

RESISTANCE A L'ETHIONINE CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

I. ETUDE GENETIQUE¹

HELENE CHEREST ET HUGUETTE DE ROBICHON-SZULMAJSTER

Laboratoire d'Enzymologie du CNRS, Gif-sur-Yvette, Essonne, France

Received April 9, 1966

Il a été montré chez plusieurs microorganismes ainsi que chez les mammifères (voir revue: STEKOL 1963), que l'éthionine, analogue supérieur de la méthionine, est capable de remplacer cette dernière dans toutes les réactions métaboliques où elle intervient, ce qui entraîne généralement une inhibition de la croissance. Ces réactions appartiennent à deux grands groupes: (1) transfert de groupements méthyles; (2) synthèse des protéines. L'intégrité de chacun de ces mécanismes étant indispensable au maintien de l'équilibre cellulaire, il est évident que la sensibilité d'une cellule envers l'éthionine doit avoir au moins deux causes; on doit donc s'attendre à ce qu'une mutation affectant seulement l'une d'entre elles puisse conduire à une résistance incomplète ou nulle envers cet analogue.

Nous allons mettre en évidence au cours de ce travail l'existence de trois gènes impliqués dans la manifestation d'une résistance à l'éthionine chez *Saccharomyces cerevisiae*.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

1. *Souches*: Souche-mère, 4094-B; (collection de F. SHERMAN; haploïde α ; ad_2 ; ur_1). A partir de cette souche nous avons isolé une série de mutants résistants à l'éthionine, par trois transferts successifs en milieu liquide (milieu décrit plus loin) contenant de la DL-éthionine à $2 \cdot 10^{-3}M$, puis isolement monoclonal répété sur milieu minimum solide contenant de la DL-éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$ (4094-B1 à 11). Nous avons vérifié que les souches mutantes ainsi obtenues possèdent le même signe et les mêmes caractères d'auxotrophie que la souche-mère. Le présent travail concerne seulement l'étude du mutant 4094-B₄.

Autres souches utilisées.

264-2 B (collection de M. LUZZATI; haploïde; a).

CH 71-1 D (haploïde; a ; ur_1). Cette souche qui provient d'une spore sensible à l'éthionine, issue du croisement CH71: 4094-B6 (α ; ad_2 ; ur_1) \times 264-2B(a). Elle a été utilisée pour le croisement initial de ce travail, CH82: 4094-B4 (α ; ad_2 ; ur_1) \times CH 71-1D (a ; ur_1).

Toutes les souches dont il sera question sont issues soit directement du croisement CH 82, soit de croisements en retour avec les souches parentales, soit du croisement de ségrégants entre eux.

Nomenclature. Nous désignons les souches diploïdes, qui ont été obtenues au laboratoire, par deux lettres CH ou CC suivies d'un numéro arbitraire. La nomenclature utilisée pour les souches haploïdes, nous permet de remonter à leur origine. Le premier numéro indique la souche diploïde dont elle est issue, le deuxième, la spore. Ce deuxième numéro, suivi d'une des quatre lettres de l'alphabet, indique une spore issue d'une tétrade.

Dans le but de nous conformer aux symboles déjà utilisés dans la nomenclature des gènes

¹ Ce travail a bénéficié de l'aide du Fonds de Développement à la Recherche Scientifique et Technique (Convention 61-FR-063) et du Commissariat à l'Energie Atomique.

de résistance chez les levures, les gènes impliqués dans la résistance à l'éthionine ont été nommés de la manière suivante:

eth_1^r = allèle qui confère une résistance à l'éthionine
 eth_1^s = allèle inactif
 AAP = allèle qui concentre les acides aminés
 aap = allèle inactif
 eth_2^s = allèle qui supprime la résistance à l'éthionine
 eth_2^r = allèle inactif

Lorsque les gènes impliqués dans la résistance d'une souche ne sont pas connus avec sûreté, nous employons les termes "résistante" ou "sensible", lesquels seront remplacés au fur et à mesure par des génotypes exacts.

Les types de tétrades observés ont été désignés, d'une part, par le phénotype des spores (R = résistante; S = sensible) et, d'autre part, par un chiffre romain: I = ditype parental; II = ditype recombiné; III = tétratype.

2. Composition des milieux de culture:

Milieux naturels. YPGA: yeast extract Difco 10g; Bacto-peptone Difco 10g; glucose 20g; adenine 20mg; eau distillée 1000 ml.

Milieux synthétiques liquides.

Milieu minimum GO: sels minéraux, oligo-éléments et vitamines mais pas d'acides aminés (GALZY et SLONIMSKI 1957).

Milieu G 21: milieu GO auquel on ajoute de l'adénine à 20 mg/l, et de l'uracile, également à 20 mg/l.

Milieux utilisés pour la détection des caractères de résistance: G 21 + DL-éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$; G 21 + DL-éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$; G 21 + DL-parafluorophénylalanine $5 \cdot 10^{-3}M$.

