

ETUDE SYSTEMATIQUE DE MUTANTS INHIBES
PAR LEURS PROPRES METABOLITES
CHEZ LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

I. OBTENTION ET CARACTERISATION DES DIFFERENTES
CLASSES DE MUTANTS.¹

PIERRE MEURIS, FRANÇOIS LACROUTE ET PIOTR P. SLONIMSKI

Laboratoire de Génétique Physiologique du C.N.R.S., 91—Gif-sur-Yvette, France

Received December 27, 1966

La recherche de mutants inhibés dans leur croissance par un excès de leurs propres métabolites peut être un moyen favorable pour l'étude des systèmes de régulation ou des interrelations entre chaînes métaboliques.

Des mutants ou des souches, dont la croissance est inhibée par la présence dans le milieu d'un métabolite donné, ont fréquemment été décrits, aussi bien pour les champignons que pour les bactéries. Pour une même espèce, plusieurs mutants inhibés par des métabolites différents ont été décrits. (DOUDNEY et WAGNER 1953; WAGNER et IFLAND 1956; LEAVITT et UMBARGER 1962; KAKAR, ZIMMERMAN et WAGNER 1964; KINDLER et BEN GURION 1965; PATTE et COHEN 1965; ROGERSON et FREUNDLICH 1966; DALAL, GOTS et GOTS 1966).

Le but du présent travail est d'introduire dans le domaine de la génétique biochimique *une méthodologie faisant appel de façon systématique aux mutants "inhibés."* Nous désignerons par ce terme un mutant capable de croître sur le milieu minimal et incapable de se multiplier sur ce même milieu additionné d'une substance faisant partie du métabolisme de la souche sauvage. Cette définition implique que la souche sauvage résiste à la concentration du métabolite qui inhibe la croissance du mutant. On peut espérer que la recherche et l'emploi de tels mutants fourniront des renseignements de nature complémentaire, aussi nombreux que ceux fournis jusqu'à présent par les mutants auxotrophes. (Les résultats préliminaires ont été résumés dans une note [MEURIS 1965].)

Il est clair que les mécanismes biochimiques qui peuvent conduire à des phénotypes "inhibés" sont très nombreux. Mentionnons, a priori, quelques possibilités: augmentation de la sensibilité d'un enzyme au rétrocontrôle, ou d'un système de régulation à la répression, modification de la spécificité du rétrocontrôle ou de la répression, perte d'un enzyme isofonctionnel faisant ressortir le système de régulation de l'enzyme restant, modification de l'intensité ou de la spécificité du système de concentration dans la cellule des métabolites etc. . . . On doit s'attendre, d'une manière générale, à ce que l'étude des mutants inhibés mette en évidence des branchements et des interactions entre chaînes métaboliques. Bien que

¹ Ce travail a bénéficié d'une convention de recherche de la D.G.R.S.T. (Comité de Biologie Moléculaire).

plusieurs auteurs (v.s.) aient décrit et utilisé des mutants "inhibés," une étude *systématique* portant sur la fréquence de leur apparition, leur distribution parmi les différentes classes possibles, accompagnée d'une étude génétique, n'a jamais été effectuée à notre connaissance.

MATERIEL ET METHODES

Souches de référence: La souche de référence haploïde de *Saccharomyces cerevisiae* PM 100, prototrophe, grande, de signe α , est issue d'une spore d'un diploïde, formé par le croisement d'une souche fournie par R. MORTIMER (S. 1786-B) et d'une spore (FL 18-1A) d'un diploïde résultant du croisement de deux souches fournies par F. SHERMAN (D 234-4A et 239-3C). La souche de référence PM 101, prototrophe, grande, de signe α , est issue d'une spore d'un diploïde prototrophe (FL 90), ce diploïde résulte du croisement de la souche FL 18-1A avec la souche PM 100.

Milieux: Milieu complet YPG: yeast extract Difco 10 g, Bactopeptone Difco 10 g, glucose 20 g, eau distillée 1000 ml.

Milieu minimal Go (GALZY et SLONIMSKI 1957): $MgSO_4$ 0,5 g; $(NH_4)_2SO_4$ 2,0 g; KH_2PO_4 1,0 g; $NH_4H_2PO_4$ 6,0 g; NaCl 0,1 g; $CaCl_2$ 0,1 g; pantothénate de Ca 0,002 g; thiamine 0,002 g; inositol 0,002 g; pyridoxine 0,002 g; acide nicotinique 0,0005 g; biotine 0,00002 g; chlorure ferrique 0,002 g; eau distillée 1000 ml.

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

Go 2%: additionné de 2% de glucose.

Go T₁₀ 2%: additionné de 2% de glucose et de 10 ml/l de tampon citrate de potassium 1 M à pH 5,2.

Go T₂₀ 2%: additionné de 2% de glucose et de 20 ml/l de tampon citrate de potassium 1 M à pH 5,2. Ces milieux sont employés soit liquides soit gélifiés à 2%.

Milieu de sporulation SP 1 (MAC CLARY, NULTY, MILLER 1959): Yeast extract Difco 2,5 g; glucose 1 g; acétate de K anhydre 9,8 g; eau distillée 1000 ml; ajusté à pH 6,9 avec de la potasse.

Les dissections d'asques sont effectuées par micromanipulation après attaque enzymatique de la paroi de l'asque par le suc d'*Hélix pomatia*, à 30°C pendant 45 à 90 minutes selon la souche (MORTIMER et JOHNSTON 1959).

Les cultures en milieu liquide sont faites à 25°C et les cultures sur milieu gélifié à 30°C.

Les mesures de croissance en milieu liquide ont été effectuées à l'aide d'un spectro-colorimètre Klett-Summerson équipé du filtre bleu (420 m μ).

