
Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /
Université libre de Bruxelles Institutional Repository
Thèse de doctorat/ PhD Thesis

Citation APA:

Bechet, J. (1969). *Etude de la régulation de synthèse et d'activité de l'ornithine transcarbamylyase dans Saccharomyces cerevisiae* (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté des sciences, Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/215079/3/9f841b34-2277-497b-8c74-364f3c45dc43.txt>

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- **English Version** -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.

UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES

Faculté des Sciences

Service de Microbiologie

ETUDE DE LA REGULATION DE SYNTHÈSE
ET D'ACTIVITE DE L'ORNITHINE TRANSCARBAMYLASE
DANS SACCHAROMYCES CEREVISIAE

MEMOIRE PRESENTE POUR
L'OBTENTION DU GRADE LEGAL DE
DOCTEUR EN SCIENCES CHIMIQUES

JACQUES BECHET

1969

Ma reconnaissance va tout d'abord à Monsieur le Professeur J.M. Wiame; il m'a initié et a su me donner un intérêt passionné pour la recherche scientifique. Sans son inlassable patience, sans ses conseils et ses encouragements, ce travail n'aurait pu prendre forme. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et le souhait que ce mémoire ne lui fasse pas regretter la confiance dont il m'a honoré.

La collaboration de Madame M. Grenson m'a été précieuse pour les études génétiques et je l'en remercie vivement. Dans ce domaine, l'aide technique de Madame F. Muyldermans a été efficace et appréciée.

La gentillesse rarement démentie du personnel de l'Institut de Recherches du C.E.R.I.A. m'est motif à grande satisfaction; tous ne peuvent être cités, mais je m'en voudrais de ne pas remercier Messieurs R. Lavallé, P. Thuriaux, F. Hilger pour les nombreuses et fructueuses discussions. Mademoiselle M. Demoulin a droit à ma reconnaissance toute particulière pour l'aide qu'elle n'a cessé de m'apporter.

Je tiens à remercier Monsieur G. Chiltz, Directeur Général du C.E.R.I.A. et Monsieur J.M. Piérard, Directeur de l'I.I.F.-I.M.C., qui, toujours, m'ont accordé toutes facilités pour accomplir ce travail.

BUT ET RESUME DU TRAVAIL

Prenant comme hypothèse de travail le modèle proposé par Jacob et Monod pour la régulation de synthèse du système lactose dans *Escherichia coli*, l'objet de ce mémoire est d'étudier dans un eucaryote le mécanisme de contrôle de la synthèse protéique et de vérifier dans quelle mesure les schémas reconnus dans les bactéries peuvent être transposés dans la levure. Cette étude se justifie d'autant plus que, comme nous le verrons, les mutants de régulation sont rares dans ces organismes et qu'un des systèmes étudiés - le catabolisme du galactose - ne répond précisément pas au modèle classique par contrôle négatif.

Le choix d'une levure comme outil de travail résulte du désir d'associer à l'étude d'un eucaryote simple les facilités de manipulation inhérentes à l'emploi d'un organisme unicellulaire.

Saccharomyces cerevisiae réunit de nombreux avantages : organisme unicellulaire, sa croissance peut être suivie par turbidimétrie, hétérotrophe peu exigeant, cette croissance a lieu dans des milieux définis et simples, ce qui permet, éventuellement, l'utilisation d'auxotrophes et un large spectre de conditions de nutrition; l'existence de souches haploïdes et diploïdes stables, la facilité de la conjugaison sexuée et de la ségrégation sont aussi une aide précieuse.

L'ornithine transcarbamylase (OTC) choisie comme objet d'étude est un enzyme appartenant à la séquence biosynthétique de l'arginine; elle montre des variations importantes de vitesse de synthèse en fonction de la concentration de cet acide aminé. Le dosage aisé de cet enzyme est encore facilité par la possibilité de le réaliser dans des cellules entières perméabilisées.

La vérification du mode de contrôle de la synthèse protéique repose essentiellement sur l'isolement et la caractérisation de mutants dans

lesquels ce contrôle est partiellement ou totalement aboli. Pour les séquences anaboliques, la sélection de ces mutants est faite sur la base de la résistance à un analogue de l'acide aminé.

Par cette méthode, 3 types de mutants, phénotypiquement identiques mais génétiquement distincts, ont été isolés dans lesquels la synthèse de l'OTC n'est plus répressible par l'arginine. Dans les 3 cas, l'allèle sauvage argR^+ est dominant sur l'allèle muté argR^- et les gènes R ségrègent indépendamment de tous les gènes de structure des enzymes biosynthétiques de l'arginine; enfin les mutants doubles ou triples sont phénotypiquement identiques aux mutants simples. Il est probable que les 3 mutations affectent la synthèse de sous-unités d'un aporépresseur oligomérique.

Un travail parallèle (M. Minet *et al.*, en préparation) étudie l'effet de ces mutations sur la synthèse des autres enzymes de la chaîne et l'ensemble des résultats montre un mode de régulation complexe.

Au cours de ce travail, nous avons découvert fortuitement l'existence d'un mode de contrôle très particulier de l'activité de l'OTC. La particularité du phénomène réside dans le fait que, lors de l'addition d'arginine au milieu de culture, une protéine est induite qui inhibe l'activité de l'OTC présent. L'induction de cette protéine inhibitrice exige, elle aussi, l'intégrité des gènes R.

L'étude de ce phénomène d'inhibition et la mise en évidence de la nature protéique de l'inhibiteur constituent la seconde partie de ce mémoire. En un travail séparé, ce système de régulation a été étudié au moyen de ses éléments isolés (Messenguy, Béchet, Wiame : 1967; Messenguy, Wiame : 1969).

P R E M I E R E

P A R T I E

.....
.....

WATSON & STRONG

CHAPITRE I

LA REGULATION DE SYNTHÈSE DANS LES BACTERIES

Le phénotype d'un microorganisme est sous la dépendance de 2 espèces de déterminants : le génotype est l'ensemble des potentialités de la cellule et constitue le déterminant primaire, le milieu et les besoins de l'organisme, déterminants secondaires, permettent ou imposent l'expression d'une partie de ce potentiel.

Cette notion simple n'a cependant pas été facilement admise. Les constatations de Dienert au début de ce siècle, étendues plus tard par les études de Karström, montraient l'adaptation, puis l'adaptation enzymatique d'une population de microorganismes aux variations du milieu de culture. Mais le terme adaptation peut être pris dans un sens très large et être défini comme toute variation augmentant les capacités de croissance - ou de résistance - vis-à-vis du milieu. L' "adaptation génétique", variation du génotype de quelques individus avec sélection de mutants, et l'adaptation enzymatique, variation de phénotype de toute la population, n'ont pas toujours été clairement distinguées. Il faudra attendre les tests de fluctuation de Luria et Delbrück et la sélection de mutants sans l'intervention de l'agent de sélection par Lederberg pour prouver que les mutations ne sont pas induites par le milieu de sélection. Enfin, le rôle de l'ADN ayant été reconnu, la relation 1 gène - 1 enzyme étant admise, il apparaît qu'une large part du message héréditaire contenu dans le matériel génétique spécifie la structure primaire des protéines. Il restait à découvrir qu'une autre fraction du matériel génétique détermine la vitesse à laquelle les gènes de structure sont transcrits et contrôle ainsi l'activité cellulaire.

C'est un lieu commun de rappeler que *Pseudomonas* peut utiliser de très nombreux substrats différents et que la cellule contiendrait diffi-

cilement en permanence la totalité des enzymes qu'elle peut synthétiser. Un mécanisme de régulation doit donc exister qui contrôle l'apparition et la disparition des diverses fonctions enzymatiques selon les exigences de la croissance bactérienne. De plus, une croissance harmonieuse - et économique - de la cellule exige une coordination des diverses activités et longtemps on a cru que les propriétés intrinsèques des molécules biologiques y suffisaient. Souvent, le contrôle de la vitesse de synthèse d'enzymes est associé aux variations du milieu extérieur, mais il est aussi essentiel pour la cellule de produire ses éléments constitutifs en quantités relatives adéquates, d'éviter l'emballement ou la sous-production d'une séquence réactionnelle. La régulation des fonctions cellulaires doit donc être permanente.

• •

De nombreux tâtonnements ont précédé la formulation des théories et modèles très généralement admis actuellement : le métabolisme cellulaire est soumis à deux modes de contrôle : contrôle d'activité enzymatique et contrôle de la concentration, de la vitesse de synthèse, des enzymes. C'est essentiellement celui-ci qui nous occupera ici.

Le modèle de régulation de synthèse d'enzymes proposé en 1961 par Jacob et Monod est suffisamment connu pour nous permettre de n'en rappeler que les points importants :

- le flux d'information prend naissance au niveau des gènes de structure et est transmis au cytoplasme par un messenger instable, le mRNA,
- le(s) gène(s) de structure est flanqué d'un opérateur, site dont la libération est nécessaire à la transcription du gène qui lui est contigu,
- un gène régulateur permet la synthèse d'une macromolécule, l'aporépresseur, susceptible de se fixer sur l'opérateur, empêchant ainsi la progression de la RNA polymérase à ce niveau,
- un effecteur, l'inducteur, peut s'associer à l'aporépresseur, diminuant

ainsi l'affinité de celui-ci pour l'opérateur,

- plusieurs gènes de structure - formant un opéron - peuvent être sous le contrôle d'un seul couple opérateur-répresseur; l'ensemble de l'opéron est transcrit en un messager unique, permettant la coordination de la synthèse des enzymes.

La répression de synthèse se fait selon un schéma en tout point comparable sinon que, dans ce cas, l'aporépresseur libre est sans affinité pour l'opérateur, lequel ne peut fixer que l'aporépresseur activé par le corépresseur.

Ce modèle résulte essentiellement de l'étude de l'induction de la β -galactosidase et de la galactoside perméase dans *E. coli* et c'est le comportement de divers mutants, dont le contrôle de la synthèse de ces enzymes est altéré, qui a permis d'élaborer ce schéma. Un certain nombre de points restaient cependant dans l'ombre, telle la nature du répresseur et son mode d'action précis; quelques correctifs ont été proposés ultérieurement quant à la nature exacte des effecteurs et l'on s'est finalement interrogé sur le site d'action du répresseur.

Dans la formulation originale de ce modèle, l'inducteur est supposé être le substrat des enzymes induits, de même que l'on admet que le corépresseur d'une séquence biosynthétique est le produit terminal de cette chaîne. L'aporépresseur doit reconnaître spécifiquement l'effecteur et l'opérateur, il doit donc contenir une certaine quantité d'information et ce rôle ne peut donc être dévolu qu'à une macromolécule, que les premières hypothèses supposaient être un polyribonucléotide, produit direct du gène *i*. Ces deux aspects du modèle, nature de l'aporépresseur et des effecteurs, ont été réétudiés.

Nature de l'aporépresseur

Des arguments, indirects d'abord, directs ensuite, ont été obtenus permettant de croire à la nature protéique du répresseur. Les arguments indirects sont de nature physico-chimique, la thermolabilité du répresseur,

ou génétique, la suppressibilité de certaines mutations i^- . Enfin, plus récemment, 2 répresseurs ont été isolés.

La phosphatase alcaline est un enzyme dont la synthèse, dans *E. coli*, est répressible par le phosphate inorganique; des mutants ont été isolés dans lesquels l'intensité de la répression est fonction de la température de croissance (Gallant, Stapleton : 1963, 1964) et l'étude de ces mutants permet de croire à la nature protéique du répresseur. Le produit du gène i du système lactose a été, lui aussi, étudié à l'aide de mutants de régulation thermosensibles : les uns, i^{TL} , produisent un répresseur thermolabile, dans d'autres, i^{TSS} , c'est la formation du répresseur efficace, par ailleurs normal, qui est thermosensible (Sadler, Novick : 1965). Il ressort de ces expériences que, non seulement l'aporépresseur est une protéine, mais encore que sa structure est susceptible de transition allostérique sous l'effet d'effecteur; cette proposition avait d'ailleurs été émise précédemment (Monod, Changeux, Jacob : 1963).

Un argument de nature génétique, indirect lui aussi, mais certainement plus probant, a été apporté en faveur de la nature protéique du répresseur, par la suppressibilité de certaines mutations R^- affectant la synthèse de la phosphatase alcaline (Garen, Garen : 1963) ou i^- de l'opéron lactose (Bourgeois *et al.* : 1965). En effet, les gènes supprimeurs utilisés ne font sentir leur effet qu'au niveau de la traduction d'un messenger corrigeant les conséquences des mutations "ochre" ou "amber". La suppressibilité de R^- et i^- implique donc que les messagers, copies complémentaires de ces gènes, sont traduits en une protéine. Ceci n'implique cependant pas que le répresseur ne contient que la protéine et Sadler et Novick (1965) voient dans l'association mRNA-protéine une cause possible de l'instabilité du répresseur, proposition reprise par Miller et Sobell (1966); cette hypothèse n'est cependant pas confirmée par les travaux ultérieurs.

Finalement, la confirmation directe de la nature protéique de l'aporépresseur - et corrélativement une démonstration du bien fondé du modèle proposé par Jacob et Monod - a été apportée par la purification de 2

répresseurs : le produit du gène *i* du système lactose (Gilbert, Müller-Hill : 1966, 1967) et le répresseur produit par le gène *C*, du phage tempéré λ (Ptashne : 1967).

La détection et la purification du répresseur *lac* reposent essentiellement sur l'affinité de cette molécule pour l'IPTG (isopropylthiogalactoside), inducteur gratuit de l'opéron lactose, et sont facilitées par l'utilisation d'un mutant dans lequel l'affinité du répresseur pour l'IPTG est accrue de 10 fois. La molécule détectée est une protéine dont le P.M. est de 150.000 à 200.000 et son affinité pour l'IPTG varie selon qu'elle est obtenue à partir de souches d'*E. coli* sauvage ou de mutants superinductibles, de i^- ou i^s . Les premiers résultats concernent la relation entre répresseur et inducteur, les seconds travaux (Gilbert, Müller-Hill : 1967) étudient l'association répresseur-opérateur. Ils montrent que le répresseur *lac* se fixe spécifiquement à la région opérateur de l'ADN, que les mutations o^C réduisent l'affinité de ce site pour le répresseur, et finalement que le répresseur peut être détaché de l'opérateur par l'inducteur. Ces expériences ont été réalisées à l'aide de préparations de répresseur dont la pureté ne dépassait pas 1%.