Milieux solides. Tous les milieux précédents sont solidifiés par adjonction de 30 g de Bacto-agar Difco par litre.

Milieux de présporulation et de sporulation. Ce sont ceux décrits par McCLARY *et al.* (1959).

3. *Croisements; isolement des ascospores:* Nous avons effectué des croisements en masse en mélangeant en milieu YPGA des volumes égaux de précultures (YPGA) des souches parentales. Tous les zygotes étudiés au cours de ce travail ont été isolés par micromanipulation, puis purifiés par isolement monoclonal après étalement sur milieu G 21. La sporulation étant induite par les procédés de McCLARY *et al.* (1959), l'isolement des ascospores a été effectué par microdissection selon la technique utilisée par MORTIMER ET JOHNSON (1959).

4. *Détermination du phénotype:* Le phénotype est déterminé par réplique sur différents milieux solides, à l'aide d'un répliqueur à tige (LINDEGREN 1962). Les données prises en considération concernent exclusivement les tétrades à 4 spores pour lesquelles une ségrégation 2:2 a été observée pour le signe et pour les caractères d'auxotrophie présents dans le croisement. Toutes les cultures sont effectuées à 28°C et en aérobiose.

5. *Mesure de l'amino-acide perméase:* Ces mesures ont été effectuées dans les conditions standard déjà décrites (SURDIN *et al.* 1964, 1965).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Le point de départ de ce travail a été l'étude d'une souche sélectionnée pour sa résistance à l'éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$: 4094-B₄. Par ailleurs, cette souche s'est révélée être également résistante à la parafluorophénylalanine (PFP) et à la canavanine.

Il a été montré que chez cette souche, le niveau du système d'accumulation des acides aminés est diminué d'environ dix fois par rapport à celui de la souche-mère: 4094-B. Ce système de transport actif (amino-acide perméase = AAP) est capable de concentrer tous les acides aminés et certains de leurs analogues (avec des affinités différentes). Un mutant, tel que 4094-B₄, possédant un niveau d'amino-

TABLEAU 1

Ségrégation des caractères de résistance à l'éthionine et à la parafluorophénylalanine dans le croisement CH 82 (12 tétrades)

Milieux	Types de tétrades		
	1R : 3S	2R : 2S	3R : 1S
G 21 + DL-éthionine $2 \cdot 10^{-3}$ M	0	7	5
G 21 + DL-éthionine $2 \cdot 10^{-2}$ M	4	8	0
G 21 + DL-parafluorophénylalanine $5 \cdot 10^{-3}$ M	0	12	0

acide perméase fortement diminué (aap) présente de ce fait une résistance envers plusieurs analogues d'acides aminés. Au cours de ce travail, afin de différencier rapidement l'allèle *aap* d'un caractère de résistance spécifique pour l'éthionine, nous avons utilisé fréquemment la résistance envers la PFP conférée par ce premier caractère.

Toutefois, nous avons vérifié, chaque fois qu'il était nécessaire, par une mesure directe d'accumulation de L-¹⁴C-méthionine (SURDIN *et al.* 1965) l'identité entre les clones résistants à la PFP et la présence de l'allèle *aap*.

A. *Ségrégation du caractère AAP/aap*: Une étude préliminaire de la ségrégation de la capacité de résistance à l'éthionine, effectuée sur les descendants du croisement CH 82: 4094-B4 (aap) ("résistante à l'éthionine") × CH 71-1D (AAP) ("sensible à l'éthionine") avait montré une ségrégation 2 AAP : 2 aap pour l'ensemble des 12 tétrades analysées, soit par mesure directe, soit par mesure de la résistance à la PFP et à la canavanine (SURDIN *et al.* 1964, 1965).

Toutefois, la ségrégation de la résistance à l'éthionine était apparue comme étant au moins digénique avec un excès de spores résistantes à l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}$ M, comme le montre le tableau 1.

De plus, cette ségrégation présentait d'autres particularités: (a) différence dans le niveau de résistance à l'éthionine. Certains clones étant résistants à la concentration de $2 \cdot 10^{-3}$ M, d'autres à la concentration de $2 \cdot 10^{-2}$ M. (b) deux spores aap étaient sensibles à l'éthionine. (c) absence de tétrades comportant 4R : 0S.