Mutagenèse par l'acide nitreux: Les mutants décrits ont tous été obtenus après mutagenèse par l'acide nitreux, selon la technique mise au point au Laboratoire de Génétique Physiologique (LACHOWICZ, LACROUTE et SLONIMSKI, résultats non publiés).

Des cellules de la souche PM 100, cultivées sur le milieu gélifié YPG sont mises à incuber pendant 28 minutes à la température de 37°C dans le milieu suivant: Tampon acétate 0,2 M pH 4 (stérilisé par filtration) 5 ml; $NaNO_2$ 0,2 M (préparé extemporanément) 0,15 ml; H_2O 4,85 ml. La densité de la suspension cellulaire dans ce milieu est de l'ordre de 10^7 cellules par ml.

La mutagenèse est arrêtée par dilution au 1/50 dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,3. La suspension diluée est ensuite étalée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu minimal Go 2%. Le nombre de colonies par boîte est d'environ 300. Le pourcentage de survivants est alors de 1 à 1,5 %. Après cinq jours d'incubation, les colonies sont réensemencées, par la méthode de repliques sur velours sur une deuxième série de boîtes de Pétri contenant le même milieu minimal additionné du métabolite pour lequel on recherche des mutants "inhibés".

Récolte des mutants: Ne sont considérés comme mutants, que les colonies ou secteurs de colonies qui ont été visiblement ensemencés sur la boîte réplique contenant le métabolite inhibiteur, mais qui n'ont pas poussé sur cette boîte. Quelques cellules sont alors prélevées dans ces colonies ou secteurs de colonies à l'aide d'un fil de platine et sont étalées sur milieu gélifié complet YPG. Pour plus de sécurité, ce prélèvement est systématiquement fait, à partir de la colonie ou du secteur de la boîte réplique, et de la colonie ou du secteur correspondant de la boîte matrice. Pour chaque mutant présumé, quatre des clones ainsi obtenus, sont alors étudiés en déposant des gouttes

de la suspension cellulaire de chaque clone, sur des boîtes de Pétri contenant le milieu minimal additionné de quantités croissantes du métabolite inhibiteur. Seuls sont gardés les clones mutants présentant un phénotype d'inhibition net et une bonne croissance sur milieu minimal. Ces mutants sont stables en croissance végétative.

Cette méthode de recherche permet de distinguer deux classes de mutants: (1) Les mutants caractérisés par une colonie entière ne poussant pas sur la boîte réplique: le phénotype de ces mutants est toujours confirmé par les tests ultérieurs. (2) Les mutants caractérisés par un secteur de colonie ne poussant pas sur la boîte réplique: le phénotype de ces mutants n'est confirmé que dans un tiers des cas environ. Au total, sur 44 mutants présumés, 18 furent confirmés par les tests ultérieurs. Il se peut que la proportion de mutants non confirmés par les tests ultérieurs dépende de l'acide-amino pour lequel on recherche des mutants inhibés.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Différents types de mutants inhibés: Des mutants inhibés furent systématiquement recherchés pour les 20 acides aminés des protéines, l'adénine, l'uracile et l'acide α -amino-butérique. Au total, 18 mutants furent récoltés, intéressant 9 acides aminés et un mutant dont la croissance est inhibée par l'uracile (tableau 1). Pour chaque catégorie de mutant, la recherche a été faite sur 5 à 6 000 colonies, obtenues après mutagénèse. On peut donc constater que la fréquence d'apparition des mutants inhibés est du même ordre de grandeur que la fréquence d'apparition des mutants auxotrophes, dans les mêmes conditions de mutagénèse: il a été vérifié que la fréquence d'apparition de mutants ayant le phénotype uracile-exigeant ou arginine-exigeant à partir de la souche prototrophe PM 100 est d'environ 10^{-3} . Notons que le phénotype ur^- peut résulter de mutations en quatre loci génétiquement non liés (cf. LACROUTE 1964; MORTIMER et HAWTHORNE 1966).

Etude génétique préliminaire des mutants inhibés: Les résultats de l'étude de la descendance des croisements de ces mutants, par la souche sauvage, résistante à l'action de tous ces métabolites inhibiteurs (PM 101), sont groupés dans le tableau 2; dans tous les cas, la mutation ségrège de façon monogénique. De plus, les diploïdes hétérozygotes "mutant inhibé \times sauvage" ont tous le phénotype non inhibé, tous ces mutants sont donc récessifs.

TABLEAU 1

Mutants inhibés isolés après mutagénèse à l'acide nitreux

Corps inhibiteur	Nombre de mutants isolés	Symbole adopté
alanine	1	<i>al-i</i>
acide α -amino-butérique	2	<i>α-a-but-i</i>
glycine	2	<i>gly-i</i>
histidine	1	<i>hi-i</i>
homosérine	2	<i>ho-i</i>
isoleucine	5	<i>is-i</i>
méthionine	3	<i>met-i</i>
tyrosine	1	<i>ty-i</i>
valine	1	<i>va-i</i>
uracile	1	<i>ur-i</i>

TABLEAUX 2

Etude des descendance issues des croisements des mutants "inhibés", par la souche sauvage, résistante à tous ces corps inhibiteurs (PM 101)

N° du diploïde	Corps inhibiteur	Nombre de tétrades étudiées	Ségrégation
			Résistants : Inhibés
PM 12	alanine	14	2 : 2
PM 26	acide α -amino-butyrique	10	2 : 2
PM 27	acide α -amino-butyrique	14	2 : 2
PM 23	glycine	6	2 : 2
PM 24	glycine	5	2 : 2
PM 7	histidine	16	2 : 2
PM 21	homosérine	8	2 : 2
PM 22	homosérine	15	2 : 2
PM 14	isoleucine	17	2 : 2
PM 15	isoleucine	8	2 : 2
PM 18	isoleucine	8	2 : 2
PM 19	isoleucine	12	2 : 2
PM 20	isoleucine	12	2 : 2
PM 4	méthionine	15	12 tétrades avec 2 : 2 3 tétrades avec 1 : 3
PM 8	méthionine	16	2 : 2
PM 9	méthionine	17	2 : 2
PM 25	tyrosine	12	2 : 2
PM 114	valine	10	9 tétrades avec 2 : 2 1 tétrades avec 1 : 3
PM 5	uracile	10	2 : 2

Spécificité d'inhibition: Il a été vérifié que seule la forme L est inhibitrice pour l'acide α -amino-butyrique, la méthionine, la tyrosine, l'isoleucine et la valine. La forme D n'a aucun effet sur la croissance, aux concentrations pour lesquelles la forme L est inhibitrice. Pour les autres acides aminés, seul le mélange racémique a été employé.

