ces zygotes figurent dans la partie inférieure du tableau 4. En les comparant avec les résultats du même test appliqué aux zygotes $G \times 20/9$, on verra qu'il existe une relation entre degré de suppressivité et capacité de croissance des zygotes dans le glycérol : d'une façon générale, plus le degré de suppressivité d'une souche est bas, plus il y a de zygotes capables de se développer dans le glycérol en donnant naissance à des cellules dont la croissance se poursuit de façon illimitée. Cependant, seule une fraction des zygotes qui donnent naissance à des colonies colorables lors du développement sur un milieu contenant du sucre, prolifèrent dans le glycérol. Cette fraction est de 61, 18 et 55 % respectivement pour les trois croisements étudiés.

On remarquera que la souche dp 6/6-20 ne se place pas de façon attendue dans la série. Ceci est un exemple de ce qui a été dit plus haut sur les paramètres de la suppressivité.

Delai d'action du facteur suppressif perte différée de la capacité respiratoire sous l'action du FS: Dans ce qui précède nous avons vu qu'une fraction au moins, sinon tous les zygotes des croisements $G \times p_s$ se trouvent dans un état particulier caractérisé par le fait que le milieu affecte leur évolution. On se rappellera en particulier que. (1) placés dans du glycérol liquide ils ne donnent pas de croissance visible alors que, étalés sur des milieux (DHG 0,13 ou DHac 0,13) où, pour commencer ils disposent d'une petite quantité de sucre, ils donnent tous naissance à des colonies, (2) placés sur ces deux derniers milieux, les mêmes zygotes donnent naissance à des colonies de types différents.

Les expériences dont on donnera ici les résultats, réalisées grâce à la technique

de micromanipulation, ont eu pour objectif initial l'observation directe de la capacité des zygotes des différents croisements (et éventuellement de leurs bourgeons) de proliférer aux dépens du glycérol, afin de nous rendre compte en particulier, si l'absence de leur croissance aux dépens du glycérol seul (voir ci dessus) est due à ce qu'ils n'y bourgeonnent pas ou à ce qu'ils n'y forment qu'un nombre limité de bourgeons p incapables de se multiplier à leur tour.

La micromanipulation en chambre à huile (DE FONBRUNE 1949) nous a permis d'isoler les zygotes et de suivre leur bourgeonnement dans des gouttelettes de milieu liquide DHG. Les zygotes synchrones ont été obtenus par la technique déjà indiquée (JAKOB 1962) et lavés pour éliminer les traces de sucre avant leur isolement. Celui-ci n'a porté que sur des zygotes dépourvus de bourgeons. Les bourgeons formés par ces zygotes dans le milieu au glycérol pouvaient être détachés au fur et à mesure de leur formation et transférés dans de nouvelles gouttelettes du même milieu. Les clones issus de ces bourgeons pouvaient être prélevés à la micropipette et étalés, en entier, sur du milieu glucosé.

La micromanipulation, dont la durée n'a jamais excédé une heure, a été exécutée à la température du laboratoire. Les cultures étaient ensuite incubées à 30°C. Dans ces conditions, le temps de génération des G était d'environ quatre heures. On a considéré que la multiplication était arrêtée lorsque les cellules ne formaient pas de nouveaux bourgeons pendant 24 heures. Dans les cas où les cellules dans une gouttelette étaient trop nombreuses pour permettre le comptage, le clone était étalé 72 heures après l'isolement du bourgeon. Les colonies formées sur milieu gélosé étaient comptées et examinées après 4 ½ jours de croissance à 30°C et coloration au TZ.

Les données concernant la capacité de croître dans le glycérol des zygotes des croisements de la G (19b-1a) avec des p de suppressivités variées et de trois croisements témoin ($G \times G$; $G \times p_n$; $p_n \times p_n$) sont résumées dans le graphique 8A et dans le tableau 5. Le graphique indique le nombre de bourgeons formés par les divers zygotes et le tableau 5 (colonne 3) leur nombre moyen.

Remarquons tout d'abord que, dans tous les cas étudiés, un petit nombre de zygotes n'a pas bourgeonné, ceci pourrait être dû à des traumatismes survenus au cours de l'isolement des zygotes.

Malgré le nombre relativement petit de zygotes analysés on voit que, dans le milieu au glycérol : (1) Un zygote résultant de la fusion de deux cellules G ou d'une G avec une p_n forme en moyenne 17 bourgeons. (2) Les zygotes résultant de la fusion de deux p_n ne bourgeonnent en général pas ou ne forment qu'un seul bourgeon. (3) Si l'on tient compte des zygotes $G \times G$ ou $G \times p_n$ qui ne se divisent pas, on peut affirmer que *tous* les zygotes d'un croisement $G \times p_s$ se divisent quel que soit le degré de suppressivité du parent p , mais que, (4) Le nombre de bourgeons formés par chacun des zygotes est d'autant plus petit que le degré de suppressivité du parent p est plus élevé. Le nombre moyen le plus faible (5,7) est fourni par les zygotes $G \times p_s$ hautement suppressive (2/16). (5) Le nombre de bourgeons varie largement autour de la moyenne, mais la distribution ne semble présenter qu'un seul mode.