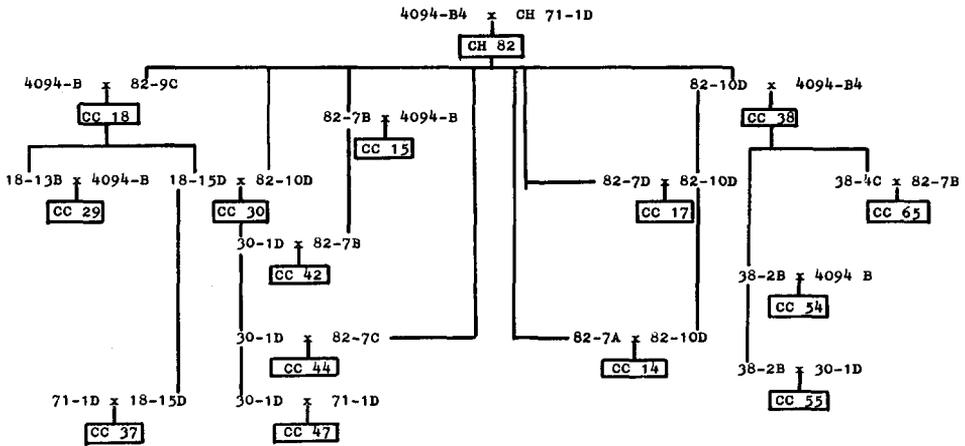
Ces résultats avaient amené à supposer l'existence d'un caractère de résistance à l'éthionine différent du gène *aap* et l'additivité des niveaux de résistance causés par ces deux mutations. Afin d'être en mesure de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé tout d'abord de nous assurer à nouveau de la ségrégation régulière du caractère AAP/aap. Dans ce but, nous avons effectué le croisement CC 15: CH 82-7B (aap) × 4094-B (AAP).

Parmi 18 tétrades ayant ségrégué 2R : 2S, sur milieu G 21 + parafluorophénylalanine, 10 ont été soumises à une mesure directe de l'acide perméase; toutes les valeurs obtenues sont en accord avec la ségrégation observée sur PFP. La valeur moyenne des 20 spores AAP était 89 (valeurs extrêmes: 43-157). La valeur moyenne des 20 spores aap était 5 (valeurs extrêmes: 1-11).

B. *Etude des autres caractères présents dans le croisement CH 82*: Afin de mettre en évidence les caractères présents dans ce croisement, d'étudier leur

TABLEAU 2

A. Tableau récapitulatif des souches haploïdes et diploïdes utilisées



B. Génotypes

- AAP; eth_1^s ; eth_2^s : 4094-B; CH 71-1D
- AAP; eth_1^s ; eth_2^r : CH 82-10D; CC 30-1D
- AAP; eth_1^r ; eth_2^r : CH 82-7D; CH 82-9C; CC 18-15D; CC 18-13B
- aap; eth_1^s ; eth_2^s : CH 82-7B
- aap; eth_1^s ; eth_2^r : CH 82-7C; CC 38-4C; CC 38-2B
- AAP; eth_1^r ; eth_2^s : CH 82-7A
- aap; eth_1^r ; eth_2^r : 4094-B4

ségrégation et leurs inter-relations nous avons été amenées à effectuer une série de croisements.

Les diploïdes et les ségrégants dont il sera question au cours de cet article sont présentés sous forme d'un pédigrée dans le tableau 2. Les génotypes des souches

TABLEAU 3

Mise en évidence de deux gènes intervenant dans la résistance spécifique à l'éthionine

Diploïdes	Souches parentales	Résistance à la DL-éthionine 2.10 ⁻³ M	Types de tétrades* observés sur G 21 + DL-éthionine 2.10 ⁻³ M		
			(I)2R:2S	(II)0R:4S	(III)1R:3S
CC 18	CH 82-9C (AAP) 4094-B (AAP)	+ —	8	10	34
CC 29	CC 18-13B (AAP) 4094-B (AAP)	+ —	1	4	14
CC 30	CC 18-15D (AAP) CH 82-10D (AAP)	+ —	18	0	0
CC 17	CH 82-7D (AAP) CH 82-10D (AAP)	+ —	20	0	0

* (I) ditype parental; (II) ditype recombiné; (III) tétratype.

qui y figurent ont été établis au fur et à mesure de ce travail mais ont été inclus dans ce tableau pour en faciliter la lecture.

a. *Mise en évidence de deux caractères impliqués dans la résistance à l'éthionine.* Afin d'étudier les gènes impliqués dans la résistance à l'éthionine, autres que le gène *AAP/aap*, nous avons utilisé des souches qui portaient toutes l'allèle *AAP*.

Les ségrégations fournies par les croisements dont nous allons faire mention sont résumées dans le tableau 3.

Un premier croisement, CC 18, a été effectué entre une souche résistante à l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$ (CH 82-9C) et la souche-mère 4094-B. Au lieu de la ségrégation 2R : 2S à laquelle on aurait pu s'attendre, nous avons observé une ségrégation digénique, avec excès de spores sensibles, la résistance étant spécifique de l'éthionine.