L'étude du phénomène d'inhibition effectuée en milieu liquide, en suivant la croissance par turbidimétrie, permet de remarquer que, selon le mutant et le métabolite inhibiteur, l'arrêt de croissance est plus ou moins complet (figures 3, 4, 5) et s'établit après un laps de temps plus ou moins long (figures 1, 2, 3).

Il est parfois préférable d'utiliser la souche diploïde α/a homoallélique "mutant inhibé _{$x-1$} \times mutant inhibé _{$x-1$} " pour l'étude physiologique, plutôt que d'utiliser la souche haploïde correspondante. Ceci permet de mettre à l'état hétérozygote la plupart des gènes modificateurs qui sont d'habitude récessifs et qui peuvent perturber le phénotype chez la souche haploïde. De plus, les souches diploïdes forment moins d'agrégats cellulaires que les souches haploïdes : ceci constitue un avantage technique appréciable.

Chaque mutant présente un spectre d'inhibition caractéristique (tableau 3) : les métabolites sur lesquels les mutants ont été décelés, inhibent en général, fortement les mutants correspondants. Cependant, le mutant *hi-i₁* (PM7-1D) pousse normalement en présence de 100 $\mu\text{g/ml}$ d'histidine : sa croissance n'est inhibée que par une quantité supérieure (tableau 4) ; par contre, l'isoleucine ou l'acide

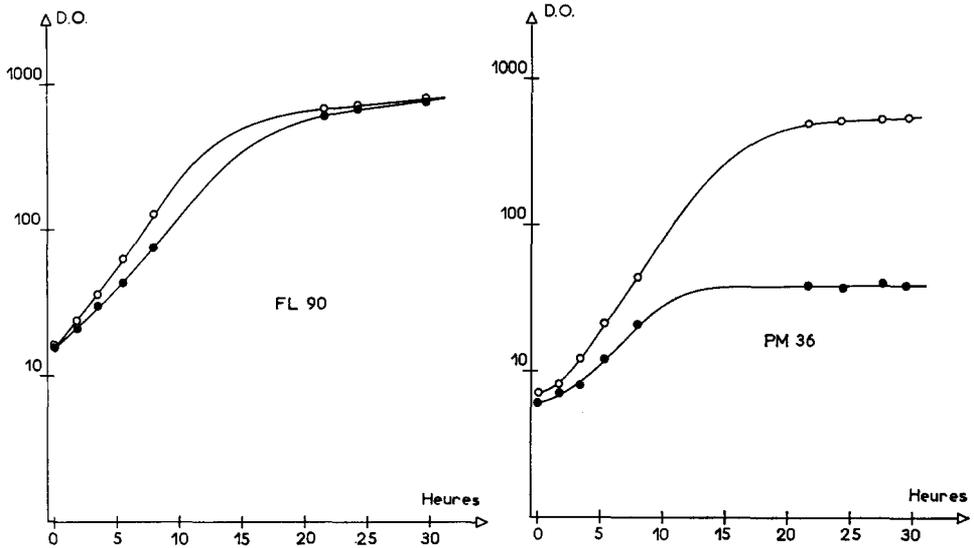


FIGURE 1.—Comparaison de la croissance des souches sauvage et $met-i_{1-1}$. Les souches diploïdes, sauvage: FL 90, et mutante: PM 36 = $a, met-i_{1-1} \times a, met-i_{1-1}$ (PM4-2B \times PM4-2C) ont été étudiées sur le milieu minimal Go 2% (—○—) et sur le même milieu additionné de 100 μ g/ml de DL-méthionine (—●—). Les cultures sont effectuées dans des fioles de 100 ml, contenant 10 ml de milieu minimal Go 2%, auxquels on ajoute 1 ml d'eau contenant le ou les métabolites nécessaires. L'ensemencement est fait avec 1 ml de culture prise en phase exponentielle de croissance, sur le même milieu minimal. Les fioles sont constamment agitées dans une chambre à 25°C.