D'autres techniques étant appliquées, la purification a pu être poussée à plus de 70 % (Riggs, Bourgeois : 1968). Le P.M. de 150.000 a été confirmé pour le répresseur *lac* qui est un oligomère composé de 3 à 4 sous-unités de 40.000 à 50.000 et chacune d'elles peut fixer l'IPTG. Les expériences menées à l'aide de ces préparations très purifiées ont confirmé et étendu les résultats précédents : les inducteurs, par exemple IPTG, décrochent le répresseur de l'ADN alors que les non inducteurs, lactose ou ONPTF (o-nitrophenylthiofuco-side) sont sans action; la très grande affinité du répresseur pour l'opérateur est aussi confirmée, le K_m apparent étant de l'ordre de $2 \text{ à } 4 \times 10^{-10} \text{ M}$, affinité diminuée plus ou moins intensément dans les mutants o^C (Riggs *et al.* : 1968).

Tous ces résultats confirment de façon indiscutable les prédictions du modèle de Jacob et Monod et il reste à montrer que la fixation du répresseur sur l'opérateur empêche effectivement la transcription des gènes

de structure contigus. La purification de l'aporépresseur n'apporte cependant pas d'éclaircissement quant à la nature exacte de l'association de cette molécule avec l'opérateur. Cette association est évidemment spécifique et fait certainement intervenir de nombreux nucléotides de l'opérateur puisque toutes les mutations o^c connues jusqu'à présent dans l'opéron lactose résultent de délétions et non de mutations ponctuelles (Jacob, Ullman, Monod : 1964). D'ailleurs des délétions ne couvrant qu'une partie du site opérateur n'abolissent pas complètement la fonction opérateur, mesurée par sa sensibilité à un répresseur. Gilbert et Möller-Hill (1967) ont montré que la fixation du répresseur se fait sur un ADN à double hélice et non sur l'ADN dénaturé, à simple fibre. La spécificité réside donc probablement dans la séquence des paires de nucléotides de cette région. La purification complète et l'étude de la structure du répresseur permettront peut-être de lever cette incertitude.

Nature de l'effecteur

Un autre problème n'est, lui non plus, pas définitivement résolu : il s'agit de la nature exacte des inducteur et corépresseur, puisqu'il semble que les premières hypothèses doivent, dans certains cas, être revues.

Ainsi, le lactose, substrat naturel de la β -galactosidase est incapable d'induire la synthèse des enzymes de l'opéron "lac" dans une souche d' *E. coli* Z^- . L'action de cet enzyme sur le lactose est donc nécessaire à la formation de l'inducteur vrai et parmi les produits de transgalactosidation on trouve l'allolactose et le galactobiose, tous deux inducteurs du système; il n'est cependant pas prouvé que l'un d'eux soit le vrai inducteur physiologique (Burstein : 1965; Gero, Burstein : 1966).

Parmi les enzymes dont la synthèse est répressible, un problème identique s'est posé quant à la nature du corépresseur efficace et dans ce domaine, le mécanisme de la répression exercée par l'histidine dans *Salmonella typhimurium* a été particulièrement étudié. La biosynthèse de l'histi-

dine dans cet organisme implique 10 enzymes dont les gènes de structure sont rassemblés en un seul opéron; la synthèse de tous ces enzymes est répressible par l'histidine, leur activité spécifique variant de 1, en état de répression, à 25 lorsque la croissance se fait en présence de concentrations limitantes d'histidine. Des mutants, dans lesquels ce mécanisme de contrôle a été altéré, ont été obtenus grâce à leur résistance à la 1,2,4-triazole-3-alanine, analogue de l'histidine. Sur la base d'analyses génétiques, ces mutants se répartissent en 6 classes :

hisS, hisR, hisO, hisT, hisU, hisW (Roth *et al.* : 1966; Anton : 1968; Fink et Roth : 1968).

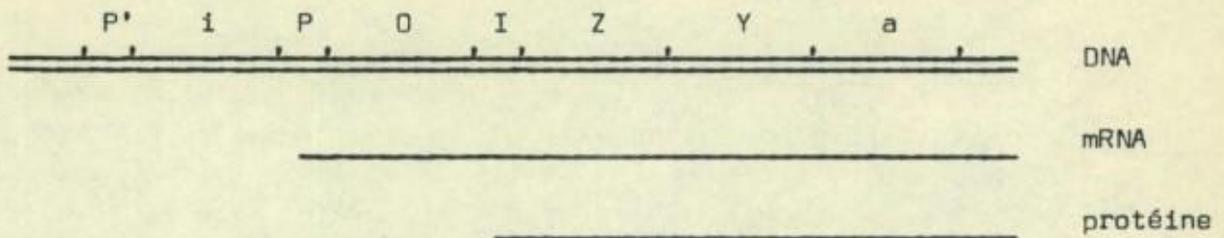
Les mutants des 6 classes, sauf quelques hisS, sont comparables quant au taux de dérégulation de l'opéron en présence de concentrations "normales" d'histidine exogène, mais dans tous les cas, une limitation dans l'apport de cet acide aminé permet d'accroître encore le taux de dérégulation. Les mutants de la classe hisO sont considérés comme étant du type o^C : hisO se situe à l'extrémité de l'opéron, la mutation est dominante et n'affecte que les gènes en position cis par rapport à la mutation. Les mutants de la classe hisS produisent tous une histidyl-tRNA synthétase altérée à des degrés divers; la vitesse de croissance de ces souches en milieu minimum peut être diminuée selon l'importance de l'altération de l'enzyme d'activation et tous restent partiellement ou totalement répressibles par l'histidine exogène. Alors que la dominance ou la récessivité des 5 autres mutations a été déterminée, il n'est fait aucune mention du comportement de la mutation hisS dans un mérodiploïde. Le produit du gène hisR est impliqué, directement ou indirectement dans la formation du tRNA^{hist}, la production de cette molécule étant diminuée dans les mutants de la classe hisR. Les caractéristiques des mutants hisS et hisR suggèrent indubitablement que l'histidyl-tRNA joue un rôle important dans la régulation de l'opéron histidine dans *S. typhimurium*. Les mutations hisT, hisU, hisW sont récessives et, mis à part le haut niveau des enzymes biosynthétiques de l'histidine, ne montrent aucune altération biochimique. La fonction de ces gènes reste donc inconnue pour l'instant et on ne peut décider du rôle de ceux-ci dans le contrôle de l'opéron histidine qui, quoi qu'il en soit, semble assez complexe.

L'intervention de l'acide aminé activé en tant que corépresseur a aussi été suggérée dans la répression de synthèse de la valine, résultats obtenus grâce à l'étude de mutants dans lesquels la valyl-tRNA synthétase est thermosensible (Eidlic, Neidhardt : 1965; Yanif, Gros : 1967). Il ne semble cependant pas que l'on puisse généraliser ces conclusions, bien au contraire. Ainsi, dans le cas des acides aminés cycliques, tyrosine et phénylalanine, l'activation en a.a.-tRNA n'est pas nécessaire à la répression des enzymes de ces séquences biosynthétiques. De même, la répression de 2 enzymes de la biosynthèse de l'arginine dans *E. coli* n'est pas affectée dans des souches produisant une arginyl-tRNA synthétase altérée (Hirshfield *et al.* : 1968).

Site d'action du répresseur

Le modèle de régulation proposé par Jacob et Monod est loin d'être unique et d'autres mécanismes ont été suggérés qui, la plupart, ont un point commun : ils supposent la transcription de l'opérateur et, selon les cas, la traduction, ou non, de cette région proximale du mRNA (Stent : 1964; Brenner, Beckwith : 1965). Jusqu'il y a peu, aucune évidence n'existait en faveur d'une telle transcription. Bien plutôt, le fait que des délétions partielles du site opérateur ne réduisent pas le taux de synthèse des enzymes de l'opéron était - et reste - difficilement conciliable avec de telles hypothèses (Jacob, Ullman, Monod : 1964).

Cependant, une analyse génétique plus fine de cette région du chromosome d'*E. coli* a fait apparaître l'existence de 2 sites, promoteur et initiateur, localisés de part et d'autre de l'opérateur (Jacob *et al.* : 1964; Ippen *et al.* : 1968). Chacun d'eux peut être un site d'initiation : le promoteur situé à gauche de l'opérateur - entre *i* et *O* - détermine le point de départ de la transcription et imposerait à la RNA polymérase le choix de la fibre à transcrire. Le messenger ainsi formé comprend donc la réplique du segment OIZYa. L'initiateur compris entre *O* et *Z* serait le site de fixation des ribosomes et le point de départ de la traduction.



Le répresseur, en se fixant à l'opérateur, empêcherait la progression de la RNA polymérase le long des gènes de structure de l'opéron. Un tel modèle n'exclut pas, bien au contraire, la possibilité que le contrôle de la synthèse des enzymes se fasse à 2 niveaux, bien que la nécessité de cette dualité n'apparaisse pas immédiatement. Les déterminations de mRNA spécifiques, bien que difficilement quantitatives, montrent une corrélation entre le taux d'induction et la quantité de messagers (Attardi *et al.*: 1963; Contesse *et al.*: 1966), mais cet argument n'est cependant pas absolu, le messager non traduit pouvant être particulièrement labile (Brenner, Beckwith : 1965). Cependant l'existence d'une "serial repression" pour les enzymes de l'histidine est en faveur d'un contrôle au niveau de la traduction (Kovack *et al.*: 1969). Les progrès actuels dans la purification de répresseurs permettront sans doute rapidement d'apporter une réponse à certaines de ces questions. Cependant, si le répresseur ne se fixe pas sur une fibre d'ADN, on voit mal comment il se fixerait sur une fibre de mRNA dont la séquence de nucléotides est identique à celle de l'une des fibres d'ADN, sinon à supposer pour cette portion de mRNA une conformation comparable à celle de la double hélice de l'ADN.

Il n'est cependant pas exclu que les 2 modes de contrôle coexistent, l'un au niveau de la transcription, l'autre au niveau de la traduction, chacun de ces modes ayant des sensibilités différentes vis-à-vis de la concentration d'effecteur.

Nous ne citerons que pour mémoire d'autres propositions qui prévoient un contrôle de l'expression de l'opéron au niveau du polysome, la poursuite de la traduction étant déterminée par le changement de conformation du polypeptide naissant (Cline, Bock : 1966).

Difficultés dans la généralisation du modèle

L'opéron lactose est certainement l'un des plus étudiés quant à sa régulation; le modèle qui lui a été proposé par Jacob et Monod s'applique aisément à d'autres systèmes moyennant, éventuellement, quelques correctifs mineurs.

Il est cependant d'autres systèmes où le mécanisme de contrôle semble plus complexe sinon même différent et où une transposition simple du schéma classique rend mal compte des résultats expérimentaux. Parmi ces divergences, les plus connues sont, sans doute, l'induction du catabolisme de l'arabinose et la répression de synthèse de la phosphatase alcaline dans *E. coli*, sans oublier les difficultés qu'a soulevées l'interprétation de la répression catabolique, du système lac entre autres.

Outre une perméase, l'arabinose induit dans *E. coli* l'apparition de 3 enzymes dont les gènes de structure (D, A, B), groupés, forment une unité génétique d'expression coordonnée, le gène E, responsable de la synthèse de la perméase étant distant de ce groupe. L'expression de ces 4 gènes est contrôlée par un 5ème (gène C) adjacent mais fonctionnellement distinct de B. Trois allèles différents ont été mis en évidence pour C : C⁺, qui caractérise le type sauvage et permet l'induction des 4 fonctions; C⁻, qui interdit l'apparition de ces fonctions et C^C qui confère la constitutivité dont le degré varie selon les souches.

Phénotypiquement identiques aux mutations i^S et i⁻ de l'opéron lactose, C⁻ et C^C s'en distinguent cependant par leur comportement dans des diploïdes partiels (Engelsberg *et al.*: 1965; Sheppard et Engelsberg : 1967). C⁺ est dominant sur C^C mais aussi sur C⁻ ce qui empêche d'assimiler C⁻ à i^S et C⁻ est récessif par rapport à C^C. L'action du produit du gène C n'est donc pas comparable à celle du répresseur produit par i. Ce locus C n'est pas non plus un site opérateur, les mutations l'affectant touchent aussi l'expression d'un gène distant (E) et sont efficaces en trans. Les auteurs proposent, pour l'expression des gènes DAB, un modèle à contrôle positif où le produit du gène C (P₁), fixant l'inducteur, devient activateur (P₂) de la transcription

- ou de la traduction - des gènes de structure. Le site d'action, I, de cet activateur, localisé entre B et C, est défini par une mutation, dominante en cis, provoquant un phénotype négatif.

Dans ce modèle, les mutants C^- doivent leur négativité à la non production de P_1 (cette mutation doit donc toujours être récessive) et les souches C^C produisent des protéines (P_x) capables de jouer le rôle d'activateur en l'absence - ou en présence de très faible concentration ? - de l'inducteur. On devrait, dans ces conditions, s'attendre à ce que C^C puisse imposer son phénotype dans le diploïde C^C/C^+ . Pour contourner cette difficulté, les auteurs suggèrent une explication calquée sur celle de Markowitz et Rosenbaum (1965) : le répresseur - ici l'activateur - est composé de sous-unités et la présence simultanée dans la cellule de sous-unités altérées et normales peut conduire à la formation de complexes oligomériques efficaces. S'il en est ainsi, les résultats doivent différer selon que la mutation C^C est portée par l'épisome ou le chromosome, ce qui n'apparaît pas dans les résultats expérimentaux (Sheppard et Engelsberg : 1967).