Deux spores *AAP* et résistantes à l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$, CC 18-13 B et CC 18-15 D, provenant de deux tétrades tétratypiques (1R : 3S) issues du croisements précédent, ont été croisées respectivement avec la souche-mère 4094-B (croisement CC 29) et avec une autre souche sensible: CH 82-10D (croisement CC 30). Le diploïde CC 29 a fourni, comme l'on pouvait s'y attendre, une ségrégation digénique comparable à celle du diploïde CC 18. Par contre, la ségrégation du croisement CC 30 était de type monogénique.

Ces résultats nous ont conduites à supposer l'existence d'une différence génétique entre les deux souches sensibles utilisées dans ces croisements. Comme vérification, nous avons croisé la souche CH 82-10D avec une souche résistante à l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$ et issue directement du croisement CH 82 = CH 82-7D. Le diploïde obtenu, CC 17, nous a fourni, comme dans le cas du croisement CC 30, une ségrégation monogénique.

Il ressort de l'ensemble de ces résultats qu'un gène de résistance spécifique pour l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$ et ségrégeant de façon monogénique était présent dans le croisement CH 82. Ce gène sera appelé désormais *eth₁^r/eth₁^s*; l'allèle *eth₁^r* est l'allèle actif. Par ailleurs, ces résultats ont mis en évidence une différence génétique entre deux souches sensibles 4094-B et CH 82-10D; cette différence peut-être imputable à un caractère présent chez la souche 4094-B, absent chez la souche CH 82-10D et qui modifie l'expression du gène de résistance spécifique à l'éthionine. Ce caractère s'apparente à un supprimeur puisque sa présence rétablit le phénotype sauvage: la sensibilité à l'éthionine. Toutefois, afin de ne pas impliquer un mécanisme précis au mode d'action de ce gène (mode d'action dont l'étude sera rapportée ultérieurement), il sera qualifié, au cours de ce travail, de gène modificateur.

Par définition, les souches résistantes à l'éthionine sont dépourvues de ce caractère. Quant aux souches sensibles, en l'absence de tout caractère de résistance, elles peuvent soit le posséder, ex.: 4094-B, soit en être dépourvues, ex.: CH 82-10D. Comme nous venons de le voir, ces deux types de souches sensibles peuvent être différenciés génétiquement par croisement avec une souche résistante; par ailleurs, une étude physiologique, dont les résultats font l'objet de la publication suivante, a montré que la souche CH 82-10D est capable de résister à une dose très faible d'éthionine (50 $\mu g/ml$), dose à laquelle la souche 4094-B est toutefois

sensible. C'est sur cette base que le gène, supprimant le phénotype de résistance à l'éthionine et dont l'allèle actif est présent chez la souche-mère 4094-B a été nommé eth_2^s (allèle actif)/ eth_2^r (allèle inactif). L'ensemble des ségrégations qui ont été observées au cours de ce travail nous a permis de conclure à l'indépendance des couples d'allèles eth_1^r/eth_1^s , eth_2^s/eth_2^r et AAP/aap .

b. *Recherche du génotype des souches parentales* (croisement CH 82). L'ensemble des résultats que nous venons d'exposer montre que, dans le croisement CH 82, il y avait au moins deux gènes impliqués dans la manifestation de la résistance envers l'éthionine, aap et eth_1^r . Toutefois, la ségrégation du croisement CH 82 présentait des particularités qui ne pouvaient s'expliquer par la seule présence de ces deux gènes. A la lumière des résultats précédents, concernant la présence du gène eth_2^s chez la souche 4094-B et sa capacité de masquer le gène eth_1^r , nous pouvions nous demander si ce gène "modificateur" n'a pas été introduit dans le croisement CH 82 par la souche parentale CH 71-1D. Nous avons donc cherché à déterminer le génotype exact des souches 4094-B4 et CH 71-1D.

1. *Détermination du génotype du parent CH 71-1D*. Afin de détecter la présence éventuelle du gène eth_2^s chez la souche CH 71-1D, il était nécessaire de la croiser avec une souche ségrédant uniquement le gène eth_1^r . La souche choisie a été CC 18-15D dont nous avons montré précédemment qu'elle fournissait une ségrégation monogénique pour la résistance à l'éthionine (ségrégation du diploïde CC 30). Le croisement CC 37 (voir tableau 4) a fourni une ségrégation de type digénique avec excès de spores sensibles, ségrégation désormais caractéristique de la présence de l'allèle eth_2^s . Nous pouvons donc conclure à la présence de cet allèle chez la souche CH 71-1D.