Dans les croisements $G \times p_s$ nous avons toujours trouvé quelques zygotes ayant fourni un nombre élevé de bourgeons (15 ou plus), mais nous verrons plus loin qu'ils ne sont pas identiques à ceux des croisements témoin $G \times G$ ou $G \times p_n$: l'ensemble ou la grande majorité de leur descendance, née dans le glycérol, s'arrête de croître et forme des colonies petites après étalement sur DHG 0,13. Nous n'avons pas trouvé dans ces croisements de zygotes se comportant à cet

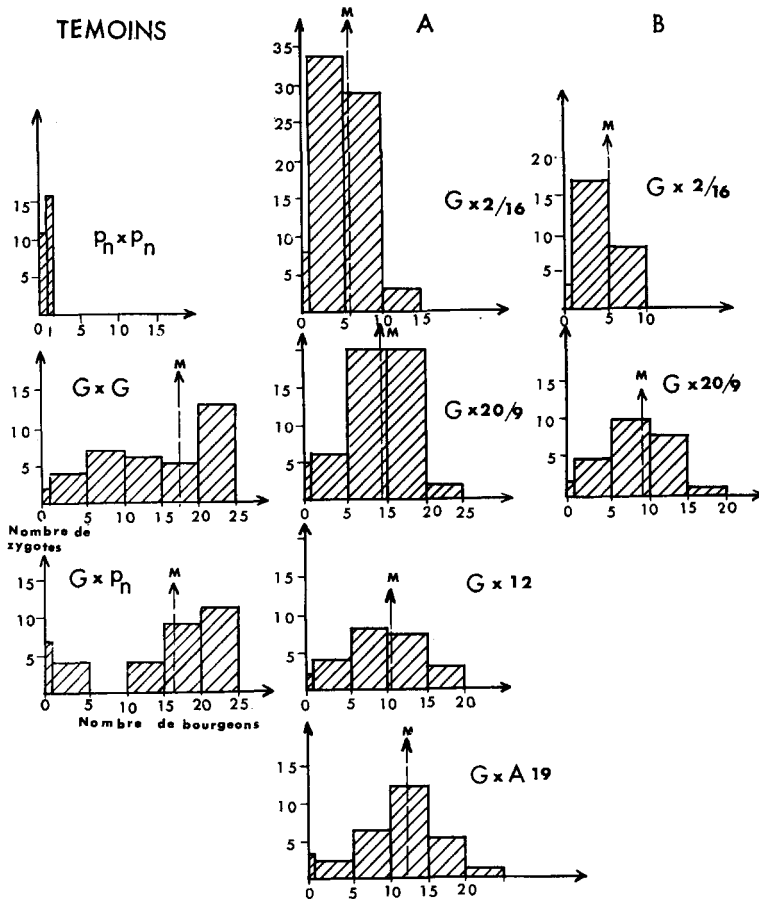


FIGURE 8.—Histogrammes représentant le nombre de bourgeons formés par chacun des zygotes lorsque la croissance s'effectue aux dépens du glycérol (milieu DHG). A : après croisement en présence d'air ; B : après croisement en anaérobiose. M : Nombre moyen de bourgeons caractéristique pour chacun des croisements étudiés.

égard comme ceux d'un croisement $G \times G$ (s'ils existent ils sont donc rares) et nous n'en avons observé que très peu qui se comportent comme ceux du croisement $p_n \times p_n$.

L'arrêt précoce du bourgeonnement des zygotes $G \times p_n$ n'est dû ni à la carence du milieu (car la division ne reprend pas après transfert des zygotes dans une gouttelette de milieu DHG frais), ni à la mort des zygotes (car l'addition d'une petite quantité de glucose permet la reprise du bourgeonnement). Lorsque l'on étale les clones formés dans le glycérol, sur milieu gélosé contenant du sucre, on s'aperçoit que, sauf dans quelques cas exceptionnels, que nous discuterons plus loin, ils ne forment que des colonies petites. *L'arrêt de la croissance est donc bien dû à la perte de la capacité des cellules d'oxyder le glycérol, perte qui n'est pas immédiate, mais se produit après un certain temps.* Pour le zygote lui-même ce temps, mesuré par le nombre de bourgeons qu'il a formés, définit le délai maxi-

TABLEAU 5

Nombre moyen (m) de bourgeons formés par les zygotes de quatre croisements $G \times p_s$ et de trois croisements témoin. Nature des bourgeons d'après les résultats des étalements sur DHG 0,13

1 Croisement	2 % S	3 Bourgeons (m) (*)		4 Fréquence des zygotes à descendance entièrement petite	5 Fréquence des bourgeons à descendance entièrement petite
Témoins					
$G \times G$					
19b-1a \times 19d	0	17,6	(35)*	0	0
$G \times p_n$					
19b-1a \times 19dA ₁	0	16,6	(28)	1%	1%
$p_n \times p_n$					
19b-1a-A \times 19dA ₁	0	0,6	(27)	100%	100%
G 19b-1a $\times p_s$					
2/16	97	5,7	(66)	100%	100%
20/9	70	9,75	(28)	100%	100%
12	45	10,3	(22)	73%	91%
A-19	13	12,2	(26)	34,5%	74%

* Entre parenthèses : nombre de zygotes étudiés.

mum d'action du FS, après lequel le zygote est converti en p (quelques exceptions seront discutées plus loin). Le délai est d'autant plus long que le degré de suppressivité du parent p est plus bas.