La régulation de synthèse de la phosphatase alcaline dans *E. coli*, répressible par l'orthophosphate, ne se plie pas, elle non plus, au modèle classique; peut-être est-il difficile ici de parler de divergence tant que le rôle des divers composants du système n'est pas connu exactement; mais quelqu'il soit, la complexité du contrôle le distingue de celui de l'opéron lactose. En effet, 3 gènes de régulation, R , R_{2a} , R_{2b} , distincts du gène de structure de l'enzyme, ont été mis en évidence, tous trois semblent diriger la synthèse d'une protéine (Garen et Garen : 1963) et les mutations de chacun de ces gènes sont récessives. L'isolement du produit de R_{2a} a, de plus, fait apparaître un aspect très particulier de ce mécanisme de régulation : cette protéine est produite ou non dans les mêmes conditions, génétiques ou de croissance, qui permettent ou empêchent la synthèse de l'enzyme (Garen et Otsuji : 1964). Si R_{2a} est bien un gène de régulation, ce serait alors le seul cas où la synthèse d'un répresseur peut subir de telles variations. Mais le parallélisme dans l'apparition de l'enzyme et du produit de R_{2a} empêche d'assigner à celui-ci le rôle classique du répresseur et on serait plutôt

tenté de le considérer comme activateur (contrôle positif) dont la synthèse serait régulée par R_1 et/ou R_{2b} . Il est en tout cas difficile pour le moment de concrétiser ces constatations en un modèle de régulation cohérent.

La synthèse induite de nombreux enzymes cataboliques est influencée par la composition du milieu de croissance, la présence de substrats rapidement métabolisables réprime l'induction de ces enzymes malgré la présence d'inducteurs appropriés. L'effet glucose est l'un des aspects de ce phénomène très général nommé répression catabolique par Magasanik (1963).

La synthèse de la β -galactosidase dans *E. coli* est sensible à ce type de répression; les difficultés d'interprétation du mécanisme sont apparues lorsque l'on a montré que dans des mutants i^- et un o^c , le taux de synthèse de l'enzyme reste affecté par la présence de galactose ou de glucose exogène (Magasanik : 1963). Cependant, la répression catabolique semble agir, tout comme l'induction, au niveau de la transcription puisqu'elle réduit la vitesse de synthèse du messager spécifique de l'opéron lactose (Nakata, Magasanik : 1964).

Une solution partielle a, récemment, été apportée à ce problème (Silverstone *et al.* : 1969) grâce à l'étude de souches dans lesquelles les gènes de la région "lac" sont fusionnés à l'opéron "trp", connu comme étant insensible à la répression catabolique. Les résultats de cette étude montrent qu'une délétion partielle de la région du promoteur de l'opéron lac suffit à soustraire celui-ci à la répression catabolique. En conséquence, deux hypothèses sont émises par ces auteurs : ou bien p serait le site d'action d'un répresseur catabolique dont le gène de structure est actuellement inconnu, ou bien, interagissant avec la RNA polymérase, le corépresseur catabolique empêcherait la fixation de cet enzyme sur le promoteur. Il est, pour l'instant, difficile de favoriser l'une ou l'autre de ces hypothèses.

o

o o

CHAPITRE II

REGULATION DE SYNTHESE PROTEIQUE DANS LES EUCARYOTES

Les bactéries sont des organismes plus simples que les levures. Les procaryotes montrent en effet une organisation cytoplasmique quasiment inexistante, comparée à celle des eucaryotes. En ce sens, les champignons - et parmi ceux-ci, les *protoascomycètes* - constituent certainement le chaînon idéal entre ces 2 types d'organismes. Si la notion de "sac à enzymes" semble quelque peu vieillotte, elle n'en demeure pas moins une image proche de la réalité. Le noyau diffus s'est mué en une double fibre d'ADN ayant, probablement, un point d'attache avec la membrane cytoplasmique : le mésosome, auquel est assigné un rôle extrêmement important. Dans les eucaryotes, les fonctions sont spatialement beaucoup mieux définies : les chromosomes sont enfermés dans une membrane nucléaire, l'essentiel du métabolisme énergétique se passe dans les mitochondries et l'éventuelle machinerie photosynthétique est localisée dans les chloroplastes. Si d'un point de vue cyto- logique, le fossé séparant eucaryotes et procaryotes est donc grand, il n'y a, à priori, aucune raison qui empêche d'étendre à ceux-là les circuits de contrôle mis en évidence chez ceux-ci, rien n'existe dans la bactérie que l'on ne puisse aussi trouver dans la levure. On pourrait au contraire s'attendre à une certaine unité dans les mécanismes de contrôle, leur complexité s'accroissant éventuellement avec la complexité cellulaire.

Dans *E. coli*, l'ensemble des déterminants génétiques se situe sur une ligne fermée dont la longueur est de 1200 μ , et le P.M. de cet ADN est estimé à $2,5 \times 10^9 \pm 0,5 \times 10^9$, cet ensemble peut coder la synthèse de 2000 à 3000 protéines différentes d'un P.M. moyen de 50 000. La connaissance du génome de la levure est beaucoup moins précise, la complexité du matériel et des techniques plus laborieuses peuvent rendre compte de ce retard. Dans *S. cerevisiae*, une centaine de mutations sont connues et partiellement ou

totallement localisées. Ces déterminations ont fait apparaître 14 groupes de liaisons, chacun d'eux identifié par un centromère ségrégeant indépendamment, et l'existence d'autres groupes de liaisons linéaires permet d'estimer à 18, le nombre des chromosomes du noyau de cette levure (Mortimer, Hawthorne : 1966). La quantité d'ADN y est estimée à $2,4 \times 10^{-14}$ g par cellule haploïde en phase stationnaire (Ogur *et al.*: 1952). Mais, et c'est là encore une différence essentielle entre pro- et eucaryotes, la totalité de cet acide nucléique n'est pas concentrée dans le noyau. La présence d'ADN extra-nucléaire a été reconnue dans de nombreux organismes, localisée dans des organelles cytoplasmiques et son existence dans les mitochondries semble universelle (Nass *et al.*: 1965). A côté de l'ADN α - nucléaire - existent, dans la levure, deux ADN satellites : l'ADN β dont la présence est parallèle à celle des mitochondries (Tewari *et al.*: 1965) et l'ADN γ dont le rôle et la localisation sont mal précisés, mais que certains auteurs croient pouvoir assimiler au nucléole (Moustacchi, Williamson : 1966). Outre leur localisation, ces ADN se distinguent aussi par leur densité ($1,699 \text{ g/cm}^3$, $1,683 \text{ g/cm}^3$ et $1,706 \text{ g/cm}^3$ respectivement pour les ADN α , β et γ) ce qui les caractérise aisément et montre des compositions globales différentes pour chacun d'eux.

Mais, quelle que soit la répartition de cet acide nucléique, une cellule de *S. cerevisiae* haploïde contient 5 fois plus d'ADN que *E. coli*, c'est-à-dire 5 fois plus d'information. Et cependant, les capacités métaboliques d'une levure ne diffèrent guère de celles d'une bactérie; les séquences anaboliques et cataboliques sont souvent proches sinon identiques et le nombre des réactions exigées est très semblable dans les deux organismes. Les protéines de structure sont plus nombreuses dans un eucaryote que dans un procaryote, cette exigence croissant certainement avec la complexité de l'organisme, mais cependant on voit mal que celles-là nécessitent une telle quantité d'information. La situation est d'ailleurs exactement comparable dans *Neurospora crassa* où, si le nombre de chromosomes est inférieur à celui de *S. cerevisiae* - 7 au lieu de 18 - la quantité d'ADN y est pratiquement double : $4,6 \times 10^{-14}$ g par noyau haploïde (Horowitz, Macleod : 1960). Bien sûr, on peut s'attendre à une différence; *Neurospora* est, en effet, un organisme plus différencié que la levure, avec la formation de macro- et microconidies

et une reproduction sexuée beaucoup plus complexe que celle de *S. cerevisiae*. Mais le surplus d'ADN dans l'*eucascomycète* par rapport au *protoascomycète* est de $2,2 \times 10^{-14}$ g, soit de quoi coder pour près de 10^4 protéines différentes ! C'est là un chiffre auquel on ne s'attendrait pas. Mais la relation qui lie complexité d'organisation, différenciation et quantité d'ADN n'est certainement pas aussi simple ni si étroite; il suffit pour s'en convaincre de voir que deux moisissures appartenant au même genre contiennent des masses d'ADN assez différentes : *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus sojia* respectivement $4,4 \times 10^{-14}$ g et $7,3 \times 10^{-14}$ g par noyau (Heagy, Roper:1952; Ishitani *et al.*:1956). Faut-il croire à une redondance importante ou bien l'excès d'ADN est-il impliqué dans des mécanismes de contrôle qui seraient alors beaucoup plus complexes que ceux de la bactérie ? Dans ces derniers microorganismes l'un des éléments du schéma de régulation proposé par Jacob et Monod est l'existence d'opérons, définis comme un ensemble de gènes de structure adjacents dont l'expression est sous la dépendance d'un locus contigu : l'opérateur. Mais l'existence de ces associations de gènes de structure ne doit pas faire oublier que ce n'est pas là la seule possibilité; l'un des intérêts de l'étude de la régulation de synthèse des enzymes de l'anabolisme de l'arginine dans *E. coli* est précisément la non organisation de l'ensemble des gènes en un seul opéron. On peut estimer que dans *E. coli* près de la moitié des séquences enzymatiques ne correspondent pas à des opérons uniques. Cette dispersion des gènes de structure le long des chromosomes est poussée à l'extrême dans le cas des eucaryotes et plus précisément dans *S. cerevisiae* et *N. crassa*. Dans ces deux ascomycètes il y a une absence quasi totale de liaison entre les gènes impliqués dans une même séquence métabolique. Ici c'est l'existence d'opéron qui forme l'exception. Mais si on admet que l'évolution a fait apparaître des organismes de mieux en mieux adaptés, la comparaison de l'organisation des gènes de structure le long du ou des chromosomes dans les procaryotes ou les eucaryotes tendrait à faire croire que la dispersion des gènes est plus favorable à la cellule que leur association. Une hypothèse a été avancée qui pourrait justifier cet éparpillement à savoir que les opérons seraient des structures instables dans les organismes supérieurs, à cause de la fréquence d'enjambements inégaux (Horowitz : 1965). Dans cette optique,

le groupement des gènes peut être considéré comme plus économique pour la cellule, mais l'existence de plusieurs chromosomes interdit le maintien de telle structure.

Ceci étant, et pour peu que l'on veuille garder comme mécanisme de base le schéma de Jacob et Monod, chacun des gènes de structure devra être flanqué d'un opérateur, ce qui, à vrai dire, n'est qu'un inconvénient mineur. En supposant régulée la transcription de chaque gène et en assignant à l'opérateur une longueur égale à celle du gène contigu - hypothèse qui pêche probablement par excès - ceci double, dans l'eucaryote, la quantité d'ADN nécessaire à l'expression des mêmes potentialités que l'*E. coli*. C'est dire que même dans ce cas, on est loin d'épuiser toute l'information contenue dans l'ADN de la levure.

La question se pose donc de savoir si dans les eucaryotes - et pour ce qui nous occupe, essentiellement dans *S. cerevisiae* - il y a une régulation de synthèse des protéines, quelle en est son intensité et s'il y existe, éventuellement, d'autres mécanismes de contrôle; et dès lors, qu'une régulation de synthèse se manifeste, de vérifier si elle se fait selon un mécanisme identique ou proche du modèle classique. C'est-à-dire que l'on tentera d'obtenir des mutations de régulation comparables à celles connues dans les bactéries. De telles études ont été entreprises tant sur la levure que sur *Neurospora*. Nous en citerons ici quelques exemples et nous verrons que, jusqu'à présent, aucun système aussi simple que ceux du lactose ou de l'histidine chez les bactéries, n'a été montré dans les eucaryotes.

L'induction des chaînes cataboliques

De nombreux systèmes régulés ont été reconnus dans les *Ascomycètes*. Notre propos n'est pas ici d'en dresser une liste exhaustive, d'autant plus que dans bien des cas aucun mutant de régulation n'ayant été mis en évidence, il est hasardeux de pronostiquer la nature intime du mécanisme de contrôle. Nous ne citerons donc ici que quelques exemples représentatifs où

la vitesse de la synthèse d'un ou de plusieurs enzymes a pu être affectée par une mutation.

Parmi les *protoascomycètes*, *S. cerevisiae* peut certainement être considéré comme l'espèce type; elle est l'une des levures les plus étudiées et la plus largement utilisée dans l'industrie humaine. Dans ces conditions, les substrats carbonés et énergétiques sont, selon les cas, le fructose, le saccharose ou le maltose produit par saccharification de l'amidon de céréales. Il n'est donc pas étonnant qu'un certain nombre d'études aient été consacrées au métabolisme de ce dernier disaccharide. L'utilisation du maltose est normalement inductible dans les souches de *S. cerevisiae* et nécessite la présence de deux fonctions enzymatiques : une perméase permettant la pénétration et l'accumulation du sucre, puis une α -glucosidase dont l'action sur le maltose produit deux molécules de glucose. Malgré la simplicité de ce chemin métabolique, au moins 13 gènes ont été reconnus dans diverses espèces de *Saccharomyces* qui contrôlent l'utilisation des α -glucosides (Carbondale Yeast Genetics Conference : 1963; Mortimer, Hawthorne : 1966). Certains des produits de ces gènes peuvent être distingués par leur spécificité ou affinité vis-à-vis de divers α -glucosides, maltose, α -méthylglucoside, isomaltose.

Cependant, l'analyse des enzymes produits par 5 de ces gènes non alléliques dans une souche de *S. cerevisiae* a fait apparaître un fait probablement unique : les gènes M1, M2, M3, M4 et M6 régissent chacun la synthèse d'une α -glucosidase et les enzymes, produits de ces divers gènes de structure, partiellement purifiés, sont indistinguables l'un de l'autre par inactivation thermique, mobilité électrophorétique, chromatographie, neutralisation par antisérum ou spécificité de substrat (Halvorson, Winderman, Gorman : 1963). Si ces 5 enzymes sont induits simultanément, l'activité de chacun des produits de ces gènes diffère cependant et le niveau d' α -glucosidase dans une cellule induite est directement proportionnel à la nature et au nombre des gènes M présents (Rudert, Halvorson : 1963). On peut supposer ces gènes de structure flanqués, chacun, d'un opérateur et la disparité des activités dans la cellule serait alors probablement le reflet d'affinités diverses de chaque opérateur pour l'apoprésseur, ou des promoteurs pour la

polymérase.