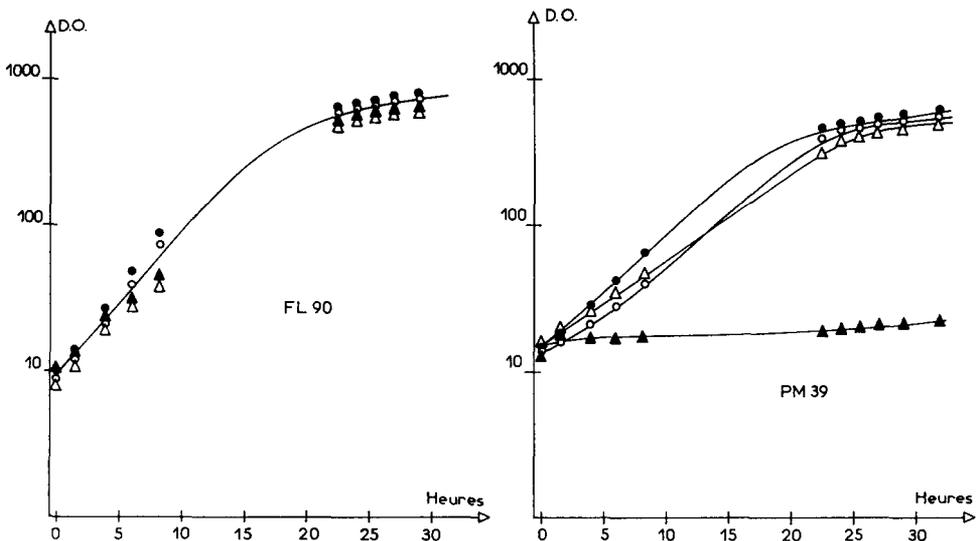


FIGURE 2.—Comparaison de la croissance des souches sauvage et $met-i_3$. Les souches diploïdes, sauvage: FL 90 et mutante: PM 39 = $a, met-i_3 \times a, met-i_3$ (PM9-2B \times PM9-2A) ont été étudiées sur le milieu minimal (—○—), milieu minimal + 100 μ g/ml de DL-méthionine (—▲—), milieu minimal + 100 μ g/ml de DL-méthionine + 10 μ g/ml d'adénine (—△—) milieu minimal + 10 μ g/ml d'adénine (—●—). Les conditions de culture sont celles décrites dans la légende de la figure 1.

TABLEAU 3
Spécificité d'inhibition des différents mutants

Substance	(PM 4-2B)	(PM 5-1C)	(PM 7-1D)	(PM 8-2C)	(PM 9-2B)	(PM 12-2D)	(PM 14-4D)	(PM 15-1B)	(PM 18-1B)	(PM 19-1C)	(PM 20-2B)	(PM 21-2B)	(PM 22-3D)	(PM 23-3A)	(PM 24-1B)	(PM 25-3B)	(PM 26-1D)	(PM 27-2A)	(PM 11-4-1A)	(PM 100)
aucune	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
acide α -amino-butérique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
acide aspartique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
cystéine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
acide glutamique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
glycine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
histidine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
homosérine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
isoleucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
leucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lysine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
méthionine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
phénylalanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sérine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
thréonine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
tryptophane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
valine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hydrolysat de caséine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Des gouttes de la suspension de chaque souche sont déposées sur les différents milieux. La lecture des résultats est faite après 3 jours d'incubation à 30°C. + + correspond à une forte croissance, + à une croissance moyenne, — à une croissance faible ou nulle. Les concentrats mis sont de 100 μ g/ml de L-acide. L. hydrolysat de caséine est à la concentration de 1 mg/ml.

α -amino-butérique se révèlent être inhibiteurs à des concentrations plus faibles. Les mutants *al-i*₁ (PM12-2D), *gly-i*₁ (PM23-3A) et *gly-i*₂ (PM24-1B) se comportent de façon comparable: le métabolite sur lequel ils ont été décelés n'est pas celui qui inhibe le plus fortement leur croissance. Les données du tableau 3 montrent également qu'un même mutant peut être inhibé par plusieurs corps: la souche PM4-2B, décelée sur la méthionine est inhibée par la même concentration d'histidine (tableau 4): pour éviter cette cause d'ambiguïté, un mutant sera désigné par référence au métabolite sur lequel il a été initialement décelé. Le mutant *met-i*₃ (PM9-2B) ne paraît inhibé par aucun acide aminé: sa croissance en milieu liquide, pratiquement nulle en présence de méthionine pendant les 30 premières heures (figure 2) démarre ensuite lentement, ce qui explique les résultats consignés dans le tableau 3, obtenus après 72 heures d'incubation sur milieu solide; on a vérifié que la croissance qui intervient alors, n'est pas due à des réversions, sélectionnées lors de la phase de latence.

Levée d'inhibition: La recherche du ou des métabolites permettant aux mutants d'avoir une croissance normale en présence de l'inhibiteur, a conduit aux résultats suivants: a. Les mutants *is-i*₁ (PM14-4A), *is-i*₂ (PM15-1B), *is-i*₅ (PM18-1B), *is-i*₆ (PM19-1C), *is-i*₇ (PM20-2B), α -*a-but-i*₁ (PM26-1D), α -*a-but-i*₂ (PM27-1A), ont une croissance normale en présence du mélange isoleucine + leucine, ou acide α -amino-butérique + leucine. A l'exception de *is-i*₂, ils sont tous inhibés, quoique à un moindre degré, par la leucine. b. Le mutant *met-i*₃ (PM9-2B) a une croissance normale en présence du mélange méthionine + adénine. L'adénine seule provoque une légère stimulation de la croissance de ce mutant (figure 2). c. Aucun des métabolites étudiés (les 20 acides aminés des protéines, les cinq bases des acides nucléiques, l'acide folique) ne permet la croissance des mutants *met-i*₁₋₁ (PM4-2B) et *met-i*₁₋₂ (PM8-2C), lorsqu'ils sont cultivés en présence de méthionine. L'adénine seule inhibe également la croissance de ces mutants (tableau 4). Le milieu complet YPG permet toutefois, une croissance normale en présence de méthionine. d. L'inhibition par l'histidine, ou par la méthionine, du

TABLEAU 4

Phénotype des mutants inhibés par la méthionine et par l'histidine

	Corps inhibiteurs			
	L-histidine	L-leucine	L-méthionine	adénine
<i>met-i</i> ₁₋₁ (PM4-2B)	3	30	3	3
<i>met-i</i> ₁₋₂ (PM8-2C)	3	30	3	3
<i>met-i</i> ₃ (PM9-2B)	30	>1000	3	>300*
<i>hi-i</i> ₁ (PM7-1D)	300	100	300	>300*
sauvage (PM100)	>300	>1000	>300	>300*

Pour chaque mutant, ainsi que pour la souche sauvage de référence (PM 100), on a donné le seuil d'inhibition (en $\mu\text{g/ml}$). On entend par seuil d'inhibition, la concentration la plus faible ne permettant pas la croissance de la souche considérée.