L'observation des bourgeons détachés montre que la plupart de ceux-ci possèdent eux aussi, du moins pendant un certain temps, la capacité de se multiplier aux dépens du glycérol. Le nombre de cellules formées par l'ensemble des bourgeons des zygotes individuels des différents croisement étudiés est indiqué dans le graphique 9. On voit qu'en règle générale, *plus le degré de suppressivité de la souche p est bas, plus le nombre de cellules formées par zygote dans le glycérol est grand.*

Comme on peut le voir sur le graphique, la majorité des zygotes de chacun des différents croisements étudiés, forment les nombres suivants de cellules : $G \times 2/16$: 10 à 30 ; $G \times 20/9$ et $G \times 12$: 100 à 500 ; $G \times A_{19}$: 200 à 1000 ou plus. Pour le croisement témoin $p_n \times p_s$ ce nombre n'est que de 2 et dans les croisements $G \times G$ et $G \times p_n$ il atteint 1 à 2000 cellules. Mentionnons encore, que pour chacun des croisements, les premiers bourgeons issus d'un zygote donné se divisent plus souvent que les suivants et que les bourgeons successifs ont une descendance de moins en moins nombreuse.

Examinons maintenant la nature des colonies produites sur milieu glucosé (DHG 0,13) par les clones issus des bourgeons dans le milieu au glycérol (étalement après 72 heures qu'il y ait eu ou non arrêt de la croissance). Puisque la croissance a lieu dans le glycérol où seules les G prolifèrent, on s'attend à ce que les étalements donnent naissance à des colonies colorables. En réalité, il n'en est rien. L'examen de la colonne 4 du tableau 5 montre qu'une fraction des cellules formées dans le glycérol, fraction d'autant plus grande que la suppressivité du parent p_s est plus élevée, forme des colonies petites. Malgré leur prolifération

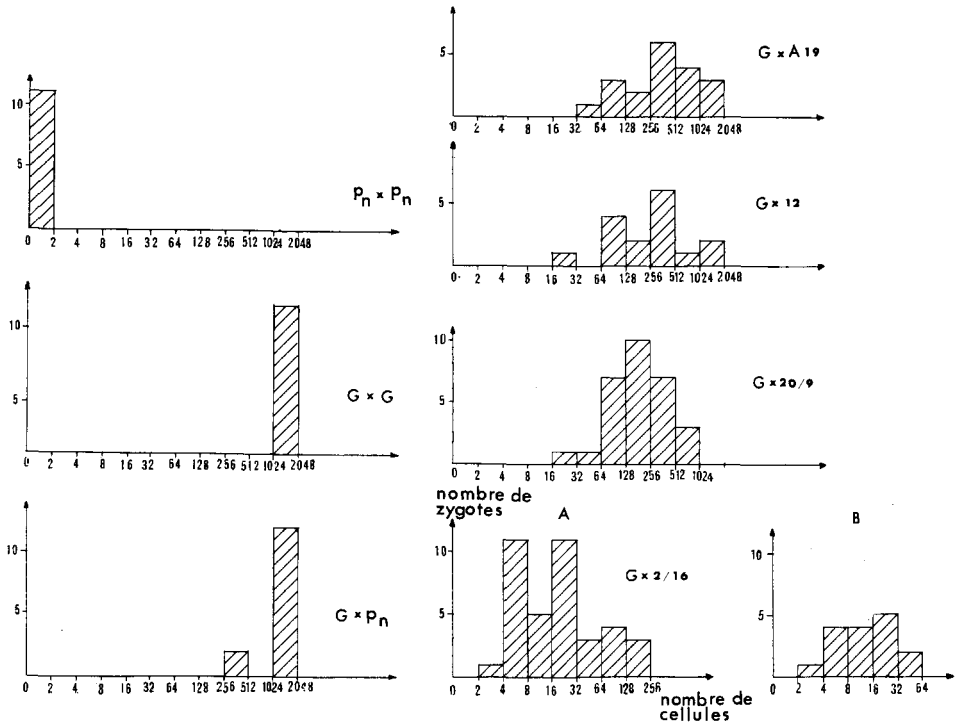


FIGURE 9.—Histogrammes représentant le nombre total de cellules formées dans le milieu au glycérol par l'ensemble des bourgeons de chacun des zygotes. A : de sept croisements effectués en présence d'air ; B : du croisement $G \times 2/16$ effectué en anaérobiose.

dans le glycérol, ces cellules manifestent donc encore l'effet du FS, se traduisant par un taux élevé de mutation en p .

On notera que le % de zygotes à descendance entièrement p (colonne 4) est plus grand que prévu d'après le % S (colonne 2) établi de la façon habituelle, c'est-à-dire par étalement des zygotes aussitôt formés sur le milieu différentiel contenant du sucre. Ceci conduit à se demander si le glycérol n'induit pas la mutation grande \rightarrow petite. Alors que des observations inédites montrent que, dans certaines conditions, le glycérol a effectivement une légère action mutagène celle-ci ne suffit pas à rendre compte des résultats relatés ici. Pour s'en assurer, il suffit de constater que les zygotes des croisements témoin $G \times G$ ou $G \times p_n$ ne sont pas affectés dans ces mêmes conditions de culture. Il en ressort que, si le glycérol affecte les zygotes $G \times p_s$ c'est parce que ceux-ci, à la suite de la présence du FS, se trouvent dans un état particulier.