Bien que ses substrats naturels soient beaucoup moins fréquents, une autre carbohydrase α , elle aussi, été largement étudiée dans *Saccharomyces* : la β -glucosidase. La synthèse de cet enzyme est inductible dans la plupart des levures et qualifiée de "paraconstitutive" dans d'autres. Ce dernier terme est appliqué à des cellules qui, en absence d'inducteur exogène, produisent un niveau élevé d'enzyme, niveau qui peut encore être accru par l'addition d'inducteur dans le milieu de culture. Dans *Saccharomyces lactis*, la synthèse de cet enzyme est sous la dépendance du locus B pour lequel 3 formes alléliques ont été mises en évidence, désignées B^b , B^m , B^l (Herman, Halvorson : 1963^a) : celles-ci se distinguent par l'activité élevée, moyenne ou faible de l'enzyme produit.

Le β -méthylglucoside peut induire la β -glucosidase, provoquant un accroissement de 5 fois de la vitesse de synthèse de cet enzyme (ceci quelle que soit la nature du locus B). Cependant, toutes les souches ne sont pas inductibles par cette substance. Herman et Halvorson (1963^b) ont montré par croisement et ségrégation que la non-inductibilité est dominante sur l'inductibilité et qu'un seul gène r est impliqué dans ce mécanisme (r^+ = non-inductibilité, r^- = inductible). Comme la plupart des carbohydrases, l'induction de la β -glucosidase est inhibée par la présence de glucose en concentration élevée ($\sim 5 \times 10^{-2}$ M). A faible concentration cependant, le glucose peut induire - ou favoriser l'induction - de ces enzymes. Mais toutes les souches ne répondent pas également à cette induction par le glucose : les unes peuvent être induites par le glucose à une concentration de 10^{-3} M alors que d'autres ne le sont pas dans les mêmes conditions. L'analyse génétique a, ici aussi, montré la dominance de la non-inductibilité, mais il semble cependant que plusieurs gènes r_g existent dans la cellule (Herman, Halvorson : 1963^b; Gorman : 1963; Tingle, Gorman, Herman : 1964). Il faut d'ailleurs remarquer que le glucose est un inducteur beaucoup moins spécifique que le β -méthylglucoside et plusieurs carbohydrases peuvent apparaître en réponse à sa présence. Les gènes r , r_g et B ne sont pas liés.

Herman et Halvorson (1963^b) ont, au vu de l'ensemble de ces résultats, proposé 3 modèles de régulation. L'un d'eux suppose que r et r_g

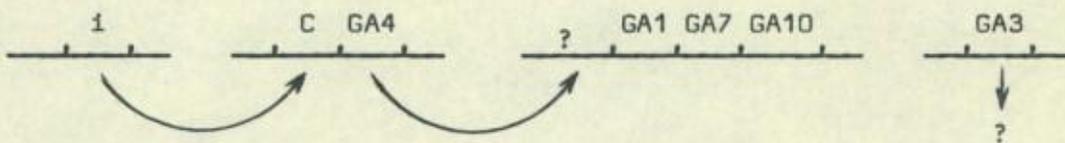
sont des gènes de structure régissant la synthèse d'enzymes détruisant les inducteurs vrais dérivés du β -méthylglucoside et du glucose; la présence de ces enzymes, empêchant l'induction, serait évidemment dominante. Les 2 autres modèles sont plus proches du schéma classique de Jacob et Monod : la non-inductibilité y est considérée comme la conséquence de la présence d'un superrépresseur (type i^S). Si, dans cette optique, l'un des modèles proposés est peu attrayant - le gène de structure flanqué de part et d'autre d'opérateur sensible aux produits de r et r_g et, selon le cas, lu dans un sens ou dans l'autre - l'autre modèle nous semble beaucoup plus plausible. Le répresseur serait un hétéroooligomère dont les protomères seraient produits par r et r_g et, selon la nature de ceux-ci le répresseur serait de l'un des types RR_g , RR_g^S , $R^S R_g$ ou $R^S R_g^S$ permettant l'inductibilité ou non par l'un ou les deux inducteurs. Malheureusement, aucune mutation dans ces gènes r - non plus que dans O - n'a jusqu'à présent été obtenue qui conduise à la synthèse constitutive à haut niveau de la β -glucosidase.

L'utilisation du galactose par *S. cerevisiae* se fait, comme chez *E. coli*, par ce que l'on a appelé le chemin de Leloir.

Les gènes de structure GA1, GA7, GA10 de la galactokinase, de la gal-1-P-uridyltransférase et de l'UDP galactose épimérase forment un groupe de liaison sur le chromosome II. La synthèse de ces enzymes est normalement inductible dans les souches sauvages. La présence de la mutation récessive ga_3 - qualifiée de "long term adaptation" par Winge et Robert (1948) - prolonge fortement la latence d'induction; la fonction exacte du produit cytoplasmique de ce gène n'a jamais été précisée. Des mutations récessives ont été trouvées, qui permettent une synthèse constitutive de ces 3 enzymes, et répondent donc aux caractéristiques de la mutation i^- ; ce gène i n'est pas lié aux gènes de structure GA1, GA7, GA10 qui, étant liés et corégulés, constituent très probablement un opéron (Douglas, Pelroy : 1963). Lors de la recherche de mutants de régulation, une souche est apparue montrant un phénotype comparable à celui des souches O° dans *E. coli*. Dans ce dernier cas, on a pu montrer qu'il s'agit de mutation de polarité, le locus, défini comme étant le promoteur de transcription - actuellement plutôt initiateur de la traduction - se situe à l'extrémité proximale de l'opéron. Par

contre, dans la levure, la mutation - ga_4 - est complémentable et est non liée aux gènes dont elle contrôle l'expression. Le fait que $ga_4 i^-$ et $ga_4 i^+$ aient le même phénotype exclut une mutation au niveau de la pénétration ou d'une transformation de l'inducteur (Douglas, Hawthorne : 1964).

Tirant parti de ce que la présence simultanée des mutations ga_3 et "défiance respiratoire" empêche toute adaptation, Douglas et Hawthorne (1966) ont isolé à partir de diploïdes des souches constitutives pour l'utilisation du galactose. Le locus C où se situe cette mutation est identifié par sa mutation constitutive dominante. Cependant, l'expression de ce phénotype constitutif nécessite la présence de l'allèle + de ga_4 en position cis - ga_4 est lié à C - ce qui fait supposer que la région C n'est pas traduite mais que GA4 l'est (ga_4 est complémentable et susceptible de correction par des supprimeurs). L'ensemble de ces considérations suggère aux auteurs le circuit de régulation suivant : le locus i, identifié par sa mutation récessive i^- qui confère le phénotype constitutif, produit un répresseur dont le site d'action est C, région identifiée par sa mutation constitutive dominante. Le locus C contrôle l'expression d'un gène structurel contigu dans lequel les mutations ga_4 apparaissent et les protéines spécifiées par GA4 exercent un contrôle positif sur l'expression de l'opéron GA1, GA7, GA10.



Le schéma proposé par Douglas et Hawthorne fait donc appel à un contrôle positif. Ce n'est pas la première fois qu'un tel système est évoqué. Il le fut en 1963 par Jacob *et al.* pour expliquer l'initiation du cycle de répliation du chromosome d'*E. coli*. Nous avons cité précédemment les travaux d'Engelsberg (1965) qui, lui aussi, suppose un contrôle positif de l'expression des gènes de structure du système arabinose d'*E. coli*. Dans aucun des cas, un modèle moléculaire n'a été proposé et si l'activation de la DNA polymérase par un initiateur peut se concevoir aisément, il n'en va pas de même pour la RNA polymérase - DNA dépendante. En effet, si la première

est unique dans le *coli* et que, par conséquent, son activation n'a comme conséquence que la réplication du chromosome, la seconde existe certainement en un plus grand nombre d'exemplaires et doit agir simultanément au niveau de nombreux promoteurs d'opérons ou de gènes. Il faudrait donc supposer qu'un contrôle positif reflète l'existence au début de ces opérons, d'un promoteur normalement sans affinité vis-à-vis de la RNA polymérase, et que seule une modification de celle-ci permettrait la fixation et la transcription des gènes; cette modification se ferait sous l'influence du polypeptide produit par GA4 dans le système galactose de la levure ou par C dans le système arabinose de *coli*. Une seconde hypothèse, d'ailleurs aussi difficile à concevoir sur le plan moléculaire, pourrait envisager la fixation de la protéine activatrice sur le promoteur ou l'opérateur permettant la reconnaissance de ce site par la polymérase. Ces deux hypothèses n'envisagent que le cas où la régulation se fait au niveau de la transcription, mais il ne faut pas oublier que certains auteurs ont suggéré la possibilité d'un contrôle au niveau de la traduction du messager. Ici encore, il faudrait que l'exigence du contrôle positif reflète l'existence d'un messager ne permettant pas spontanément sa traduction selon le mécanisme classique. Dans ce cas, ce ne serait pas la synthèse du messager qui serait régulée, mais bien celle de la protéine. La seule façon de vérifier de telles hypothèses est la mesure directe de la quantité de messager dans différentes souches et diverses conditions de croissance. Mais c'est là un travail qui n'est actuellement possible que pour bien peu d'opérons bactériens et pratiquement impossible pour des eucaryotes.

o o

Si cette revue ne se veut certes pas complète, il nous est cependant difficile de passer sous silence l'effet de l' O_2 sur le métabolisme énergétique de la levure. C'est certainement là l'une des variations phénotypiques les plus importantes que l'on puisse rencontrer dans cet organisme, c'est aussi l'un des changements reconnus depuis le plus longtemps. Le terme "effet Pasteur" a, au cours du temps recouvert des concepts divers selon les auteurs.

Dans son sens large, il comprend la totalité des effets que l'aérobiose exerce sur les processus du métabolisme énergétique ou, dans un sens plus restreint, l'inhibition, par l'oxygène libre, des processus fermentaires. On sait actuellement de façon plus précise que l'O₂ peut induire, en absence de multiplication cellulaire, un remaniement profond du contenu enzymatique de la cellule, se traduisant par l'apparition de plusieurs cytochromes et enzymes (Slonimski : 1953). Parmi l'ensemble de ces fonctions induites en aérobiose, une hémoprotéine a été particulièrement étudiée : le cytochrome c, considéré jusqu'il y a peu comme une espèce moléculaire unique dans une cellule donnée. Cette vue a été récemment infirmée : *Saccharomyces cerevisiae* possède en effet 2 isocytochromes c (iso1 et iso2) dont les structures primaires se sont révélées être très proches (Slonimski *et al.* : 1963). Pour expliquer cette redondance, plusieurs hypothèses sont avancées par les auteurs qui en retiennent surtout une dans laquelle l'une des chaînes polypeptidiques (iso2) jouerait le rôle de régulateur de la synthèse de l'autre chaîne (iso1). En absence d'O₂ il y aurait synthèse du polypeptide iso2 mais sans insertion de l'hème et ce polypeptide bloquerait la synthèse de la chaîne polypeptidique iso1. La dérégulation résulterait de l'insertion de l'hème dans la protéine iso2, transformant celle-ci en iso2 cytochrome c, avec diminution corrélative de la concentration du répressur et synthèse de l'iso1 cytochrome c qui est quantitativement et physiologiquement le plus important. L'une des implications de ce modèle a récemment été vérifiée, à savoir que, lors de l'induction par l'O₂, la synthèse des molécules d'iso1 cytochrome c s'effectue de novo à partir des acides aminés libres alors que la synthèse de l'iso2 cytochrome c se fait, en partie, au départ d'un polypeptide préexistant à l'induction (Fukuhara, Sels : 1966; Fukuhara : 1966). Dans ce mécanisme hypothétique de la régulation de la synthèse de cytochrome c dans la levure, les auteurs se gardent cependant de qualifier d'aporéresseur le polypeptide iso2; c'est dire qu'aucun modèle moléculaire n'est avancé pour expliquer le mode de contrôle de cette synthèse.

o

o o

CHAPITRE III

LA REPRESSION DES CHEMINS BIOSYNTHETIQUES

La biosynthèse de la thréonine et de la méthionine se fait, dans la levure, au départ de l'aspartate par une séquence de réactions avec branchement, la bifurcation se faisant au départ de l'homosérine (voir revue par de Robichon : 1967). Si ces réactions sont identiques dans *S. cerevisiae* et *E. coli*, les modes de contrôle semblent différer dans les deux organismes. Parmi les trois enzymes catalysant les trois étapes de la transformation de l'aspartate en homosérine, seul le premier, l'aspartokinase, est fortement répressible (87 %) par la thréonine, les deuxième et troisième ne l'étant que peu (7 %) ou pas; la méthionine déréprime le deuxième (semi-aldéhyde aspartique déshydrogénase), réprime peu le premier (21 %) et moyennement le troisième (52 %). Quant à l'homosérine, son efficacité dans la répression de cette séquence est, elle aussi, diverse (respectivement 55, 14 et 15 %) (de Robichon *et al.*: 1963).

Par sélection en présence d'éthionine, analogue structural de la méthionine, un mutant a été isolé dans lequel la synthèse de l'aspartokinase n'est plus répressible par la thréonine et le caractère récessif de cette mutation conduit les auteurs à supposer que la mutation a touché la synthèse d'un répresseur (de Robichon ^{*et al.*}: 1963). Il faut cependant remarquer que, pour des souches apparemment identiques, l'intensité de la répression de l'aspartokinase par la thréonine (2×10^{-2} M) varie de 84 à 61 et 51 % et que le diploïde sauvage (éthionine sensible) ne montre que 36 % de répression. Aucune explication n'est donnée quant à la cause de ces fluctuations. Par la même méthode de sélection de souches résistantes à l'éthionine, une autre mutation de régulation a été trouvée qui, elle, affecte la répressibilité de la synthèse de l'homosérine transacétylase, premier enzyme, après le branchement, de la séquence menant à la synthèse de la méthionine (Cherest *et al.*: 1967). Cette mutation eth_2^r est récessive et se traduit, probablement, par

la formation d'un aporépresseur inactif. La synthèse de l'homosérine déshydrogénase (catalysant la transformation de la semialdéhyde aspartique en homosérine) est, elle aussi, sensible à une répression par la méthionine (36 %), mais cette intensité reste inchangée dans le mutant eth_2^r . C'est-à-dire que la synthèse de deux enzymes, répressible par la méthionine, ne semble pas répondre au même aporépresseur.

En résumé, dans cette biosynthèse, deux mutations de régulation ont été étudiées, l'une concernant la répressibilité de l'aspartokinase par la thréonine, l'autre affectant la répressibilité par la méthionine, d'un enzyme indépendamment de l'autre.