Les tests ont été faits en déposant des gouttes de suspension cellulaire dans de l'eau distillée, sur le milieu minimal supplémenté par le corps inhibiteur.

La lecture des résultats a été faite après deux jours d'incubation; après un temps plus long, la croissance du mutant *met-i*₃ démarre (voir texte) même si la concentration de métabolite inhibiteur est augmentée, ce qui explique la différence de résultats avec le tableau 3, pour ce mutant.

* L'adénine non seulement n'inhibe pas la croissance, mais elle la stimule légèrement (cf. figure 2).

mutant *hi-i*, (PM7-1D) est levée par la présence d'adénine dans le milieu. e. Le mutant inhibé par la tyrosine n'est inhibé par aucun des autres acides aromatiques. Sa croissance n'est rétablie à un taux normal, en présence de tyrosine, que par l'adjonction simultanée de tryptophane, phénylalanine et acide parahydroxybenzoïque (figure 3). Sur milieu gélosé, ces corps pris séparément ne permettent pas la croissance du mutant lorsqu'il se trouve en présence de tyrosine. f. Le mutant inhibé par la valine est très légèrement inhibé par la leucine. Il ne présente aucune inhibition notable par l'isoleucine. L'inhibition par la valine est levée par la présence d'isoleucine (tableau 5; figure 4).

DISCUSSION

La recherche systématique de mutants inhibés, et l'étude sommaire de quelques uns d'entre eux, permettent de tirer les conclusions suivantes: (1) Ces mutants sont relativement fréquents, leur fréquence étant comparable à celle des mutants auxotrophes. Ils sont stables en multiplication végétative et ségrègent de façon monogénique. (2) Sur 22 substances essayées comme inhibiteurs (20 acides aminés, l'uracile et l'adénine), 17 se sont révélées actives pour des mutants différents (acide α -amino-butérique, alanine, cystéine, acide glutamique, glycine,

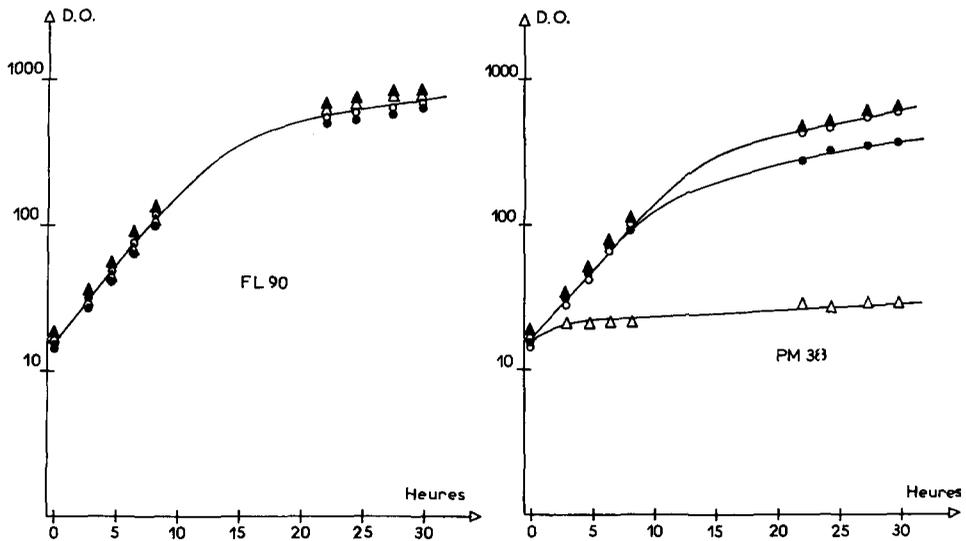


FIGURE 3.—Comparaison de la croissance des souches sauvage et *ty-i*₁. Les souches diploïdes, sauvage: FL 90, et mutante: PM 38 = α , *ty-i*₁ × α , *ty-i*₁ (PM25-5B × PM25-7B) ont été étudiées sur le milieu minimal (—○—), milieu minimal + 100 µg/ml de DL-tyrosine (—△—), milieu minimal + 100 µg/ml de DL-tyrosine + 100 µg/ml de DL-tryptophane + 100 µg/ml de DL-phénylalanine (—●—), milieu minimal + 100 µg/ml de DL-tyrosine + 100 µg/ml de DL-tryptophane + 100 µg/ml de DL-phénylalanine + 100 µg/ml d'acide parahydroxybenzoïque (—▲—). La croissance en milieu minimal supplémenté soit en tryptophane, soit en phénylalanine, soit en acide parahydroxybenzoïque, est analogue à la croissance en milieu minimal seul, tant pour la souche mutante (PM 38) que pour la souche sauvage de référence (FL 90). Les conditions de cultures sont celles décrites dans la légende de la figure 1.