La comparaison des colonnes 4 et 5 du tableau 5 montre d'autre part que la fréquence des *bourgeons* à descendance entièrement p est plus élevée que celle des *zygotes* à descendance entièrement p , ce qui revient à dire que la mutation en petite se produit souvent dans les bourgeons, autre preuve du délai d'action du FS.

D'autre part, si l'on compare les bourgeons successifs formés par les zygotes d'un même croisement, il apparaît que la probabilité d'une descendance entièrement petite croît dans l'ordre de la formation des bourgeons (tableau 6).

TABLEAU 6

Fréquence des clones à descendance entièrement petite, déterminée d'après l'examen des colonies, pour les bourgeons successifs

N° d'ordre du bourgeon	Croisements de la G (19b-1a) avec les petites					
	2/16	20/9	12	A ₁₉	19d _(G)	19dA ₁ (p _n)
1	100% (26/26)	100% (34/34)	81% (17/21)	40% (9/22)	0% (0/18)	0% (0/11)
2	100% (26/26)	100% (30/30)	90% (17/19)	72,3% (18/25)	0% (0/18)	0% (0/11)
3	100% (25/25)	100% (26/26)	94% (16/17)	79,0% (15/19)	0% (0/18)	0% (0/11)
4	100% (24/24)	100% (20/20)	100% (14/14)	74% (14/19)	0% (0/18)	0% (0/11)

Entre parenthèses nombre de zygotes p /nombre total de zygotes examinés.

Les faits rapportés ici relatifs au nombre de générations que les zygotes $G \times p_s$ et leur descendance peuvent effectuer aux dépens du glycérol (division qui implique, comme nous l'avons déjà mentionné, la présence et le fonctionnement des enzymes respiratoires) donne une indication quant à l'action du FS.

A première vue, le délai le plus court que nous ayons observé (quatre à cinq générations cellulaires pour le croisement $G \times 2/16$) pourrait être celui requis pour la dilution des enzymes préformés (apportés par le parent G). Il est, en effet de même ordre que celui nécessaire à l'expression phénotypique d'une petite nouvelle-née (OGUR *et al.* 1959). Cela impliquerait que l'action du FS est immédiate et bloque d'emblée la néo-formation des enzymes respiratoires. Nous verrons dans un instant que cette interprétation n'est pas correcte. Dès maintenant il est évident qu'elle ne convient pas pour les zygotes des autres croisements. En effet, le nombre de divisions cellulaires est si élevé, qu'il montre indiscutablement que l'action du FS n'aboutit pas immédiatement à la destruction des enzymes respiratoires et n'empêche pas leur fonctionnement. La synthèse de ces enzymes doit au contraire continuer pendant quelque temps après la fusion d'une G avec une p_s .

Il en est ainsi, même dans le cas du croisement effectué avec la souche hautement suppressive 2/16. Ceci peut être démontré par des expériences de micro-manipulation identiques aux précédentes, mais portant sur des zygotes qui, au départ, ne contiennent pas d'enzymes respiratoires.

De tels zygotes sont obtenus en cultivant les souches à croiser en anaérobiose (pendant une trentaine de générations et jusqu'à arrêt de croissance pour la G, ce qui, d'après SLONIMSKI (1953), est plus que suffisant pour que les enzymes préformés soient dilués) et en les croisant dans des conditions d'anaérobiose. Les zygotes une fois formés sont manipulés dans la chambre à huile en présence d'air.

Dans ces conditions, les zygotes du croisement témoin $G \times p_n$ produisent, comme en culture aérobie, un nombre moyen de 17 bourgeons, chacun de ceux-

ci se divisant à son tour. Les zygotes des croisements $G \times p_s$ ($G \times 2/16$ et $G \times 20/9$) ont donné les résultats représentés dans la figure 8B, qui ne sont pas statistiquement différents de ceux obtenus en aérobiose (figure 8, A et B). L'absence d'enzymes préformés ne modifie donc pas de façon appréciable les résultats, même pour le croisement $G \times p_s$ hautement suppressive, ce qui n'est explicable que si l'on admet que le zygote et les cellules qui en sont issues sont capables d'effectuer la synthèse des enzymes respiratoires, autre preuve que l'action du FS n'est pas immédiate.

Mentionnons encore ici que l'action du FS ne s'exerce que si la cellule se divise. En effet, si les zygotes du croisement $G \times 2/16$ par exemple, avant d'être transférés dans le milieu DHG, sont isolés et maintenus pendant 24 heures dans une solution de ClNa à 8,5 ‰ à 30°C, conditions dans lesquelles les zygotes restent vivants mais ne se divisent pas, le délai maximum d'action du FS (mesuré par le nombre de divisions du zygote et de ses bourgeons dans le glycérol) n'est pas affecté (figure 10, A et B).