La régulation de ces séquences semble donc plus anarchique dans la levure que dans le *coli*, où le contrôle paraît beaucoup plus harmonieux. Un point intéressant est peut-être à remarquer ici : dans *E. coli*, 3 aspartokinases ont été mises en évidence, répressibles respectivement par thréonine + isoleucine, méthionine ou lysine (Patte *et al.* : 1967; Cohen, Patte : 1963). Dans la levure, si l'unicité de cet enzyme n'est pas certaine, aucune évidence ne prouve de façon irréfutable sa multiplicité. D'ailleurs, si multiplicité il y a, on ne devrait pas s'attendre à 3 mais bien à 2 aspartokinases puisque dans la levure - et les moisissures - la synthèse de la lysine emprunte une voie totalement indépendante, avec l' α -aminoacétate comme intermédiaire et non le diamino-pimélate comme c'est le cas dans les bactéries. Un fait assez remarquable a été mis en évidence dans *E. coli* concernant cette séquence, à savoir qu'une mutation unique peut affecter simultanément l'inhibition allostérique par la thréonine de l'aspartokinase et de l'homosérine déshydrogénase (Cohen *et al.* : 1965); par réversion, les deux activités sont simultanément recouvrées, ce qui conduit nécessairement à la conclusion qu'au moins un polypeptide est commun à ces enzymes et impliqué dans l'inhibition allostérique par la thréonine.

Ceci n'est cependant pas un exemple unique et une situation semblable se retrouve tant dans *S. cerevisiae* que dans *N. crassa* pour les deux premiers enzymes de la chaîne de biosynthèse des pyrimidines : la carbamoylphosphate synthétase (CPase) et l'ATCase (Lacroute *et al.* : 1965; Davis : 1967). Dans les deux cas, ces deux enzymes sont codés par le même locus, mais il est difficile pour l'instant de préciser s'il s'agit de 3, 2 ou un seul polypeptide(s) asso-

çant, en un complexe, les activités enzymatiques et le site allostérique.

La synthèse des pyrimidines présente, pour nous, un autre point d'intérêt; l'étude de la régulation de synthèse des enzymes qui y sont impliqués fait apparaître dans la levure un mécanisme de contrôle complexe et hybride. En effet, si les deux premiers enzymes (CPase et ATCase) sont sensibles à une rétroaction négative de l'UTP et leur synthèse répressible par le même produit, les quatre autres enzymes sont, eux, inductibles par les métabolites intermédiaires de la chaîne (Lacroute : 1968). Ce phénomène d'induction séquentielle que l'on crut un moment assez général a été montré par Stanier (1947) pour le catabolisme de l'acide mandélique par *Pseudomonas*. Mais si ce mode de contrôle peut nous sembler parfaitement adapté à une dégradation, il est moins économiquement évident pour une séquence anabolique. En effet, si la finalité d'une suite de réactions est la synthèse d'un produit, un contrôle harmonieux du flux de ce produit ne devrait être fonction que de la concentration de celui-ci et non des quantités de métabolites intermédiaires. Outre une certaine lenteur de réponse, l'amplitude des oscillations autour de l'état de régime sera d'autant plus importante que le nombre de relais sera grand dans la transmission des ordres. Il n'est donc pas surprenant de constater que le flux d'UTP dans *S. cerevisiae* est essentiellement réglé par le rétrocontrôle des premières activités enzymatiques de la séquence. Il suffit pour s'en convaincre de constater que, hormis pour l'ATC, les activités spécifiques des enzymes de cette biosynthèse sont indépendantes de la présence d'uracile exogène (0,200 ou 2,000 µg/ml). Cette constatation pose même la question du sens physiologique de l'existence, dans ces cellules, d'un système de régulation de synthèse pour ces enzymes. Leur induction ne peut être montrée que dans des mutants auxotrophes, après épuisement de l'uracile exogène, condition éminemment peu physiologique. C'est dire que cette induction n'apparaît que dans des circonstances où elle est totalement inutile, les enzymes induits ne pouvant en rien "sauver" la cellule. Et d'ailleurs, le niveau de base de ces enzymes, en absence d'intermédiaire inducteur - dans un auxotrophe ATCase⁻, par exemple - permet parfaitement la croissance puisque les activités enzymatiques sont identiques dans l'auxotrophe et dans une souche sauvage. Même ces activités constituent déjà un excès par rapport

au besoin cellulaire réel. La preuve en est donnée par le dosage de gènes, qui est possible pour les quatre gènes de structure dans les diploïdes. Or, cette relation entre le nombre de gènes de structure et l'activité enzymatique ne peut se vérifier qu'en absence de régulation ou pour des enzymes dont l'activité n'est pas limitante dans la séquence envisagée - ceci pour autant que les vitesses de croissance ne soient pas affectées, ce qui est le cas ici. Tout se passe donc comme si la régulation de synthèse des enzymes de cette séquence ne jouait qu'un rôle mineur, sinon nul, dans le contrôle de la production de pyrimidines, la fonction essentielle étant dévolue à la rétroinhibition de l'activité des premières enzymes. Devant de tels faits, il est difficile d'admettre, avec l'auteur, qu'il s'agit là d'un mécanisme plus adéquat et plus économique que celui rencontré chez les bactéries, ni non plus qu'il soit en relation (de cause à effet ?) avec la dissémination des gènes de structure dans les eucaryotes et le fait qu'un schéma comparable régisse, dans *Neurospora*, la régulation de synthèse de la leucine n'est certainement pas un argument suffisant.

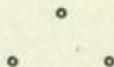
La régulation de synthèse de la leucine a aussi été étudiée dans *S. cerevisiae* (Satyanarayana *et al.* : 1968^{a, b}). Si le chemin de biosynthèse est identique dans cet organisme et dans *Neurospora*, 10 locus ont été reconnus dans celui-là, dont l'intégrité est nécessaire à la production de l'acide aminé. La présence d'un excès de leucine réduit le taux de synthèse des 2ème et 3ème enzymes, mais cette répression est de faible intensité, respectivement de 54 et 36 %. Quant au premier enzyme, sensible à une rétroinhibition par la leucine, sa vitesse de synthèse n'est pas réduite mais bien accrue par la présence de leucine exogène ("induction" de 200 %). Une répression de synthèse de la synthétase ne peut être obtenue que par la présence simultanée dans le milieu de culture de leucine et de thréonine; ces mêmes conditions de croissance répriment aussi plus fortement la synthèse de l'isomérase et de la déshydrogénase.

Ici encore le rôle de la rétroinhibition est évident mais le mécanisme de la répression de synthèse est beaucoup moins clair, d'autant plus qu'aucun mutant n'a été isolé dans lequel cette régulation serait affectée.

Ces quelques exemples, s'ils ne couvrent pas l'ensemble des connaissances actuelles quant à la régulation des chemins métaboliques dans la levure, n'en constituent pas moins un échantillonnage représentatif de la complexité apparente qui semble régir les mécanismes de contrôle des voies anaboliques et cataboliques dans cet organisme. Non seulement les opérons y sont rares, mais encore la transcription des gènes de structure semble, dans certains cas, être sous la dépendance de plusieurs gènes de régulation. Les mutants de régulation sont malheureusement beaucoup trop rares, pour le moment, et aucun mutant opérateur n'a été reconnu avec certitude; c'est dire que la comparaison des modes de contrôle de la vitesse de synthèse des enzymes dans les bactéries et dans les levures n'est pas très aisée. Peut-être pourrions-nous nous résumer en disant que : induction et répression permettent de varier la vitesse de transcription des gènes de structure dans ces eucaryotes; que le mécanisme du contrôle est certainement proche sinon identique à celui existant dans les bactéries mais, outre la présence d'opérateurs plus nombreux, les aporépresseurs sont probablement plus complexes et peut-être sous la dépendance d'effecteurs plus nombreux; enfin, dans bien des cas, l'importance de ce mode de contrôle semble moins grande que dans les bactéries, un rôle plus grand étant dévolu à la modulation d'activité.

A ce sujet, il est intéressant de comparer l'importance quantitative de la dérégulation ou de l'induction dans *Neurospora* ou *Saccharomyces* et dans *E. coli*; pour l'ATCase, par exemple, la variation de vitesse de synthèse est de deux fois dans celui-là (Donachie : 1964^b) et peut atteindre mille fois dans celui-ci : dans une souche dérégulée, l'ATCase peut représenter jusqu'à 7 % de la totalité des protéines d'une cellule d'*E. coli* (Shepherdson ^{et al.} : 1960), valeur que l'on est bien loin d'atteindre dans *Neurospora*. Des constatations identiques ont été faites pour d'autres enzymes dans les bactéries, ainsi la β -galactosidase ou l'OTC peuvent représenter des pourcentages importants du total des protéines. Ces chiffres ne laissent pas d'étonner puisqu'ils signifient que, dans certaines conditions, le produit d'un seul gène peut représenter 1/20 des protéines synthétisées par la cellule. Pourquoi une situation identique ne se présente-t-elle pas dans un eucaryote ? On peut supposer que ces protéines ne sont pas très dissemblables

quant à leur poids moléculaire dans la levure et dans la bactérie, donc que les gènes de structure ont, approximativement, même longueur; les capacités de synthèse des deux organismes sont du même ordre de grandeur (en milieu minimum + glucose, le temps de génération est de l'ordre de 60 minutes pour *E. coli* et de près de 120 minutes pour *S. cerevisiae*). Une explication peut venir rapidement à l'esprit qui tient compte de la différence de volume entre la bactérie et la levure : de l'ordre de $2 \mu^3$ pour le *coli*, de 70 à $100 \mu^3$ pour *S. cerevisiae* haploïde. La synthèse de messenger et sa traduction en protéine se feraient à des vitesses comparables dans les deux organismes, mais l'élément limitant (le gène) étant lui aussi identique dans les deux cellules, la concentration de l'enzyme serait inversement proportionnelle au volume des cellules. Une telle hypothèse n'exclut cependant pas des variations de vitesse de synthèse - et par conséquent, des concentrations d'enzymes - de même amplitude dans les deux organismes; elle suggère simplement que, dans la bactérie, la capacité de synthèse protéique par rapport à l'ADN est, en général, sous-utilisée. Reste à savoir quelles sont les autres protéines contenues dans la levure; les rapports protéines/DNA sont de l'ordre de 18 dans *E. coli* et de 313 dans *S. cerevisiae* (Leick : 1968), il faut donc supposer dans la levure un pourcentage élevé de protéines de structure ou de protéines dépourvues d'activité enzymatique.



CHAPITRE IV

CONTROLE DE L'ACTIVITE DES ENZYMES

L'un des corollaires obligé de la régulation de vitesse de synthèse des enzymes est la possibilité d'une dilution assez rapide de l'enzyme devenu superflu après retrait de l'inducteur ou addition du répresseur. Or, si l'accroissement de la masse totale des protéines peut être très rapide chez les bactéries, il n'en va plus de même dans de nombreux tissus d'organismes différenciés. Un palliatif peut cependant apparaître, qui remédie à l'absence d'accroissement de la masse cellulaire : c'est l'existence de mécanismes importants de dégradation des protéines, permettant un renouvellement plus ou moins rapide des espèces polypeptidiques macromoléculaires présentes dans le cytoplasme. Ce "turn-over" des protéines ne peut cependant être considéré comme partie d'un système de régulation que dans la mesure où la dégradation est sélective.

L'importance relative des mécanismes de contrôle de la synthèse protéique plus faible dans les eucaryotes, n'implique évidemment pas que la répression ne joue aucun rôle dans ces organismes. Bien au contraire, la tendance actuelle est précisément de penser que la différenciation est le résultat d'une répression plus ou moins généralisée du génome de la cellule. Cette répression généralisée serait cependant peu spécifique et l'activité d'un gène résulterait, elle, d'une dérèpression beaucoup plus spécifique.

Un deuxième corollaire du modèle de Jacob et Monod est l'instabilité du messenger, et on suppose que la vitesse de synthèse de l'enzyme est une fonction directe et simple de la concentration en mRNA.

Dans les bactéries, la durée moyenne de demi-vie des messagers est de l'ordre de quelques minutes seulement. Les avis divergent cependant quant à l'homogénéité de la stabilité des mRNA bactériens. Dans les organismes supérieurs par contre, on s'accorde généralement pour admettre une durée de vie

beaucoup plus longue pour les mRNA et aussi une hétérogénéité plus grande dans leur stabilité. Le cas des réticulocytes est singulier en ce que ces cellules ne synthétisent pratiquement qu'une seule espèce protéique et le messenger correspondant y est particulièrement stable (Seed *et al.*: 1963).

On peut donc s'attendre à voir apparaître, chez les eucaryotes, des modes de contrôle affectant la stabilité des protéines et aussi, nous l'avons dit, un accroissement de l'importance des contrôles d'activités enzymatiques.

o o

La thréonine désaminase occupe, à ce point de vue, un rang singulier; c'est en effet en étudiant cet enzyme, qu'en 1956, Umbarger a découvert et décrit le premier cas de rétroinhibition chez un microorganisme. C'est aussi le comportement cinétique de cet enzyme qui a permis à Monod, Wyman et Changeux (1965) de formuler un modèle général pour les enzymes allostériques. Ce modèle suppose que les protéines allostériques sont des oligomères, possédant au moins un axe de symétrie; chacun des protomères ne possède qu'un seul site capable de fixer un ligand. Les oligomères allostériques peuvent exister sous, au moins, deux états d'équilibre qui diffèrent par les contraintes conformationnelles imposées aux protomères et ces états sont stabilisés par la présence ou l'absence d'effecteurs allostériques; la transition de l'un à l'autre de ces états implique des modifications d'affinités des substrats pour leur site spécifique. A partir de ce modèle, un traitement mathématique rend compte de la plupart des résultats expérimentaux. Ajoutons que d'autres modèles ont été proposés, par Koshland entre autres (1966), mais ce n'est pas ici le lieu d'en discuter les valeurs respectives.

Les propriétés remarquables de la thréonine désaminase, mises en évidence dans *E. coli* et *Salmonella*, se sont retrouvées identiques dans leurs grandes lignes, chez *S. cerevisiae* (Holzer : 1964, de Robichon : 1967) *et al.* et il est plus que probable que les modèles proposés pour les enzymes bactériens s'appliquent à toutes les protéines allostériques.