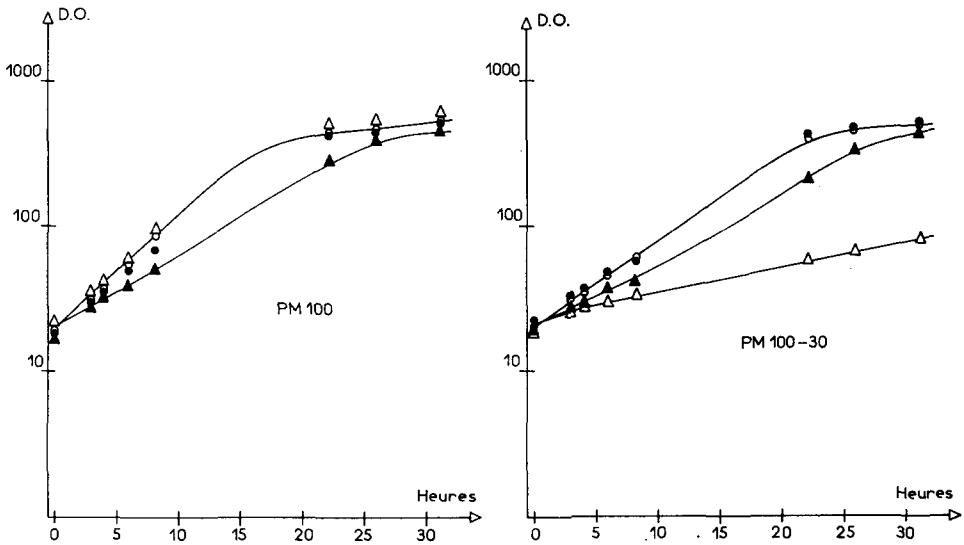


FIGURE 4.—Comparaison de la croissance des souches sauvage et $va-i_1$. Les souches haploïdes, sauvage (PM100) et mutante: $va-i_1$ (PM100-30) ont été étudiées sur le milieu minimal (—○—), milieu minimal + 300 $\mu\text{g/ml}$ de L-valine (—△—), milieu minimal + 300 $\mu\text{g/ml}$ de L-isoleucine (—▲—), milieu minimal + 300 $\mu\text{g/ml}$ de L-valine + 300 $\mu\text{g/ml}$ de L-isoleucine (—●—). Les conditions de culture sont celles décrites dans la légende de la figure 1.

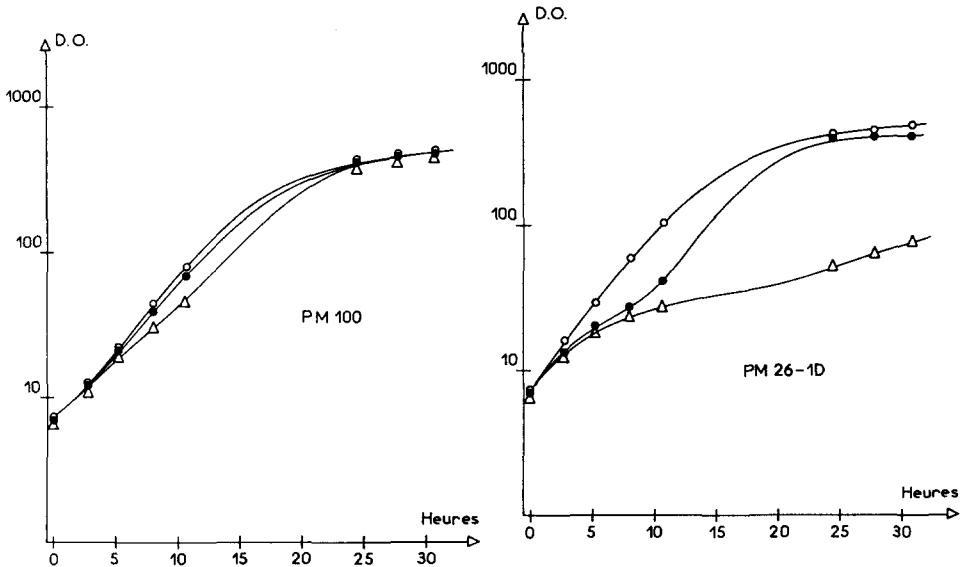


FIGURE 5.—Comparaison de la croissance des souches sauvage et $\alpha-a-but-i_1$. Les souches haploïdes sauvage (PM 100) et mutante: $\alpha-a-but-i_1$ (PM26-1D) ont été étudiées sur le milieu minimal (—○—), milieu minimal, + 30 $\mu\text{g/ml}$ d'acide DL- α -amino-butyrique (—●—), milieu minimal, + 100 $\mu\text{g/ml}$ d'acide DL- α -amino-butyrique (—△—). Les conditions de culture sont celles décrites dans la légende de la figure 1.

TABLEAU 5

Spécificité d'inhibition du mutant $va-i_1$

Milieux	Souches	
	$va-i_1$ (PM 100-30)	sauvage (PM 100)
Milieu Minimal	++	+++
M.M. + L-valine	—	+++
M.M. + L-leucine	+	+++
M.M. + L-isoleucine	++	+++
M.M. + L-valine	—	+++
+ L-leucine		
M.M. + L-valine	+++	+++
+ L-isoleucine		
M.M. + L-leucine	+	+++
+ L-isoleucine		
M.M. + L-valine		
+ L-isoleucine	+++	+++
+ L-leucine		

La souche $va-i_1$ (PM100-30) est directement dérivée de la souche sauvage (PM 100) après mutagenèse et subclonage. Les croissances du mutant et de la souche sauvage sont évaluées sur milieu gélosé, après 4 jours d'incubation. Si la croissance maximale (++++) est évaluée à 100, (++) correspond à une masse de cellules représentant environ 80% de la masse évaluée (+++), (+) correspond à environ 50%, et (—) à <1%. Ces évaluations ayant été étalonnées par remise en suspension de la masse cellulaire dans l'eau distillée, et mesure de la densité optique de la suspension obtenue. Les concentrations en acides aminés sont de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de chaque acide.

histidine, homosérine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, sérine, thréonine, tryptophane, valine (tableau 3), adénine et uracile. (3) Le phénotype même de ces mutants permet de penser que leur étude approfondie permettra la mise en évidence de certaines propriétés de régulation des chaînes métaboliques concernées.