Il restait à déterminer si le gène eth_1^r impliqué dans le croisement CH 82, avait été apporté par la souche CH 71-1D (chez laquelle il pourrait être masqué par le gène eth_2^s). Dans ce but nous avons effectué un croisement entre la souche CH 71-1D et une souche sensible dépourvue du gène eth_2^s . La souche CH 82-10D n'étant pas de signe convenable, nous avons prélevé parmi les ségrédants du

TABLEAU 4

Détermination du génotype des souches 4094-B4 et CH 71-1D

Diploïdes	Souches parentales	Résistance à la DL-éthionine 2·10 ⁻³ M	Types de tétrades observés		
			(I)2R:2S	(II)0R:4S	(III)1R:3S
CC 37	CC 18-15D (AAP ; eth_1^r ; eth_2^r)	+	DL-éthionine 2·10 ⁻³ M		
	CH 71-1D (AAP ; ?)	—	2	3	4
CC 47	CC 30-1D (AAP ; eth_1^s ; eth_2^r)	—	2·10 ⁻³ M (I)0R:4S (II)2R:2S (III)1R:3S		
	CH 71-1D (AAP ; ?)	—	20	0	0
CC 38	CH 82-10D (AAP ; eth_1^s ; eth_2^r)	—	DL-éthionine 2·10 ⁻³ M (I)2R:2S (II)4R:0S (III)3R:1S		
	4094-B4 (aap ; ?)	+	19	53	29
			DL-éthionine 2·10 ⁻³ M DL-parafluorophénylalanine 5·10 ⁻³ M		
			101	0	0

croisement CC 30 (chez lequel l'allèle eth_2^s n'est pas impliqué) une souche sensible et de signe α : CC 30-1D. Aucune spore résistante n'ayant été observée dans la descendance du croisement CC 47 (tableau 4), nous pouvons assigner à la souche CH 71-1D, le génotype $AAP; eth_1^s; eth_2^s$.

2. *Détermination du génotype du parent 4094-B4.* Il résulte de ce qui précède que le gène de résistance eth_1^r devait être présent chez l'autre souche parentale, 4094-B4. Afin de le vérifier, nous avons croisé cette souche avec une souche dépourvue du gène modificateur, CH 82-10D (diploïde CC 38). Dans ce croisement, deux caractères vont ségréger, ils peuvent être testés séparément: AAP/aap , par la résistance à la parafluorophénylalanine; eth_1^r/eth_1^s , par la résistance à l'éthionine.

La ségrégation observée pour chacun de ces caractères est résumée dans le tableau 4. On voit que (1) comme nous l'avons déjà signalé, la ségrégation du caractère AAP/aap (par mesure de la résistance à la PFP) est monogénique. (2) La ségrégation observée sur éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$ est digénique. Contrairement à ce qui avait été observé dans les croisements où le gène eth_2^s était impliqué, nous n'obtenons aucune tétrade 1R : 3S mais nous obtenons, par contre, un certain nombre de tétrades 4R : 0S. Dans ces tétrades, deux spores sont résistantes à la fois à l'éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$ et à la PFP $5 \cdot 10^{-3}M$, et deux spores sont résistantes uniquement à l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$. De plus, les tétrades ditypes parentales (2R : 2S) et ditypes recombinées (4R : 0S) sont en nombre égal. Les deux gènes aap et eth_1^r semblent donc ségréger indépendamment. (3) La ségrégation obtenue sur éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$ est monogénique et correspond exactement à la ségrégation de AAP/aap . Ceci montre, par conséquent, que la résistance à l'éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$ n'est pas due comme nous le pensions au début, à l'additivité de deux caractères de résistance, mais est conférée uniquement par l'allèle aap ; quant au gène eth_1^r il confère seulement une résistance à l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$. (4) On n'observe aucune exception dans la résistance à l'éthionine des spores aap .

Le génotype de la souche 4094-B4 est donc $aap; eth_1^r; eth_2^r$.

La différence observée en ce qui concerne la ségrégation de la résistance à l'éthionine dans les croisements CC 38 et CH 82 tient à la présence dans ce dernier, du gène eth_2^s , présence qui rend compte à la fois de l'absence des tétrades à 4R : 0S et de la présence des tétrades à 1R : 3S.

Deux faits restaient encore à expliquer: l'existence, dans le croisement CH 82, de spores aap , résistantes seulement à l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$, et l'existence de deux spores aap , sensibles à l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$. On pouvait donc se demander si le gène eth_2^s était également susceptible d'avoir une action sur la résistance à l'éthionine conférée par l'allèle aap .

c. *Etude détaillée du gène eth_2^s/eth_2^r .* 1. *Effet de l'allèle eth_2^s sur le phénotype conféré par l'allèle aap .* Dans le dernier croisement, CC 38, ne contenant pas l'allèle eth_2^s , nous avons choisi une spore, provenant d'une tétrade qui montrait une ségrégation 4R : 0S sur éthionine $2 \cdot 10^{-3}M$ (colonne 2, tableau 4) et dont le génotype est: $aap; eth_1^s; eth_2^r$. Cette souche CC 38-2B a été croisée d'une part avec une souche sensible possédant l'allèle eth_2^s (diploïde CC 54), et d'autre part avec une souche sensible dépourvue de cet allèle (diploïde CC 55).