Si, dans les bactéries, la modulation de l'activité d'enzyme est essen-

tiellement le fait de molécules à très faible poids moléculaire, il n'en va pas toujours ainsi et des macromolécules peuvent influencer l'activité de certains enzymes.

On sait que, lors de l'infection de *E. coli* B par le phage T₄, il y a maintien du métabolisme énergétique, mais blocage très rapide de la biosynthèse propre à la bactérie. Sköld et Buchanan (1964) ont montré que la RNA polymérase DNA dépendante est rapidement inactivée lors de l'infection par ce phage, et, cette inactivation ne se produisant pas en présence de chloramphénicol, l'inhibiteur de l'enzyme pourrait être une protéine.

D'autres exemples ont été décrits, où une activité enzymatique ne peut être mise en évidence qu'après chauffage. Ainsi, l'essai en extrait à 22°C, de la 5'-nucléotidase d'*E. coli* montre moins de 1 % de l'activité obtenue après un chauffage à 58°C pendant 5 minutes. Cet inhibiteur thermolabile peut être supposé de nature protéique puisque sensible à la pronase, mais insensible à la RNase et à la DNase (Dvorak ^{et al.} : 1966). Cette hypothèse a été confirmée par la purification de la protéine inhibitrice, dont l'action est stoechiométrique; l'activité inhibitrice est altérée par l'urée, mais ni par le mercaptoéthanol, ni par les métaux (Neu : 1967). De même la nucléotide diphosphate hexose pyrophosphatase - dont l'activité pourrait servir à éviter l'accumulation de nucléotides diphosphate - ne peut être mise en évidence dans des extraits d'*E. coli* qu'après un chauffage de quelques minutes à 58°C. Ici encore, l'inhibiteur, qui agit de façon stoechiométrique, est insensible à la RNase et DNase et précipitable par (NH₄)₂SO₄ (Melo, Glaser : 1966). Il semble d'ailleurs que ces deux activités enzymatiques soient dues à une même protéine (Glaser *et al.* : 1967). Enfin, un traitement à 80°C, durant 10 minutes, fait apparaître dans un extrait de *Bacillus subtilis* une activité de DNase importante (Strauss, Marone : 1967).

Il est remarquable de constater qu'aucun des enzymes cités, et dont l'activité peut être inhibée par une protéine, n'est régulé : il est tentant de voir là plus qu'une coïncidence et d'attribuer à ces inhibiteurs un rôle régulateur dans l'activité de ces enzymes.

Si la littérature relative au contrôle métabolique dans les cellules de mammifères est nombreuse, mais parfois aussi touffue, il en ressort cependant

que la régulation par modulation de l'activité enzymatique y tient une place très importante. On peut, en schématisant, discerner trois classes dans les effets connus, selon qu'il s'agit soit d'une modification de la structure primaire de la protéine - par exemple, activation de zymogènes - soit d'une inhibition de son activité par une macromolécule, soit encore, comme chez les bactéries, une altération réversible de l'activité enzymatique par des effecteurs de faible poids moléculaire. Dans ces deux derniers cas, la modification de la protéine peut entraîner une stabilisation ou une sensibilisation à la dégradation, ce qui se traduit par un effet d' "induction" ou de "répression" sans qu'il y ait pour autant variation de la vitesse de synthèse de l'enzyme.

Activation de zymogènes

Dans les animaux, de nombreuses protéines enzymatiquement inactives sont secrétées, qui sont ultérieurement transformées en enzymes actifs. Les exemples les plus connus de ces zymogènes sont les précurseurs des enzymes digestifs : trypsinogène, chymotrypsinogène, et pepsinogène et un groupe important de protéines impliquées dans la coagulation du sang, telles prothrombine et fibrinogène. Les zymogènes sont totalement inactifs et leur activation, irréversible, peut en ce sens être considérée comme le stade ultime de la biosynthèse de ces enzymes. La transformation est catalysée par des enzymes protéolytiques qui agissent avec beaucoup de sélectivité et de spécificité, n'hydrolysant qu'un nombre limité de liaisons peptidiques du zymogène (voir revue par Neurath : 1957); cette protéolyse limitée est d'ailleurs un des aspects très particulier de ce phénomène, le précurseur possédant en général plusieurs liaisons susceptibles d'être hydrolysées.

Stabilisation ou sensibilisation d'enzyme

Ces deux processus, ainsi que l'inactivation, se rencontrent souvent dans les mammifères et cela n'a rien de surprenant si l'on songe au temps de

génération, extrêmement long, de ces cellules alors que le temps de renouvellement du contenu cytoplasmique - essentiellement des protéines - est beaucoup plus court, ce qui implique une synthèse et une dégradation continues de ces molécules. La vitesse de dégradation varie d'une protéine à l'autre : ainsi l'arginase est particulièrement stable dans le foie de rat avec un temps de demi-vie de 5 jours, alors que celui de la tryptophane pyrrolase est estimé à 2 heures, le temps moyen de demi-vie des protéines du foie de rat étant de 2 à 3 jours (Schimke : 1964b). Des déterminants doivent donc exister, responsables de cette différence de sensibilité vis-à-vis de la protéolyse; de plus il est possible d'influencer la vitesse de dégradation d'une protéine, une sensibilisation se traduisant alors par une disparition plus rapide de l'activité et une stabilisation mimant une induction.

L'induction peut donc être définie, dans ces organismes, comme un accroissement du rapport synthèse/dégradation, une répression résultant d'une diminution de ce rapport.

La rapide disparition de la tryptophane pyrrolase en fait un outil particulièrement bien adapté à l'étude du "turn-over" des protéines. Le contenu, en cet enzyme, du foie de rat peut être accru par administration d'hydrocortisone ou de tryptophane; dans les deux cas, il s'agit d'un accroissement de protéines synthétisées "de novo", mais le mode d'action de ces deux substances diffère et l'effet est cumulatif. En utilisant conjointement des études immunologiques et d'incorporation ou de libération d'acides aminés marqués, on a pu montrer (Schimke *et al.*: 1965) que l'administration de tryptophane se traduit par un accroissement linéaire de la quantité d'enzyme et que l'injection d'hydrocortisone provoque une augmentation de la vitesse de synthèse de l'enzyme de 6 à 7 fois, mais l'activité totale plafonne rapidement. Si l'hormone accroit réellement la vitesse de synthèse de l'enzyme, le tryptophane n'influe aucunement celle-ci, mais stabilise l'enzyme en empêchant sa dégradation. Le mécanisme exact de cette protection n'est pas connu, mais on suppose que le tryptophane favorise la fixation de la porphyrine sur l'apoenzyme et insensibilise ainsi la protéine contre la protéolyse. Cette dégradation exige une certaine organisation du tissu puisqu'elle peut aussi être mise en évidence dans des tranches de foie, mais ne se produit pas dans un homogénat total

à pH neutre; cette remarque est d'ailleurs aussi valable pour la dégradation des autres protéines et le processus semble exiger de l'énergie (effet inhibiteur de l'anaérobiose).

L'exemple de la tryptophane synthétase est pratiquement le seul où on a pu montrer l'effet stabilisant du substrat "*in vivo*". Les cas de sensibilisation ou d'inactivation sont beaucoup plus nombreux et nous avons déjà dit l'importance que peut revêtir un tel processus pour la "dilution" d'enzymes devenus superflus.

L'un des effets de "répression" le plus marqué chez les animaux est probablement la répression de la transaminase par la créatine dans le foie de poulet ou de canard : l'addition de 2 % de créatine dans la nourriture peut faire tomber l'activité de cet enzyme, après 3 jours, à 2 % seulement de sa valeur initiale (Walker : 1961). Il est certain que la seule dilution ne peut rendre compte d'une disparition aussi rapide de l'activité et qu'un processus d'inactivation doit être déclenché par la créatine.

Un phénomène semblable se retrouve dans le foie de rat où l'un des enzymes participant à la synthèse du cholestérol voit son activité diminuer de 100 fois en deux jours après addition d'un excès de cholestérol dans la nourriture (Siperstein et Guest, cités par Pardee et Wilson : 1963). Dans le même organe, le niveau d'arginase est fonction de la richesse protéique de l'aliment fourni à l'animal; les variations de ce niveau sont la conséquence de variation de la vitesse de synthèse et de la vitesse de dégradation de l'enzyme. La privation de protéines provoque une augmentation de l'activité enzymatique résultant essentiellement d'un arrêt de la dégradation; lorsque le contenu protéique de la nourriture passe de 70 à 8 % il y a diminution de la vitesse de synthèse et en même temps accroissement de la vitesse de dégradation (Schimke : 1964^b).

On voit donc que, selon les circonstances, la dégradation peut être accélérée ou ralentie; la nature et la spécificité des enzymes protéolytiques de la cellule étant constantes, il faut donc nécessairement que des effecteurs modifient le substrat de la protéolyse afin d'accroître ou diminuer son affinité pour les protéases. Ces effecteurs peuvent être de petites molécules, comme dans le cas de la tryptophane pyrrolase, ou, dans d'autres cas, probablement des macromolécules de nature protéique.

Inactivation

Depuis le début du siècle, la présence d'inhibiteurs de la trypsine a été découverte dans de très nombreux tissus animaux et végétaux : dans le pancréas, dans de nombreuses légumineuses, dans le colostrum, dans le blanc d'oeuf, dans l'urine, pour ne citer que les plus étudiés (voir revue par Laskowski et Laskowski : 1954). Tous ces inhibiteurs sont des protéines dont les poids moléculaires s'étalent de 6.000 à 40.000 ou plus, les valeurs différant parfois sensiblement selon le mode de détermination utilisé. Une molécule de trypsine s'associe à une molécule d'inhibiteur pour former un complexe enzymatiquement inactif, l'inhibition étant non compétitive, en tout cas vis-à-vis des substrats naturels. Bien que très étudié, le mécanisme intime de l'association de l'enzyme et de son inhibiteur n'est pas élucidé avec certitude. On a cru longtemps que l'inhibiteur n'était pas altéré par sa réaction avec la trypsine, mais certains auteurs supposent actuellement qu'un lien peptidique, particulièrement sensible, serait hydrolysé avec formation ultérieure d'un lien covalent entre les deux molécules (Finkenstadt, Laskowski : 1965).

Si de nombreux travaux ont été consacrés aux caractéristiques physicochimiques des inhibiteurs tryptiques, il est par contre rarement fait mention du rôle physiologique de ces molécules, pas plus d'ailleurs que d'une éventuelle variation de sa concentration dans les tissus. La seule hypothèse avancée à ce sujet est la protection des anticorps tissulaires contre une protéolyse par la trypsine active.

Bien qu'aucun fait ne soit avancé pour étayer cette hypothèse, Wacker et Schoenenberger (1966) ont proposé une fonction régulatrice aux inhibiteurs protéiques de la déshydrogénase lactique. Cet enzyme est un oligomère formé de protomères qui peuvent être de deux espèces : M et H, toutes deux enzymatiquement actives; le nombre de sous-unités est fonction de l'origine et, *in vitro*, de la concentration de l'enzyme et des effecteurs. Deux peptides (I et II) ont été isolés de l'urine humaine et caractérisés (poids moléculaire : 1.500 et 2.000) : le peptide I inhibe spécifiquement l'activité des sous-unités M et le peptide II celle des sous-unités H. Ainsi la LDH-M₄ du muscle de lapin est totalement inhibée par le peptide I, le II étant dépourvu d'action; le II abolit complètement l'activité de LDH-H₄ du coeur de pigeon qui est in-

sensible au peptide I, et, dans les hétérooligomères, l'inhibition par les peptides I et II est proportionnelle au pourcentage des sous-unités M et H. C'est la présence de ces inhibiteurs dans les muscles cardiaque et du squelette humain qui fait croire aux auteurs au rôle régulateur de ces peptides. Mais une régulation suppose une variation de la concentration de l'inhibiteur sous l'effet de stimulus externes, variation qui n'a pas, jusqu'à présent, été remarquée.

Des inhibiteurs protéiques d'activité enzymatique ont aussi été fréquemment décrits dans les eucaryotes inférieurs et, en général, la fonction régulatrice de l'inhibiteur y est souvent beaucoup plus évidente, leur présence n'étant pas constante.

La morphogénèse et la différenciation cellulaire sont des processus complexes exigeant l'apparition séquentielle de certaines fonctions et l'activité, éventuellement temporaire, de quelques enzymes.

Dictyostelium discoideum est un *myxomycète* dont le cycle vital comprend une morphogénèse très simple : en condition de privation, les cellules amoébiennes cessent de croître, s'aggrègent pour former un *pseudoplasmodium* et finalement un corps fructifère enfermant des spores. La membrane sporale et le corps fructifère contiennent une quantité importante d'un polysaccharide insoluble complexe associant cellulose et glycogène; ce polysaccharide représente 5 % du poids sec du sporange, mais est absent des cellules au début de la différenciation (Wright : 1966). L'UDP-gal polysaccharide transférase est un des enzymes participant à la synthèse de ce polysaccharide et son activité apparaît au début de la cytodifférenciation, augmente de plus de 10 fois puis disparaît très rapidement - il n'y a, pendant cette morphogénèse, aucun accroissement de masse -. Tant l'apparition que la disparition d'activité enzymatique nécessitent une synthèse de mRNA et de protéines, puisque les deux processus sont sensibles à l'actinomycine et à l'actidione (Sussman : 1965; Ashworth, Sussman : 1967). L'effacement de l'activité de l'enzyme exige donc une synthèse de protéines "de novo".

Des processus comparables ont aussi été découverts, dans les levures. Nous verrons que le phénomène de déadaptation est en tout point similaire aux

exemples décrits ici et, sans vouloir dresser une liste complète de tous les cas où une activité enzymatique disparaît sans un accroissement correspondant de masse cellulaire, quelques travaux sont cependant à citer.

La malate déshydrogénase est induite par l'acétate dans *S. cerevisiae var. ellipsoideus*. L'addition de glucose à une souche induite provoque une diminution de 70 % de l'activité de cet enzyme en 50 minutes, pour un accroissement de masse de 15 %. Ce phénomène de déadaptation est qualifié de "inactivation - répression" par les auteurs (Ferguson *et al.*: 1967). Cette inactivation nécessite, pour se manifester, une synthèse protéique puisque l'addition simultanée d'actidione et de glucose empêche l'inhibition d'activité; par contre, l'action de la cycloheximide est d'autant plus faible qu'elle est ajoutée tardivement après le glucose. Tout se passe donc comme si la protéine induite lors de l'addition de glucose avait une action catalytique et, comme l'activité séquestrée ne peut plus être mise en évidence, l'éventualité d'un "turn-over" a été envisagée, mais essayée sans succès et aucune autre hypothèse n'a été émise par les auteurs quant au mécanisme de cette "inactivation - répression".