Dans le cas des mutants $met-i_3$ (Figure 2) $ty-i_1$ (Figure 3) $va-i_1$ (Figure 4), l'arrêt de croissance se fait très peu de temps après la mise en présence du corps inhibiteur: un phénomène de répression, nécessitant la dilution de l'enzyme existant, avant de s'exprimer, ne permet pas de rendre compte d'un arrêt de croissance aussi brusque; la rétroinhibition d'un enzyme, au contraire, entraînera une expression beaucoup plus rapide du phénotype et il est raisonnable de penser que c'est le cas pour ces trois mutants. Cet argument prend toute sa valeur lorsqu'on compare la forme des courbes de croissance, en présence de méthionine, des mutants $met-i_{1-1}$ et $met-i_3$ (Figures 1, 2).

L'étude préliminaire du mutant $va-i_1$ montre que la rétroinhibition se ferait sur l'enzyme de condensation, cet enzyme est le premier enzyme commun aux chaînes de synthèse de l'isoleucine et de la valine (cf. KAKAR et WAGNER 1964).

La nature et le phénotype du mutant $ty-i_1$ permettent de faire une hypothèse concernant la chaîne de synthèse des composés aromatiques chez *S. cerevisiae*: SMITH *et al.* (1962) puis BROWN et DOY (1963, 1966), ont montré que la première étape de la synthèse des composés aromatiques chez *E. coli* W dépend de trois 7-phospho-2oxo-3-deoxy-D-arabino-heptonate-D-erythrose-4-phosphate lyases (PODH aldolase), une sensible à la rétroinhibition par la phénylalanine, la

seconde sensible à la rétroinhibition par la tyrosine, la troisième étant répressible par le tryptophane. Si on suppose que l'apparition du phénotype "tyrosine inhibé" est due à la perte d'une PODH aldolase, cela conduit aux déductions suivantes: Puisque la mutation segrége de façon monogénique, une seule activité a été perdue; Puisque l'arrêt de croissance est complet en présence de tyrosine, seule une activité enzymatique sensible à la rétroinhibition par la tyrosine subsiste après la mutation.

Saccharomyces cerevisiae ne posséderait donc que deux PODH aldolases dont l'une serait très sensible à la rétroinhibition par la tyrosine. La vérification de cette hypothèse peut se faire par deux voies différentes: *in vivo*, en recherchant des mutants inhibés par la phénylalanine, qui seraient "symétriques" du mutant *ty-i₁*, *in vitro*, en dosant les activités enzymatiques dans les souches sauvages et inhibées.

Le mutant *met-i₃* est inhibé par la méthionine ou (et) l'histidine, mais cette inhibition est levée par la présence d'adénine. Les colonies de ce mutant présentent par ailleurs, une coloration rose, très légère sur le milieu minimal et accentuée en présence de méthionine ou (et) d'histidine; cette coloration est comparable à celle des mutants *ad₁* (REAUME et TATUM 1949) et *ad₂* (EPHRUSSI, HOTTINGUER et TAVLITZKI 1949).

L'existence du mutant *met-i₁*, inhibé par la méthionine, l'adénine et l'histidine, à des concentrations très faibles (tableau 4) renforce l'idée d'une interaction entre les chaînes de synthèse de la méthionine et de l'adénine-histidine. Le fait que l'arrêt de croissance de ce mutant *met-i₁* n'intervienne que plusieurs heures après la mise en présence de méthionine (Figure 1) incline à penser qu'un phénomène de répression est cette fois responsable de l'arrêt de croissance. LEVINTHAL, FOGEL et HURST (1962) avaient déjà remarqué des interactions entre l'intensité de la coloration rose des souches *ad₁* et *ad₂* et des mutations affectant les voies de synthèse de la méthionine, la thréonine ou l'histidine. DALAL, GOTS et GOTS (1966) ont également étudié un mutant de *Salmonella typhimurium* sensible à l'adénine et dont l'inhibition était relevée par la méthionine.

Une explication satisfaisante de l'intégration des voies de biosynthèse de l'adénine et de l'histidine chez les bactéries, a été proposée par SHEDLOVSKY et MAGASANICK (1962). Chez la levure, certains aspects de cet anabolisme en particulier, l'existence des mutants *ad₃*, posent des problèmes encore non résolus (cf. LUZZATI 1965). Un schéma cohérent devra donc également rendre compte de l'action de la méthionine sur la régulation de la chaîne de synthèse de l'adénine et de l'histidine.

Les inhibitions par l'isoleucine ou l'acide α -amino-butérique semblent peu spécifiques et recouvrent probablement plusieurs mécanismes différents. La souche sauvage elle-même est légèrement inhibée par ces métabolites: pour certains mutants, il y aurait simplement accentuation de cette inhibition.

L'examen de quelques mutants inhibés permet déjà d'affirmer que des processus biochimiques très divers peuvent conduire à de tels phénotypes. L'étude génétique et biochimique, qui est en cours pour quelques uns de ces mutants, permettra de dégager ces mécanismes. On peut cependant affirmer dès maintenant, que la

recherche et l'emploi systématiques des mutants inhibés peuvent être fructueux pour l'étude de la régulation cellulaire. En effet, les mutants obtenus dans ce travail ne représentent sûrement qu'une fraction des mutants qu'il est possible d'obtenir par cette technique: plusieurs classes de mutants ne sont représentées que par un seul exemplaire, et la sélection a été faite avec une seule concentration d'inhibiteur: on peut donc penser que de nombreux autres mutants inhibés restent à mettre en évidence.

RESUME

Pour étudier la régulation du métabolisme cellulaire, on a recherché de façon systématique, des mutants dont la croissance, normale en milieu minimal, est inhibée par la présence dans ce milieu d'un métabolite essentiel de la cellule, ce métabolite n'affectant pas la croissance de la souche sauvage.—Les 20 acides aminés des protéines, l'acide α -amino-butérique, l'adénine et l'uracile ont été essayés comme inhibiteurs. Après mutagenèse à l'acide nitreux, 18 mutants ont été récoltés. Chacun d'eux est inhibé par un ou plusieurs des 17 corps suivants: acide α -amino-butérique, alanine, cystéine, acide glutamique, glycine, histidine, homosérine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, sérine, thréonine, tryptophane, valine, adénine, uracile.—La fréquence d'apparition des mutants inhibés est comparable à la fréquence d'apparition des mutants auxotrophes (de 10^{-3} à 10^{-4}). Les mutations sont toutes récessives et ségrégent de façon monogénique. L'examen du phénotype de certains mutants (métabolites permettant la levée d'inhibition, forme des courbes de croissance en présence de l'inhibiteur), permet dans certains cas de préciser la nature du phénomène responsable de leur inhibition.