Comme l'on pouvait s'y attendre, le croisement CC 55 a conduit à une ségrégation monogénique 2 *AAP* : 2 *aap*, aussi bien sur les milieux contenant de la PFP que sur les milieux contenant de l'éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$. Au contraire, le croisement CC 54 a fourni une ségrégation digénique avec excès de spores sensibles sur éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$. Cette ségrégation est résumée dans le tableau 5. On voit donc que l'action suppressive de l'allèle *eth*₂^s ne s'adresse qu'à la résistance vis-à-vis de l'éthionine et non à la résistance vis-à-vis de la PFP, toutes deux conférées par l'allèle *aap*. On voit aussi que la présence d'un nombre égal de tétrades ditypes parentales et recombinées indique l'absence de liaison entre les deux couples d'allèles *AAP/aap* et *eth*₂^s/*eth*₂^r. Nous avons également noté une différence entre les ségrégations observées sur éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$ et $2 \cdot 10^{-3}M$. Dans la plupart des cas, la présence simultanée des deux gènes *aap* et *eth*₂^s ramène le niveau de résistance normal de l'allèle *aap* vis-à-vis de l'éthionine de $2 \cdot 10^{-2}M$ à $2 \cdot 10^{-3}M$. Toutefois, chez trois spores de même génotype, le niveau de résistance se trouve même inférieur à $2 \cdot 10^{-3}M$. La raison de ces différences phénotypiques entre des spores de même génotype peut être due à des effets secondaires d'ordre physiologique ou génétique.

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus à la suite des derniers croisements permettent d'expliquer la présence, dans la ségrégation du croisement CH 82, de spores *aap* et cependant sensibles à l'éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$.

2. *Etude directe de la ségrégation du couple d'allèles eth*₂^s/*eth*₂^r. Afin d'étudier cette ségrégation nous avons construit un diploïde homozygote *aap* et hétérozygote pour le gène *eth*₂^s/*eth*₂^r. Tous les ségréants de ce croisement devront être résistants à la PFP. Seuls les ségréants ayant reçu l'allèle *eth*₂^r seront résistants à l'éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$. Le croisement effectué dans ce but (CC 65) a donné les résultats résumés dans le tableau 5. On voit que, le couple d'allèles *eth*₂^s/*eth*₂^r ségrège d'une manière monogénique.

TABLEAU 5

*Action de l'allèle eth*₂^s sur le phénotype conféré par l'allèle *aap*, et ségrégation du gène *eth*₂^s/*eth*₂^r

Diploïde	Souches parentales	Types de tétrades observés		
		(I)2R:2S	(II)0R:4S	(III)1R:3S
CC 54	CC 38-2B (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^r)	DL-éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$		
	4094-B (<i>AAP</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^s)	20	14	42
CC 55	CC 38-2B (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^r)	DL-pF. phénylalanine $5 \cdot 10^{-3}M$		
	CC 30-1D (<i>AAP</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^r)	76	0	0
CC 65	CC 38-2B (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^r)	(I)2R:2S (II)0R:4S (III)1R:3S		
	CC 30-1D (<i>AAP</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^r)	DL-éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$		
CC 65	CC 38-4C (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^r)	DL-pF. phénylalanine $5 \cdot 10^{-3}M$		
	CH 82-7B (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^s)	18	0	0
CC 65	CC 38-4C (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^r)	2R:2S 4R:0S		
	CH 82-7B (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^s)	DL-éthionine $2 \cdot 10^{-2}M$		
CC 65	CC 38-4C (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^r)	DL-pF. phénylalanine $5 \cdot 10^{-3}M$		
	CH 82-7B (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^s)	22	0	
CC 65	CC 38-4C (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^r)	DL-pF. phénylalanine $5 \cdot 10^{-3}M$		
	CH 82-7B (<i>aap</i> ; <i>eth</i> ₁ ^s ; <i>eth</i> ₂ ^s)	0	22	

D'après l'ensemble des résultats obtenus, il paraît certain que trois couples d'allèles étaient en jeu dans le croisement CH 82, les trois couples d'allèles ségrégeant indépendamment. Ce sont AAP/aap ; eth_1^r/eth_1^s ; eth_2^s/eth_2^r .

C. *Détermination du génotype de la tétrade CH 82-7*: Puisque nos méthodes expérimentales nous permettent de connaître les génotypes provenant de l'un ou l'autre des trois gènes mis en évidence au cours de ce travail, ou bien de leurs combinaisons, nous avons cherché à déterminer les génotypes dans le cas d'une tétrade provenant du croisement CH 82. La tétrade choisie, CH 82-7, présente les caractéristiques résumées dans le tableau 6.

Chaque souche de cette tétrade a été croisée avec une souche sensible de signe convenable: CH 82-10 D ou CC 30-1 D et de génotype AAP ; eth_1^s ; eth_2^r .