Etude de l'état "prémuationnel": A. A l'échelle de la cellule. Si l'on caractérise successivement, comme nous l'avons fait, les zygotes des croisements étudiés et leur descendance d'abord par le test de croissance aux dépens du glycérol, puis par les types de colonies auxquels ils donnent naissance, on s'aperçoit que ces

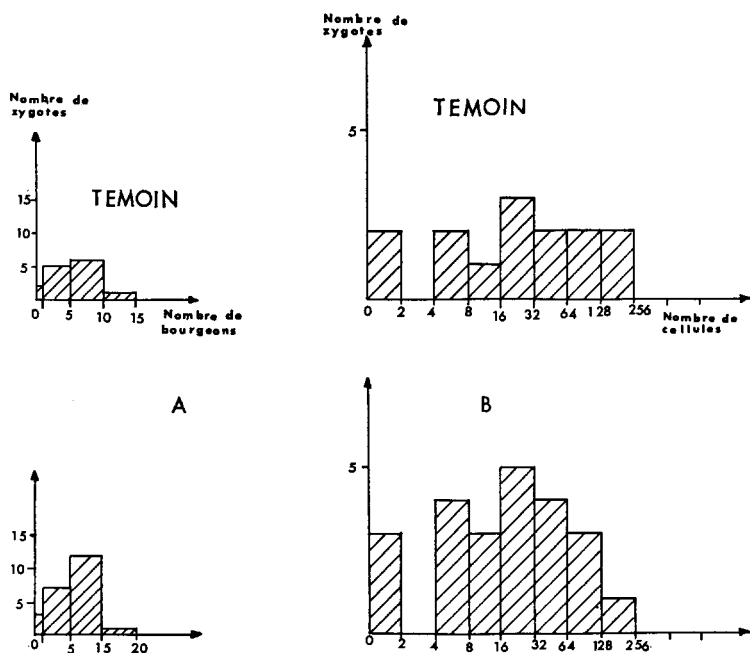


FIGURE 10.—Influence du maintien des zygotes en l'absence de multiplication (dans ClNa 8,5 ‰ avant la division dans de milieu au glycérol. Croisement $G \times 2/16$. Comparaison entre zygotes se multipliant immédiatement après leur isolement (haut) et zygotes maintenus au préalable en l'absence de division (bas). A : histogrammes représentant le nombre de bourgeons formés par chacun des zygotes. B : histogrammes représentant le nombre de cellules formées par l'ensemble des bourgeons de chacun des zygotes.

TABLEAU 7

Pedigree d'un des zygotes du croisement $G \times p_8 (A_{19})$

N° d'ordre du bourgeon	Nombre de colonies			
	grandes	petites abcédées	petites	total
1	0	0	116	116
2	52	2	2	56
3	44	0	0	44
4	9	0	0	9
5	69	0	0	69
6	0	0	35	35
7	35	0	0	35
8, 9 et 10	80	0	0	80

Nombre de colonies de chaque type formées sur milieu gélosé (DHG 0,13) par les clones après arrêt de la croissance dans le milieu liquide au glycérol.

N.B. Dans les cas où les cellules sont peu nombreuses (moins de 50) le nombre de colonies correspond au nombre de cellules comptées directement avant étalement. Les cellules sont isolées et ne forment que rarement des groupes après arrêt de la croissance dans le glycérol.

deux tests, toujours concordants pour les G et les p typiques ne le sont pas toujours ici, révélant au moins deux états cellulaires nouveaux.

Des exemples d'un premier état sont fournis par quelques bourgeons du zygote dont le pedigree est donné dans le tableau 7. Toutes les cellules, à l'exception peut-être des clones dérivés du premier bourgeon, ont cessé de bourgeonner dans le glycérol et ne reprennent pas la multiplication lorsque l'on renouvelle le milieu ; on en déduirait qu'elles sont converties en p . Cependant, étalés sur un milieu contenant du sucre (DHG 0,13) les clones dérivés des 2ème, 3ème, 4ème, 5ème et 7ème bourgeons donnent naissance à des colonies G, colorables au TZ. Nous avons là autant d'exemples de ce que nous allons appeler provisoirement des "petites phénotypiques" c'est-à-dire des cellules qui se comportent comme des p dans le glycérol mais qui sont pourtant encore capables de donner naissance à des G.

Un état différent, sinon opposé, peut aussi être observé dans certains cas. On se souvient que les zygotes du croisement $G \times 20/9$ forment souvent dans le glycérol des clones de 100 à 1000 cellules qui finissent par être converties en p . Si on étale zygotes et bourgeons à un moment où ils sont encore capables de se multiplier pendant de nombreuses générations aux dépens du glycérol (par exemple après 24 heures de croissance dans ce milieu) c'est-à-dire pendant qu'ils se comportent encore, par ce critère, comme des G, le résultat reste le même : ils ne forment que des colonies p . Une évolution a donc commencé sur glycérol qui ne s'arrête pas, même si l'on transporte les cellules sur milieu glucosé.

B. *Au niveau de la colonie*: Des résultats similaires sont obtenus lorsque les zygotes sont étalés sur milieu au glycérol (DHG) et transférés, après des temps de plus en plus longs, simultanément sur les deux milieux DHG 0,13 et DHac 0,13 (figure 11).

Ce transfert peut être réalisé en procédant de la façon suivante : Le mélange de copulation est étalé à la surface du milieu gélosé garni d'une feuille de cellophane ayant les dimensions de la boîte de Pétri. Cette feuille est posée préalablement, après stérilisation dans l'eau bouillante et