Si la comparaison entre la levure et les tissus d'organismes supérieurs reste valable, l'insuccès de l'essai de protéolyse "*in vitro*" n'a rien d'étonnant, la dégradation des enzymes hépatiques exige, elle aussi, un tissu parfaitement organisé. L'éventuelle synthèse d'une protéase spécifique étant exclue, on pourrait supposer que l'inactivation nécessite l'intervention du produit de l'activité d'un enzyme induit par l'addition du glucose. Une publication ultérieure du même laboratoire (Duntze *et al.*: 1968) abandonne d'ailleurs l'hypothèse de la synthèse "*de novo*" d'une protéine. Ce nouveau point de vue repose essentiellement sur le fait qu'une inactivation partielle peut avoir lieu en absence de tryptophane dans une souche exigeant cet acide aminé. (L'effet de la cycloheximide serait alors le résultat d'une inhibition par l'antibiotique de l'utilisation du glucose). Ce critère est cependant loin d'être absolu : on sait que l'épuisement des réserves d'acides aminés dans une cellule de levure est très lent et de plus, l'éventuelle protéine induite pourrait ne pas contenir de tryptophane.

Parallèlement à la disparition de la malate déshydrogénase, la fructose diphosphatase est, elle aussi, inactivée par l'addition de glucose à une

culture de *S. cerevisiae* sur acétate. Les données sur ce phénomène sont très peu nombreuses, mais un traitement, modéré, par la chaleur permet de réactiver l'enzyme, la dialyse ou la filtration sur gel étant inefficace (Harris, Ferguson : 1967). Ces résultats ne sont pas suffisants pour inférer le mode d'inactivation. De même, si on sait que lors de la répression de la respiration par le glucose, le Q_{O_2} diminue plus rapidement que ne le laisse prévoir la dilution du matériel existant, les études n'ont pas porté sur le mécanisme de cette disparition (Utter *et al.* : 1968).

Un autre cas très intéressant a été mis en évidence dans *S. cerevisiae* en croissance synchrone (Eckstein *et al.* : 1967) : il fait apparaître une oscillation de l'activité de la DNA polymérase, le maximum d'activité se situant peu après, le minimum peu avant, le début de la réplication. Cette fluctuation fait varier de 8 fois l'activité de l'enzyme à chaque réplication. Les résultats expérimentaux permettent d'exclure l'intervention cyclique d'effecteurs, de même qu'une fixation réversible de l'enzyme aux chromosomes; en conséquence, les auteurs penchent en faveur de l'idée qu'il y a formation réversible d'un zymogène ou dégradation et resynthèse de l'enzyme à chaque cycle. La DNA polymérase est l'un des enzymes dont l'activité n'est nécessaire que temporairement dans le cycle de division cellulaire, pour autant que la réplication de l'ADN soit plus rapide que le doublement de la masse cellulaire.

Un cas particulier d'inactivation d'enzyme peut être illustré par le comportement, entre autres, de la glutamine synthétase dans *E. coli* : la synthèse de cet enzyme y est répressible par l'ammonium, mais l'addition d' NH_4^+ provoque non seulement un arrêt de synthèse, mais encore une inactivation de l'enzyme (Mecke, Holzer : 1966). On a pu montrer que l'enzyme peut exister sous deux formes, l'une active, l'autre quasiment inactive et que ces deux transformations sont catalysées chacune par un enzyme. Une adénylyltransférase catalyse la conversion de la synthétase active en synthétase inactive en présence d'ATP et de Mg^{++} , l'inactivation maximale étant atteinte par la fixation d'un équivalent AMP sur chacune des 12 sous-unités composant l'enzyme (Kingdon *et al.* : 1967; Holzer *et al.* : 1968). Le contrôle de l'activité cellulaire de cet enzyme est extrêmement complexe puisque, à la répression, s'ajoute une inactivation et que l'activité catalytique de la synthétase est sous le contrôle

de très nombreux effecteurs.

Quelles conclusions peut-on tirer de cette rapide revue des mécanismes de régulation dans les bactéries, les eucaryotes inférieurs et supérieurs ? Nous avons dit avoir choisi la levure en tant que point de convergence possible ou plutôt comme maillon intermédiaire de la chaîne menant des procaryotes aux organismes différenciés. Ceci ne signifie pas que le but recherché soit de faire la phylogénie des modes de contrôle de l'activité cellulaire. Il est d'ailleurs peut-être hasardeux de parler d'évolution des mécanismes de contrôle en comparant simplement ce que certains auteurs appellent "contrôles plus primitifs" des bactéries (Halvorson : 1966) aux mécanismes que la tâtonnante cohue des résultats expérimentaux laisse deviner dans les organismes supérieurs. Il ne faut pas, en effet, perdre de vue que les bactéries que nous étudions actuellement ont, elles aussi, subi une pression de sélection extrêmement forte, ont, elles aussi, évolué et n'ont probablement plus grand-chose de commun avec la cellule originelle qui se trouve à la base de la généalogie des organismes vivants. Chaque type d'organisme a suivi une évolution parallèle l'adaptant le mieux possible à ses conditions d'existence, et, dès lors, un mécanisme de contrôle sera d'autant plus évolué qu'il sera mieux adapté aux diverses situations auxquelles l'organisme aura à faire face. On peut donc simplement considérer que bactéries, levures et eucaryotes supérieurs ayant atteint des degrés d'organisation très différents posséderont des modes de contrôle adaptés à cette organisation et c'est en ce sens que les *protoascomycètes* peuvent être considérés comme un chaînon logique reliant bactéries et organismes différenciés.

Un microorganisme peut se trouver dans des conditions de croissance fort diverses et variant rapidement, le seul "but" à atteindre, pour lui, étant sa reproduction la plus rapide possible. Les mécanismes de contrôle les mieux adaptés seront donc ceux permettant une réponse rapide à ces variations de milieu. Ce sont la régulation de la vitesse de synthèse des protéines à partir des acides aminés et l'inhibition - ou la stimulation - de l'activité enzymatique. Induction et répression permettent des variations très rapides et extrêmement importantes du taux de synthèse des enzymes, la vitesse nouvelle étant atteinte en quelques minutes. La croissance, en général rapide, permet

l'élimination des enzymes devenus superflus. Le second mode se surimpose et affine le premier : la rétroinhibition, par sa sensibilité et sa réponse quasi-instantanée, permet un contrôle très efficace du flux de métabolite en fonction de la concentration de celui-ci. Ainsi, induction et répression fournissent à la bactérie la machinerie nécessaire à son métabolisme en fonction du milieu et la rétroinhibition permet l'utilisation harmonieuse - et économique - de cette machinerie.

La situation dans les organismes supérieurs est tout autre. Les cellules y sont organisées en tissus et ont à faire face à des conditions très différentes de celles rencontrées par les bactéries puisque, en général, elles baignent dans un milieu très constant et l'un des rôles de la régulation sera précisément la stabilisation et le maintien de la constance de ce milieu. Les tissus interagissant entre eux, et vu la complexité des métazoaires, on peut s'attendre à une régulation beaucoup plus complexe dans ces organismes.

Est-ce à dire que les modes de contrôle y seront différents de ceux mis en évidence dans les bactéries ? Il était naturel que l'on recherche dans les eucaryotes différenciés les mécanismes découverts dans les microorganismes en vertu - comme le disent plaisamment Monod et Jacob à propos du code (1961) - de l'axiome bien connu que "tout ce qui s'avère vrai pour *E. coli* est aussi vrai pour l'éléphant". Et de fait, inhibition, induction et répression se retrouvent dans les formes supérieures, mais leur importance relative diffère et elles coexistent avec des mécanismes plus rares chez les bactéries.

L'une des différences qui distingue sans doute le plus les microorganismes des cellules d'organismes supérieurs est la vitesse de croissance et un renouvellement des protéines important dans celles-ci, pratiquement nul dans ceux-là. Ce second point n'est d'ailleurs peut-être qu'une conséquence du premier. En effet, si le "turn-over" est considéré comme quantitativement peu important dans les bactéries et dans les levures en croissance, il n'en est plus de même lorsque cesse la multiplication cellulaire. Dans *E. coli*, aucune dégradation de protéine n'est détectable dans les cellules en phase de croissance exponentielle, mais elle atteint 5 à 6 %/h en absence de multiplication (Mandelstam : 1958) ou durant une diauxie (Willettts : 1965). De

même dans *S. cerevisiae*, la vitesse de renouvellement des protéines n'atteint dans les cellules en croissance que 4 % de ce qu'elle est dans les "resting cells" (Halvorson : 1958).

La lenteur de la croissance impose alors pour les organismes supérieurs quelques adaptations de la terminologie et une extension du sens des mots : dans les tissus animaux, la régulation peut impliquer des altérations, simultanées ou non, des vitesses de synthèse et de dégradation de chaque protéine spécifique et l'induction est alors, un accroissement du rapport synthèse/dégradation. La dégradation peut être considérée comme une inhibition irréversible de l'activité d'un enzyme et ce mode de contrôle prendra, dans les eucaryotes, une importance qu'il n'a pas dans les procaryotes.

L'étude des contrôles métaboliques existant dans la levure permettra de voir dans quelle mesure la régulation "bactérienne" se retrouve aussi dans cet organisme et si l'organisation cellulaire de *S. cerevisiae* impose déjà à celle-ci des mécanismes plus spécifiques aux organismes supérieurs.

D E U X I E M E

P A R T I E

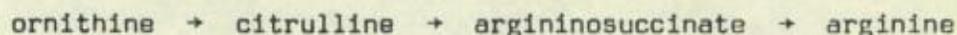
.....
.....

Faint mirrored text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

CHAPITRE V

BIOSYNTHESE DE L'ARGININE

Chez *E. coli*, 8 enzymes participent, en une séquence linéaire, à la synthèse de l'arginine au départ du glutamate. Les dernières étapes de cette chaîne - transformation de l'ornithine en arginine - ont été rapidement élucidées, elles sont identiques dans les bactéries, les champignons et les tissus animaux (revue par Davis : 1955) et se font suivant le schéma :



La mise en évidence des premières étapes a été beaucoup plus laborieuse. L'accumulation de α -N-acétyl-glutamate semialdéhyde dans un mutant d'*E. coli* exigeant l'ornithine (Vogel : 1953) et la mise en évidence de l'acétylation enzymatique du glutamate (Maas *et al.* : 1953) ont permis de distinguer la séquence de synthèse de l'arginine où les premiers intermédiaires sont acétylés, de celle de la proline où intervient la semi-aldéhyde glutamique non acétylée.

La synthèse de ces 8 enzymes est répressible dans le *coli K-12*. Alors que l'on a pu montrer assez tôt le caractère pléiotrope de la répression, le fait de savoir s'il y a, ou non, coordination des synthèses a longtemps tardé, ce retard étant dû essentiellement à la difficulté de dosage de certains enzymes dont l'activité spécifique est très faible. La diversité d'activité spécifique s'accompagne d'une disparité dans les coefficients de répressibilité (Maas : 1961), ce qui ne favorisait pas l'idée d'une coordination. Or cette notion, synthèse de tous les enzymes dans un rapport constant, est impliquée dans la définition de l'opéron (Jacob *et al.* : 1960).

Les 8 gènes de structure des enzymes de biosynthèse de l'arginine sont, dans *E. coli K-12*, dispersés en 5 groupes et forment donc, selon la terminologie proposée par Maas, un régulon et non un opéron unique (Lavallé *et al.* : 1961; Maas : 1961; Maas et Maas : 1962). Quatre de ces gènes - B, C, E, H -

sont cependant cotransductibles, suggérant pour ceux-ci le groupement en un opéron. Une topographie plus fine, des mesures de coordination de synthèse et l'existence de mutants polaires ont confirmé cette hypothèse. Les quatre gènes, correspondant respectivement à l'acétylornithine-lyase, déshydrogénase, phosphotransférase, lyase, sont groupés dans l'ordre ECBH (Glansdorff, Sand : 1965). Les synthèses des enzymes CBH sont parfaitement coordonnées, celle de l'enzyme E l'est pour des activités spécifiques moyennes ou élevées et montre une décoordination pour les valeurs basses. Le rapport des activités spécifiques mesurées en état de dérégulation et de répression est de 25 pour l'enzyme E, de 50 pour CBH; il est de 600 pour l'enzyme F (OTC) dont le gène de structure est éloigné du groupe ECBH (Glansdorff, Sand : 1965).

La régulation de cette séquence est complétée par la rétroinhibition de l'acétylase, premier enzyme de la chaîne, rétroaction négative de l'arginine, montrée *in vivo* par Vyas et Maas (1963) et confirmée *in vitro* par Daliers (1965).

La biosynthèse de l'arginine dans la levure, schématisée dans la figure 1, se fait par un chemin fort semblable à celui existant dans *E. coli*; toutes les étapes sont comparables. Une différence essentielle distingue cependant les deux mécanismes : alors que dans la bactérie, l'acétylation du glutamate se fait aux dépens de l'acétyl-CoA, il y a, dans la levure, transacétylation au départ de l'acétylornithine produite par le 4ème enzyme, ce qui cyclise le groupe de réactions 2 - 3 - 4 (De Deken : 1962, 1963). La transacétylase est le seul enzyme fonctionnel malgré la présence de l'acétylornithinase qui ne joue donc ici aucun rôle (De Deken : 1963). On pourrait voir là le résidu d'une évolution, mais il est peu probable qu'un enzyme totalement dépourvu d'intérêt pour la cellule puisse subsister bien longtemps, le mutant ayant perdu cet enzyme étant, si peu que ce soit, favorisé.

Cette séquence cyclique n'est d'ailleurs pas propre aux levures et existe aussi dans de nombreuses bactéries (Udaka : 1966) et il est tout à fait remarquable de constater que dans tous les cas où la séquence de synthèse de l'arginine est linéaire, c'est le premier enzyme qui est sensible à la rétroinhibition et que c'est le second (kinase - déshydrogénase) qui l'est dans

la levure (De Deken : 1962) et dans tous les organismes ayant même chemin (Udaka : 1966). C'est probablement l'un des cas où la fonction physiologique de la rétroinhibition est la mieux mise en évidence.