Les ségrégations observées qui sont consignées dans le tableau 6 nous ont permis d'établir la répartition des trois couples d'allèles à l'intérieur de la tétrade 7. Cette répartition est la suivante:

CH 82-7 A: AAP ; eth_1^r ; eth_2^s
 CH 82-7 B: aap ; eth_1^s ; eth_2^s
 CH 82-7 C: aap ; eth_1^s ; eth_2^r
 CH 82-7 D: AAP ; eth_1^r ; eth_2^r

D. *Dominance/récessivité des caractères étudiés*: Les relations de dominance et de récessivité entre les allèles de deux des trois gènes étudiés (AAP/aap et eth_1^r/eth_1^s) au cours de ce travail ne pouvaient être déterminées de manière certaine que sur des hétérozygotes n'impliquant pas le gène modificateur. Quant à ce dernier, son action ne pouvait être décelée qu'en présence de l'un des caractères qu'il supprime.

Plusieurs diploïdes de chaque type ont été étudiés par étalement sur différents

TABLEAU 6

Etude du génotype de la tétrade CH 82-7

Diploïdes	Souches parentales	Résistance à la DL-éthionine		Types de tétrades observés		
		2·10 ⁻⁸ M	2·10 ⁻⁹ M	(I)0R:4S	(II)2R:2S	(III)1R:3S
CC 14	CH 82-7A ($AAP = 170$, ?)	—	—	DL-éthionine 2·10 ⁻⁸ M		
	CH 82-10D (AAP ; eth_1^s ; eth_2^r)	—	—	4	3	12
CC 42	CH 82-7B ($aap = 9$, ?)	traces	—	(I)2R:2S (II)0R:4S (III)1R:3S DL-éthionine 2·10 ⁻⁸ M		
	CC 30-1D (AAP ; eth_1^s ; eth_2^r)	—	—	6	3	9
CC 44	CH 82-7C ($aap = 3$, ?)	+	+	DL-pF. phénylalanine 5·10 ⁻⁹ M		
	CC 30-1D (AAP ; eth_1^s ; eth_2^r)	—	—	18	0	0
CC 17	CH 82-7D ($AAP = 100$, ?)	+	—	2R:2S DL-éthionine 2·10 ⁻⁸ M		
	CH 82-10D (AAP ; eth_1^s ; eth_2^r)	—	—	18
CC 17	CH 82-7D ($AAP = 100$, ?)	+	—	2R:2S DL-éthionine 2·10 ⁻⁸ M		
	CH 82-10D (AAP ; eth_1^s ; eth_2^r)	—	—	20

milieux; cette étude nous a permis de déterminer que pour chacun des trois gènes étudiés l'allèle dominant est *AAP*, *eth₁^r*, et *eth₂^s*. L'étendue de cette dominance chez les diploïdes de différents génotypes sera précisée dans la publication suivante, par l'étude des taux de croissance en milieux liquides.

Parmi les diploïdes hétérozygotes *AAP/aap*, un certain nombre (de l'ordre de $1 \cdot 10^{-4}$ à $1 \cdot 10^{-2}$) apparaissent résistants à la fois à l'éthionine et à la PFP. Nous avons vérifié, en faisant sporuler l'un d'entre eux, qu'il était devenu homozygote pour l'allèle *aap*.

Parallèlement et avec une fréquence analogue, des diploïdes hétérozygotes *eth₁^r/eth₁^s*; *eth₂^s/eth₂^r* ont donné des clones résistants à l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}$ M. Il pourrait s'agir dans ce cas d'homozygotes *eth₂^r/eth₂^r*. La fréquence d'apparition de ces clones résistants les rend très probablement attribuables à des recombinaisons mitotiques.