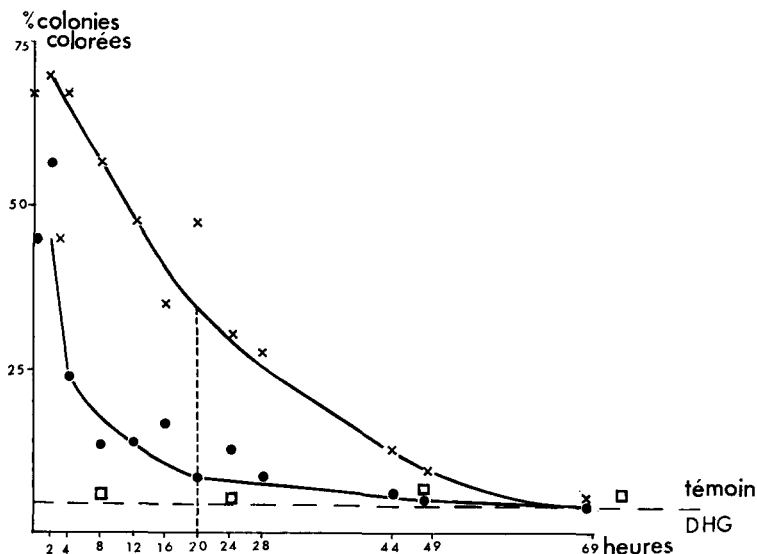


FIGURE 11.—Variation de la fréquence des colonies colorées en fonction du milieu de culture. Croisement $G \times 20/9$. Zygotes étalés sur milieu DHG (□) et transférés après des temps différents, simultanément sur les 2 milieux DHG 0,13 (●) et DHAc 0,13 (×).

il est aisé de la transporter d'une boîte à une autre, sans que les jeunes colonies soient dissociées. Nous avons vérifié que la diffusion des éléments nutritifs du milieu est normale et que ni le nombre, ni le type de colonies formées n'est affecté par la culture sur cellophane et par le simple transport d'une boîte à une autre.

On voit alors que : (1) Si la croissance s'effectue depuis le temps zéro sur les milieux DHG 0,13 et DHAc 0,13, la fréquence des colonies colorables au TZ est respectivement de 45 et 70 % alors que sur DHG seulement 4 % des zygotes forment une colonie visible. (2) La fréquence des colonies colorables (examinée toujours après 4 ½ jours de croissance) diminue progressivement lorsque le temps écoulé avant le transfert augmente. Par exemple, lorsque le transfert est effectué après 20 heures de croissance sur le glycérol, la fréquence des colonies colorables devient 9 % sur DHG 0,13, et 35 % sur DHAc 0,13. Si le transfert est effectué après 48 heures, 4 % seulement des colonies se colorent, quel que soit le milieu glucosé sur lequel la croissance ait eu lieu ensuite.

Nous savons par les expériences de microdissection que nous venons de décrire que tous les zygotes et leurs bourgeons sont capables de se diviser aux dépens du glycérol mais que, sur ce milieu une évolution commence qui ne s'arrête pas, même si on transporte les cellules sur milieu DHG 0,13.

Le fait que 20 heures après l'étalement sur glycérol 35 % des zygotes puissent encore donner naissance à des colonies colorables contenant des cellules G, montre bien que ces zygotes n'étaient pas, dès ce moment, convertis en *p*. La conversion grande \rightarrow petite n'est pas, comme nous le savons déjà, instantanée mais elle est, au contraire, précédée par une longue période pendant laquelle un changement de milieu peut orienter différemment le sort du zygote ou de sa descendance. Les

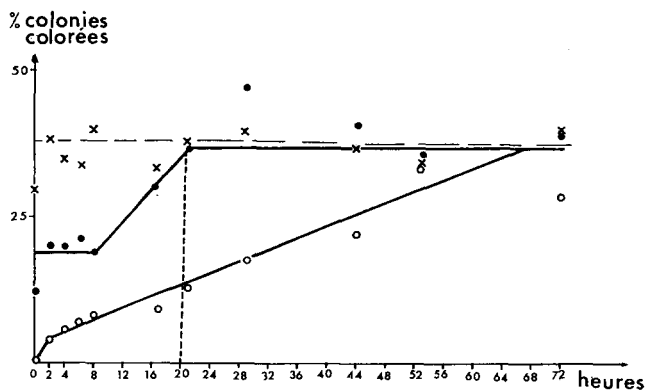


FIGURE 12.—Variation de la fréquence des colonies colorées en fonction du milieu de culture. Croisement $G \times 2/16$. Zygotes étalés sur milieu DHAc 0,13 (×) et transférés après des temps différents, simultanément sur les milieux DHG 0,13 (●) et DHG (○).

événements aboutissant à la formation de p sont peut-être les mêmes quel que soit le milieu de culture, mais nous voyons qu'ils ne se produisent pas de façon simultanée. Bien que le milieu au glycérol soit sélectif pour les cellules G , ce milieu semble favoriser ici la conversion en p (voir aussi ci dessus). (Mentionnons que cette conclusion semble valable non seulement pour le glycérol mais dans tous les cas où la croissance a lieu uniquement aux dépens d'un substrat non fermentescible : acétate ou lactate de sodium par exemple.) Tout se passe comme si cette conversion se faisait par étapes. Nous aboutissons ici à la conclusion déjà énoncée plus haut que *la nature même du test employé affecte celle des résultats obtenus lorsque ce test est appliqué à des cellules ayant reçu le FS*.

La même conclusion s'impose si l'on examine la fréquence des colonies contenant des cellules qui par tous les tests se comportent comme des G , comme cela a été fait dans l'expérience décrite dans la figure 12. Les zygotes du croisement $G \times 2/16$ ont été étalés sur milieu DHAc 0,13 et transférés au cours du temps simultanément sur les deux milieux DHG 0,13 et DHG. On peut voir que : (1) Si la croissance s'effectue depuis le temps zéro sur les milieux DHAc 0,13 et DHG 0,13 la fréquence des colonies colorables est de 37 et 20 % respectivement et sur DHG aucun zygote ne forme de colonie visible. (2) Lorsque le transfert est effectué après 20 heures, 37 % des zygotes forment des colonies colorables quel que soit le milieu glucosé dans lequel la croissance se poursuive ensuite et 14 % forment des colonies visibles sur DHG. (3) Lorsque le transfert est effectué après 52 heures, 37 % des zygotes forment des colonies visibles sur DHG.