SUMMARY

In order to investigate the regulation of cellular metabolism in yeast we have studied in a systematic way mutants that grow normally in minimal medium but are inhibited when certain essential metabolites are added to this medium.—The 20 amino acids of proteins, α -amino-butyric acid, adenine, and uracil have been tested as inhibitors. After mutagenesis by nitrous acid, 18 mutants were found. Each of these is inhibited by one or several of the following: α -amino-butyric acid, alanine, cysteine, glutamic acid, glycine, histidine, homoserine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, serine, threonine, tryptophan, valine, adenine, uracil.—The frequency of appearance of inhibited mutants is comparable to the frequency of appearance of auxotrophic mutants (from 10^{-3} to 10^{-4}). The mutations are all recessive and segregate in a monogenic manner. The physiology of certain mutants have been more extensively examined. The form of the growth curve in the presence and absence of the specific inhibitor and the reversal of inhibition by other metabolites has permitted us to define, in some cases, the probable nature of the inhibition, i.e. repression or feedback inhibition.

BIBLIOGRAPHIE

- BROWN, K. D., and C. H. DOY, 1963 End product regulation of the general aromatic pathway in *Escherichia coli* W. *Biochim. Biophys. Acta* **77**: 170-172. — 1966 Control of three isoenzymic 7-phospho-2-oxo-3 deoxy-D-arabino-heptonate-D-erythrose-4-phosphate lyases of *Escherichia coli* W and derived mutants by repressive and "inductive" effects of the aromatic acids. *Biochim. Biophys. Acta* **118**: 157-172.
- DALAL, F. R., R. E. GOTS, and J. S. GOTS, 1966 Mechanism of adenine inhibition in adenine sensitive mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **91**: 507-513.
- DOUDNEY, C. O., and R. P. WAGNER, 1952 Threonine inhibition in a strain of *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **38**: 196-205.
- EPHRUSSI, B., H. HOTTINGUER, et J. TAVLITZKI, 1949 Action de l'acriflavine sur les levures. II. Etude du mutant "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur* **76**: 419-450.
- GALZY, P., et P. SLONIMSKI, 1957 Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *Compt. Rend.* **245**: 2556-2558.
- KAKAR, S. N., F. ZIMMERMAN, and R. P. WAGNER, 1964 Reversion behaviour of isoleucine valine mutants in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* **1**: 381-386.
- KAKAR, S. N., and R. P. WAGNER, 1964 Genetics and biochemical analysis of isoleucine valine mutants of yeast. *Genetics* **49**: 213-222.
- KINDLER, S. H., and R. BEN GURION, 1965 Lethal effect of L-leucine on *E. coli*, in vivo corroboration of coding ambiguity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**: 337-340.
- LACROUTE, F., 1964 Régulation des enzymes de biosynthèse de l'uracile chez la levure. *Compt. Rend.* **258**: 2884-2886.
- LEAVITT, R. I., and H. E. UMBARGER, 1962 Isoleucine and valine metabolism in *E. coli*. XI. Valine inhibition of the growth of *E. coli* strain K 12. *J. Bacteriol.* **83**: 624-630.
- LEVINTHAL, M., S. FOGEL, and D. D. HURST, 1962 Genetic and biochemical analysis of purine biosynthetic pathway in *Saccharomyces* (Abstr.) *Genetics* **47**: 967.
- LUZZATI, M., 1965 Inhibition spécifique de la recombinaison intragénique. Thèse de Doctorat, Université de Paris.
- MACCLARY, D. O., W. L. NULTY, and G. R. MILLER, 1959 Effect of potassium versus sodium on the sporulation of *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* **78**: 362-368.
- MEURIS, P., 1965 Recherche systématique de mutants inhibés chez la levure *S. cerevisiae* (Résumé.) *Ann. Genet.* **8**: 113.
- MORTIMER, R. K., and D. C. HAWTHORNE, 1966 Genetic mapping in *Saccharomyces*. *Genetics* **53**: 165-173.
- MORTIMER, R. K., and J. R. JOHNSTON, 1959 Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. *J. Bacteriol.* **78**: 292.
- PATTE, J. C., et G. N. COHEN, 1965 Isolement et propriétés d'un mutant d'*Escherichia coli* dépourvu d'aspartokinase sensible à la lysine. *Biochim. Biophys. Acta.* **99**: 561-563.
- REAUME, S. E., and E. L. TATUM, 1949 Spontaneous and nitrogen mustard induced nutritional deficiencies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem.* **22**: 331-338.
- ROGERSON, A. C., and M. FREUNDLICH, 1966 Inhibition of the growth of *Escherichia coli* by leucine. (Abstr.) *Bacteriol. Proc.*, p. 18.
- SHEDLOVSKY, A. E., and B. MAGASANIK, 1962 The enzymatic bases of an adenine-histidine relationship in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **237**: 3731-3736.
- SMITH, L. C., J. M. RAVEL, S. R. LAX, and W. SHIVE, 1962 The control of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid-7-phosphate synthesis by phenylalanine and tyrosine. *J. Biol. Chem.* **237**: 3566-3570.
- WAGNER, R. P., and P. W. IFLAND, 1956 Biochemical and physiological studies on a strain of *Neurospora crassa* inhibited by threonine. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol.* **26**: 381-406.