RÉSUMÉ

L'ensemble des résultats qui ont été rapportés a permis de mettre en évidence l'existence de trois caractères impliqués dans la manifestation de la résistance à l'éthionine chez *S. cerevisiae*. Ces caractères se définissent de la manière suivante: (1) Un gène responsable de l'activité de l'acide aminé perméase, *AAP/aap*, règle la capacité d'accumulation des acides aminés et également de leurs analogues structuraux. L'allèle *AAP* est celui présent chez le type sauvage: acide aminé perméase = 100. L'allèle muté, *aap*, ramène l'activité de l'acide aminé perméase à environ 10% de celle du type sauvage, et ceci pour l'ensemble des acides aminés et des analogues qui ont été étudiés. La présence de cet allèle n'apporte aucune perturbation apparente au métabolisme des souches qui le possèdent, mais leur confère une résistance spécifique vis-à-vis de différents analogues tels que la DL-éthionine (à la concentration de $2 \cdot 10^{-2}$ M), la DL-parafluorophénylalanine (à la concentration de $5 \cdot 10^{-3}$ M) et la L-canavanine (à la concentration de $1 \cdot 10^{-5}$ M) (SURDIN *et al.* 1964, 1965). (2) Un gène *eth₁^r/eth₁^s* est impliqué dans le mécanisme de résistance spécifique envers l'éthionine. L'allèle muté *eth₁^r* confère aux souches qui le possèdent une résistance vis-à-vis de l'éthionine $2 \cdot 10^{-3}$ M. (3) Un troisième gène *eth₂^r/eth₂^s* intervient dans la manifestation de la résistance à l'éthionine. L'allèle présent chez le type sauvage est l'allèle *eth₂^s* (souche-mère 4094-B). Cet allèle agit comme un supprimeur phénotypique ou comme un gène modificateur en abaissant considérablement le niveau de résistance à l'éthionine qu'il soit conféré par l'un ou l'autre des allèles *eth₁^r* ou *aap*; par contre, il est inactif sur la résistance envers d'autres analogues d'acides aminés conférée par le gène *aap*.—Nous avons montré, d'une part, que la ségrégation de chacun de ces trois caractères est monogénique et, d'autre part, que ces trois caractères ne sont pas liés.—L'étude physiologique mettant en évidence les différents niveaux de résistance obtenus chez les haploïdes et chez les diploïdes contenant un seul ou plusieurs de ces caractères dans différentes combinaisons, fera l'objet du prochain article.—Le mode d'action du gène *AAP* ayant été étudié précédemment, il reste à préciser celui des gènes *eth₁^r* et *eth₂^s*. Les hypothèses concernant les mécanismes

biochimiques de la résistance envers l'éthionine seront discutées à la fin du second article (DE ROBICHON-SZULMAJSTER et CHEREST 1966).

SUMMARY

Three genes are involved in resistance or sensitivity to ethionine in *S. cerevisiae*. (1) *AAP/aap* governs the capacity to accumulate amino acids and their structural analogs. The system responsible for this accumulation effect (the amino acid permease, AAP) has been shown previously to be polyvalent, i.e., able to concentrate all the amino acids (with different affinities for each). The allele *AAP*, present in the wild type, has an activity defined as 100 for each amino acid considered. In the mutant strain (allele *aap*) the activity is reduced by a factor of ten for all the amino acids and analogs studied. As a consequence, strains carrying this allele are resistant to a number of amino acid analogs: DL-ethionine $2 \times 10^{-2}M$, DL-parafluorophenylalanine $5 \times 10^{-3}M$, L-canavanine $1 \times 10^{-5}M$ (SURDIN *et al.* 1964, 1965). (2) *eth₁^r/eth₁^s* governs specific resistance to the analog ethionine. The wild-type allele, *eth₁^s*, is inactive. Mutant allele *eth₁^r* confers resistance to DL-ethionine $2 \times 10^{-3}M$. (3) *eth₂^s/eth₂^r*, is also involved in the manifestation of resistance to ethionine. The wild-type allele *eth₂^s*, acts as a suppressor or modifier gene of ethionine resistance. It suppresses completely the resistance of *eth₁^r*, and decreases the resistance level of *aap* to ethionine at least tenfold; *eth₂^s* has no action on the resistance to other amino acids analogs conferred by *aap*.—Although the mutant allele *eth₂^r* seems to be inactive, its presence is indispensable for development of complete phenotypic expression of the two alleles which confer specific or nonspecific resistance to ethionine (*eth₁^r* and *aap* respectively).—Segregation of each of these three genes is monogenic and they are apparently not linked. *AAP*, *eth₁^r*, and *eth₂^s* appear to be dominant.

BIBLIOGRAPHIE

- GALZY, P., et P. P. SLONIMSKI, 1957 Evolution de la constitution enzymatique de la levure cultivée sur acide lactique ou sur glucose comme seule source de carbone. *Compt. Rend.* **245**: 2556–2558.
- LINDEGREN, C. C., 1962 *Yeast Genetics*. Biol. Res. Lab., Southern Illinois Univ., Carbondale.
- McCLARY, D. O., W. L. NULTY, et G. R. MILLER, 1959 Effect of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* **78**: 362–368.
- MORTIMER, R. K., et J. R. JOHNSON, 1959 Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. *J. Bacteriol.* **78**: 292.
- DE ROBICHON-SZULMAJSTER, H., et H. CHEREST, 1966 Résistance à l'éthionine chez *Saccharomyces cerevisiae*. II. Etude physiologique. *Genetics* **54**: 993–1006.
- STEKOL, J. A., 1963 Biochemical basis for ethionine effects on tissues. *Advances in Enzymol.* **25**: 369–393.
- SURDIN, Y., W. SLY, J. SIRE, A. M. BORDES, et H. DE ROBICHON-SZULMAJSTER, 1964 Système d'accumulation des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*: propriétés et contrôle génétique. *Compt. Rend.* **258**: 5046–5049. — 1965 Système d'accumulation des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*: propriétés et contrôle génétique. *Biochim. Biophys. Acta* **107**: 546–566.