Encore une fois, on peut conclure que pour un croisement donné, les événements aboutissant ici à la formation de G , sont peut-être les mêmes sur les milieux glucosés que sur le glycérol, mais ils ne se produisent pas de façon simultanée.

L'ensemble de ces résultats met donc clairement en évidence que les cellules étudiées sont d'un type nouveau : elles se trouvent dans un état particulier, différent des deux états G et p tels qu'ils sont habituellement définis, état que nous qualifierons de "prémuationnel". Les conclusions tirées à la fin du paragraphe sur la "Nature des événements qui donnent naissance aux divers types de colonies"

peuvent alors être modifiées de la façon suivante : *la première conséquence de la fusion d'une cellule normale, ayant la capacité de proliférer indéfiniment aux dépens du glycérol, avec une petite suppressive est le passage du zygote et de sa descendance dans un état "prémutationnel"* (probablement identique à "l'état instable" décrit par EPHRUSSI et HOTTINGUER [1951]). Tout changement de cet état, facilement provoqué par des variations des conditions de culture, conduit soit à la mutation, c'est-à-dire à la formation de *p*, soit au contraire, au retour à l'état de *G* tel qu'il est habituellement défini. La probabilité du changement dans l'un ou dans l'autre sens est variable suivant les milieux et peut apparemment se faire par étapes.

Relation entre aspect morphologique des colonies petites abcédées et état "prémutationnel": Les expériences que nous venons de décrire nous montrent bien que l'état "prémutationnel" n'est pas seulement un état passager du zygote. Cet état peut être décelé dans la descendance fort lointaine de celui-ci. En effet, l'on s'attendrait à ce que la plupart des cellules colorables, du haut des colonies petites abcédées appartiennent à la catégorie *G*. Il n'en est rien. Si on prélève, avant coloration, le sommet des petites abcédées (croisement $G \times 20/9$ par exemple) sur l'un ou l'autre des milieux glucosés et si on réétele ces cellules simultanément sur les trois milieux DHG, DHG 0,13 et DHac 0,13, la fréquence des colonies colorables formées est souvent faible et dans quelques cas (tableau 8), le nombre de colonies colorables (ou visibles) n'est pas le même sur les différents milieux.

D'autres expériences réalisées en inoculant les colonies petites abcédées, d'abord dans du milieu liquide au glycérol (où seules les *G* se multiplient) et en étalant après croissance les cellules sur les trois différents milieux, donnent des résultats similaires : fréquences très différentes des colonies colorables suivant le milieu d'étalement. Ces résultats sont caractéristiques des cellules se trouvant dans l'état "prémutationnel". Des cellules séparées par au moins 40 générations cellulaires du zygote peuvent encore présenter toutes les caractéristiques de cet état.

Dans une colonie petite abcédée, issue d'un zygote se trouvant dans l'état "prémutationnel" la plupart des cellules subissent donc, au cours du développement de la colonie, des changements vers un état plus stable soit *p*, soit *G*, mais on

TABLEAU 8

Différences des fréquences des colonies colorables par le TZ formées sur différents milieux lors de l'étalement de suspensions des cellules du sommet de petites abcédées (croisement $G \times 20/9$) (étalement de 0,2 ml par boîte d'une suspension dense de cellules)

Nombre de colonies colorables formées par boîte sur milieu		Nombre de colonies par boîte sur milieu au glycérol (DHG)	Nombre total de colonies par boîte sur milieu glucosé
DHG 0,13	DHac 0,13		
10	176	26	~ 12 000
24	243	10	~ 10 000
16	77	43	~ 7 500
140	1100	136	~ 12 000
15	405	6	~ 6 700

retrouve souvent, une faible proportion de cellules dans l'état "prémutationnel". L'aspect morphologique particulier des colonies petites abcédées serait dû à ce que plusieurs changements d'état différents peuvent intervenir plus ou moins tôt dans une partie seulement de la population des cellules qui les composent.

Notons encore ici que, non seulement des changements de milieu, mais encore des changements de position des cellules d'une colonie peuvent entraîner un changement d'état, en particulier la conversion en p . En effet, si on dissocie les jeunes colonies (âgées de 48 heures) formées sur milieu DHG 0,13 en les découpant avec le bloc d'agar et si on les réétale une à une sur de nouvelles boîtes du même milieu (en prenant soin de ne pas perdre de cellules) 84 % des colonies ainsi dissociées ne donnent naissance qu'à des petites alors que dans le lot témoin (colonies transportées dans une autre boîte mais sans subir de dissociation) 68 % seulement des colonies sont des petites. Les cellules à propriétés particulières étudiées ici sont, sans aucun doute, soumises à l'intérieur de la colonie à l'action d'un microclimat qui peut permettre soit le maintien de l'état "prémutationnel" soit au contraire, l'évolution vers les états plus stables G ou p .

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Le croisement d'une levure normale (G) avec une petite suppressive (p_s) donne naissance à des zygotes dont la probabilité de conversion en "petite" est fonction du degré de suppressivité, ce degré étant mesuré par le % de zygotes formant des colonies "petites". Nous avons analysé le mécanisme responsable de l'apparition de colonies de types différents à partir des zygotes d'un même croisement placés dans les mêmes conditions.—Il a été montré que ce mécanisme ne repose pas sur l'existence de différences stables entre les cellules de l'une des souches parentales, mais à ce que le facteur suppressif (FS), apporté par le parent à déficience respiratoire, ne s'exprime complètement (formation de colonies "petites") que dans une fraction des zygotes. L'examen plus précis des colonies auxquelles donnent naissance ces zygotes révèle effectivement l'action du FS dans de nombreuses colonies qui ne peuvent être classées ni comme "petites", ni comme "grandes".—En prenant la formation de colonies des divers types comme mesure de l'action du FS dans les zygotes ou dans leur descendance végétative, nous avons pu établir que : (a) L'action du FS n'est pas immédiate, et le sort de la plupart des zygotes n'est pas irrémédiablement fixé dès la fusion des cellules parentales. En effet l'évolution des zygotes peut être affectée par les conditions de culture. (b) La conversion des zygotes en "petites" comporte le passage par un état "prémutationnel", différent des états "grande" et "petite", qui peut être transmis à la descendance végétative des zygotes. Les cellules, dans l'état "prémutationnel" peuvent, selon les conditions du milieu, soit continuer l'évolution vers l'état de "petite", soit vers celui de "grande" typique.—La présence du FS dans les zygotes des croisements $G \times p_s$, ne conduit ni à la destruction des enzymes respiratoires, ni à l'arrêt immédiat de leur synthèse. Le FS n'interfère donc pas avec le fonctionnement du facteur génétique normal (FN) requis pour la synthèse des enzymes respiratoires, mais plutôt avec sa multiplication sous sa forme normale.—Les faits décrits suggèrent des relations de répression mutuelle entre FN et FS. Les

détails de cette interprétation seront discutés dans le dernier mémoire de cette série.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The probability of conversion to "petite" of zygotes of a cross of normal yeast (G) with "suppressive petites" (p_s) is a function of the degree of suppressiveness of the p_s parent. This is measured by the proportion of zygotes giving rise to "petite" colonies. The mechanism underlying the different evolution of zygotes of the same cross, under identical conditions, is analyzed.—It is shown that this mechanism is not based on the existence of stable differences between cells of one of the parental strains. It is due to the fact that the suppressive factor (SF) contributed by the petite parent expresses itself completely only in a fraction of the zygotes. Indeed, the colonies formed by the zygotes of such a cross reveal the action of the SF in numerous colonies which can be classified neither as "grandes" nor as "petites".—Taking the formation of colonies of different types as a measure of the action of the SF in the zygotes and in their vegetative progeny, it is shown that : (a) The action of the SF is not immediate. Therefore, the fate of the majority of the zygotes is not irrevocably determined at the moment of their formation, and their evolution can, in fact, be influenced by a number of factors. (b) In the process of conversion to petite, the zygotes go through a "premutational state", different from the states of "petite" and "grande". The premutational state can be transmitted to the vegetative progeny of the zygotes. Cells in the premutational state can, depending on environmental conditions, proceed either to the state of typical "petite" or to that of typical "grande".—The presence of the SF in the zygotes of the crosses under consideration does not result in the destruction of the respiratory enzymes, nor in the immediate cessation of their synthesis. Hence, the SF does not interfere with the functioning of the normal genetic factor (NF) required for the synthesis of respiratory enzymes, but rather with its normal replication.—The described facts suggest interactions between the NF and the SF based on mutual repression. The details of this interpretation will be given in the last paper of this series.

BIBLIOGRAPHIE

- DE FONBRUNE, P., 1949 *Technique de micromanipulation*. Masson, Paris.
- EPHRUSSI, B., et H. HOTTINGUER, 1951 On an unstable cell state in yeast. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **16**: 75-85.
- EPHRUSSI, B., H. MARGERIE-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., H. MARGERIE-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., P. SLONIMSKI, Y. YOTSUYANAGI, et J. TAVLITSKI, 1956 Variations physiologiques et cytologiques de la levure au cours du cycle de la croissance aérobie. Compt. Rend. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol. **26**: 87-102.
- EPHRUSSI, B., et S. GRANDCHAMP, 1965 Etudes sur la suppressivité des mutants à déficience

- respiratoire de la levure. I. Existence au niveau cellulaire de divers "degrés de suppressivité". *Heredity* **20**: 1-7.
- JAKOB, H., 1962 Technique de synchronisation de la formation des zygotes chez la levure *S. cerevisiae*. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **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.
- OGUR, M., R. ST. JOHN, et S. OGUR, 1959 Direct experimental observation of cells in phenomic lag. *Science* **129**: 1612-1613.
- PITTMAN, D., 1959 Ultraviolet induction of respiratory-deficient variants of *Saccharomyces* and their stability during vegetative growth. *Cytologia* **24**: 315-325.
- SHERMAN, F., et B. EPHRUSSI, 1962 The relationship between respiratory deficiency and suppressiveness in yeast as determined with segregational mutants. *Genetics* **47**: 695-700.
- SLONIMSKI, P., 1953. *Formation des enzymes respiratoires chez la levure*. Masson, Paris.