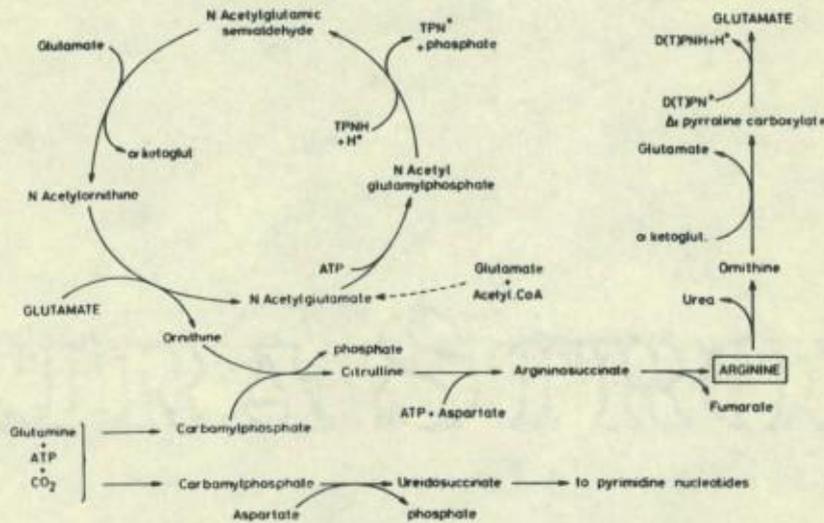


Figure 1

Dix locus génétiques sont connus dont l'intégrité est nécessaire à la formation des enzymes participant à la synthèse de l'arginine.

La localisation de 3 de ces marqueurs est connue : ar9, marqueur de centromère du chromosome V, ar6 sur le même groupe de liaison, mais à près de 48 centimorgans de ar6 et enfin ar4 proche du centromère du chromosome VIII (Mortimer, Hawthorne : 1966). La topographie des autres locus n'a pas été suffisamment étudiée pour pouvoir, avec exactitude, en préciser la localisation. Les indications obtenues permettent cependant de dire que :

- ar6 et ar5 qui correspondent respectivement à la kinase et à la déshydrogénase sont très liés sinon contigus et il n'est pas exclu de penser qu'il s'agisse là d'un opéron. Ce problème est actuellement à l'étude dans ce laboratoire;
- des mutations dans le locus ar4 conduisent au phénotype lyase⁻;
- enfin, les mutants ar10 et ar1 sont tous deux ASA synthétase négatifs.

T A B L E 1

<u>ENZYMES</u>	<u>NOMS USUELS</u>	<u>GENES</u> [∇]
1) Acétyl-CoA : L-glutamate N-acétyltransférase	Acétylglutamate synthétase	?
2) ATP : α -N-acétyl-L-glutamate -5-phosphotransférase	Kinase	ar6
3) α -N-acétyl-L-glutamate γ -semial- déhyde : NADP oxydoréductase	Déshydrogénase	ar5
4) α -N-acétyl-L-ornithine : 2-oxo- glutarate aminotransférase	Transaminase	ar8 ?
5) α -N-acétylornithine-glutamate transacétylase	Transacétylase	ar7
6) Carbamylphosphate : L-ornithine carbamyltransférase	OTC	ar3
7) L-citrulline : L-aspartate ligase	AS synthétase	ar1-ar10
8) L-argininosuccinate arginine lyase	Lyase	ar4-(ar9 ?)
9) Glutamino-carbamoylphosphate synthétase	Carbamoylphosphate synthétase	cpa ₁ , cpa ₂ ar2 ? ar11 ?

[∇] (Minet *et al.*, en préparation).

L'analyse génétique les montre très liés, mais il est difficile de préciser s'ils sont contigus ou non. L'existence de mutants ne complétant ni l'un, ni l'autre, est cependant en faveur de cette hypothèse (Minet *et al.*: en préparation).

Ces résultats d'analyse génétique, s'ils ne permettent pas de localiser avec précision tous les locus *ar*, montrent cependant une très grande dispersion des gènes de structure des enzymes de la biosynthèse de l'arginine. Dans le meilleur des cas, en supposant que les gènes liés sont effectivement contigus, le "régulon" arginine comprendrait, dans *S. cerevisiae*, 8 opérons au moins. Mais, il ne faut pas omettre les locus *cpa*₁ et *cpa*₂, gènes de structure de la carbamoylphosphate synthétase, dont la synthèse est, elle aussi, répressible par l'arginine. Ces deux locus n'étant pas liés (Lacroute *et al.*: 1965), ceci porterait à 10 le nombre d'opérons sensibles à une répression par l'arginine. C'est dire que la situation existant dans *E. coli* - 5 opérons dont 1 de 4 gènes - se retrouve, encore amplifiée, dans la levure. Si la corégulation - effet pléiotrope - de ces enzymes ne doit pas nous étonner, on ne doit pas pour autant s'attendre à une coordination.

Le carbamoylphosphate intervient dans deux chemins métaboliques : celui de l'arginine où il participe, avec l'ornithine, à la formation de la citrulline, et celui des pyrimidines où, avec l'aspartate, il conduit à la formation de l'uréidosuccinate. L'activité ou la synthèse des enzymes de ces deux séquences est régulée par les produits terminaux : arginine et UTP. L'exemple du carbamoylphosphate est loin d'être unique et la difficulté qui naît, pour la régulation de ces biosynthèses, de la participation des métabolites produits à 2 séquences, est souvent résolue par l'existence d'enzymes indépendants pourvoyant chacun des chemins en métabolite commun. Lacroute *et al.*, en 1965, ont montré que cette situation existe pour la levure. Au départ de *S. cerevisiae*, ces auteurs ont obtenu 3 types de mutants dont les mutations affectent des locus non liés *cpa*₁, *cpa*₂, *cpu*. Deux d'entre eux, *cpa*₁ et *cpa*₂, déterminent la synthèse de la carbamoylphosphate synthétase intégrée à la séquence de synthèse de l'arginine (*cpu*, celle de l'enzyme spécifique des pyrimidines). Chacune de ces deux mutations provoque une déficience en CPase et elles se complètent *in vivo*, alors qu'*in vitro*, une complémentation par-

tielle peut être obtenue par le mélange des extraits des deux types de mutants. L'expérience n'a pas permis, jusqu'à présent, de montrer s'il s'agit de deux étapes enzymatiques catalysées par deux enzymes déterminés par cpa_1 et cpa_2 ou d'une seule étape catalysée par un enzyme polymérique.

C'est l'existence de ces mutants qui a permis de montrer l'intégration de chacun de ces enzymes dans des circuits de régulation différents. La synthèse de la CPase, intégrée au chemin de synthèse de l'arginine, est réprimée à raison de 30 % par l'addition au milieu de culture de 100 μ g de L-arginine/ml. Ces conditions de croissance n'affectent pas la vitesse de synthèse de l'autre CPase, qui n'est que faiblement réprimée par la présence dans le milieu de culture de 100 μ g d'uracile/ml; son activité est, par contre, sujette à une rétroinhibition importante par l'UTP (90 % pour 5×10^{-3} M en UTP).

Aucune de ces mutations ne conduit, seule, à un phénotype auxotrophe, les deux types de mutants - cpa et cpu - croissent en milieu minimum et il faut la présence simultanée de cpa et de cpu pour provoquer une double exigence en arginine et pyrimidine. Cela signifie que le carbamylphosphate synthétisé par chacun de ces systèmes est utilisable par l'autre et qu'il n'y a donc pas de compartimentation dans la cellule à ce niveau. Ceci distingue la levure de *N. crassa* où, s'il y a bien deux enzymes, le carbamylphosphate synthétisé par l'un ne peut être utilisé dans le chemin auquel est intégré l'autre enzyme (Davis : 1963).

La régulation de synthèse de la CPase dans *E. coli* est plus complexe, car un seul enzyme existe fournissant le métabolite aux deux séquences (Pié-rard, Wiame : 1964). Ceci, qui pourrait être considéré comme une imperfection, est corrigé par une régulation très élaborée.

La synthèse de l'enzyme est partiellement réprimée par chacun des produits terminaux arginine et uracile, leur action étant cumulative; la présence en excès de l'un seulement des corépresseurs permet toujours un apport suffisant pour l'autre chemin métabolique. De plus, cet enzyme est inhibé par le pool de nucléotides pyrimidiques, plus précisément par l'UMP. Une première analyse avait fait croire que l'activité peut être inhibée à 60 % par cet effecteur - une inhibition totale par l'UMP aurait d'ailleurs coupé l'alimentation

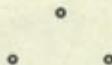
du chemin de l'arginine (Piérard *et al.*: 1965). Une étude plus poussée a permis de montrer que l'UMP à 5×10^{-3} M peut effectivement provoquer une inhibition de 96 % de l'activité de l'enzyme. Mais, cet effet peut être partiellement levé par l'ornithine et ce n'est qu'en présence de cet acide aminé que l'inhibition est limitée à 60 % (Piérard : 1966). Ce contrôle d'activité de la carbamoylphosphate synthétase par des effecteurs allostériques antagonistes permet un flux harmonieux de métabolite vers les deux synthèses d'arginine et de pyrimidines.

Si la nature du donneur d'azote dans la réaction de synthèse du carbamoylphosphate a été controversée, il semble actuellement admis que la glutamine est le donneur physiologique dans les trois microorganismes cités et la réaction est donc catalysée dans les trois cas par une glutamine carbamoylphosphate synthétase.

E. coli, *S. cerevisiae* et *N. crassa* montrent une complexité croissante de leur organisation biologique; les mécanismes utilisés par ces organismes pour le contrôle de la synthèse du carbamoylphosphate peuvent être supposés représenter trois étapes dans l'évolution. Il n'est cependant pas évident que tous les mécanismes d'un organisme plus évolué sont, eux aussi, plus "évolués", mais, cette restriction mise à part, la séquence : 1 enz → 2 enz → 2 enz + compartimentation, semble correspondre à la réalité d'une évolution. Si cela est, nous devons considérer qu'il est plus intéressant pour la cellule de synthétiser deux enzymes à contrôle simple plutôt qu'un seul à contrôle complexe, même si cette situation peut nous paraître, à nous, peu économique.

Parmi les métabolites intermédiaires de la séquence de synthèse de l'arginine, l'ornithine jouit d'une situation particulière. Elle est en effet le point de départ de la synthèse de substances telles que putrescine, spermine et spermidine. La putrescine résulte de la décarboxylation de l'ornithine et la synthèse de la spermidine et de la spermine se fait au départ de putrescine avec l'intervention d'un dérivé de la S-adenosyl-méthionine. Spermine et spermidine existent en concentration variée dans de nombreux tissus animaux. La répartition parmi les microorganismes semble fort diverse; il apparaît que la concentration est plus élevée dans les G^- que dans les G^+ , faible dans les levures (voir revue par Tabor *et al.*: 1961). Le rôle de ces polyamines est mal connu, mais on les suppose intervenir en de nombreux endroits : les bactéries

halophiles sont protégées, en milieu hypotonique, par les polyamines; la spermidine inhibe le gonflement spontané des mitochondries; les trois produits aminés sont présents dans de nombreuses préparations d'acides nucléiques et il y a toutes raisons de croire que ces polyamines ont un effet stabilisateur sur les acides nucléiques et en particulier sur les ribosomes (Cohen, Lichtenstein : 1960).



PASTRA S'IRUANG

CHAPITRE VI

PERMEABILISATION DES CELLULES

- LA NYSTATINE -

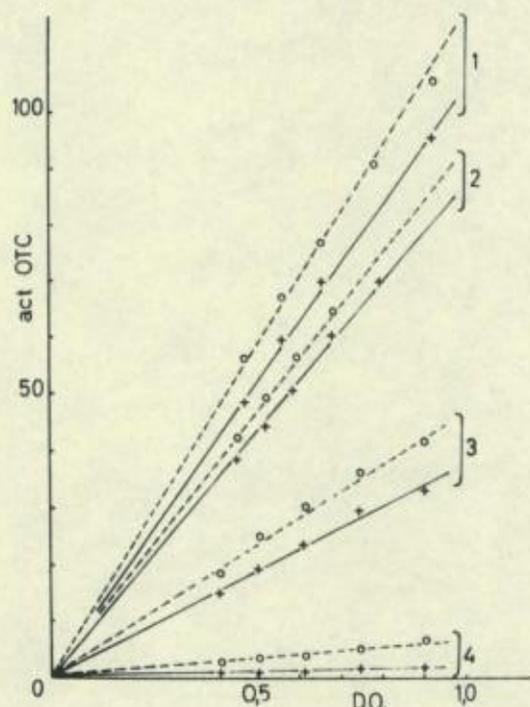
L'utilisation, pour le dosage d'enzymes, de cellules perméabilisées est courante avec *E. coli*, mais cette technique est beaucoup plus rarement appliquée à la levure. Le toluène, employé pour la perméabilisation des bactéries, est peu efficace contre la levure et exige un temps d'action très long (Kaplan : 1954). Des détergents ont parfois été utilisés avec succès - le cetavlon, par exemple (Davies : 1956) - mais nous avons préféré un agent perméabilisant dont l'action est plus spécifique : la nystatine.

La nystatine est un antibiotique de nature polyénique produit par *Streptomyces noursei*. Les premières études de Lampen (1957) attribuaient l'inhibition de croissance des levures à l'effet de l'antibiotique sur la glycolyse et la respiration. Cette inhibition résulte de la libération d'ions et, plus tard, de cofacteurs nécessaires à ces métabolismes et elle peut être contrebalancée par l'addition de ces ions dans le milieu (Marini *et al.* : 1961). La nystatine agit donc par perméabilisation de la membrane cytoplasmique, permettant la libération de métabolites de faible poids moléculaire; elle est sans action sur l'activité des enzymes ou séquence de réactions essayées "*in vitro*". L'antibiotique est actif sur les champignons et sur certaines algues, mais totalement inactif sur les bactéries; il se fixe spécifiquement sur la membrane cytoplasmique de ceux-là, alors que celles-ci n'en fixent pas du tout. On sait qu'il n'y a pas interférence avec la synthèse de cette membrane sans que l'on ait pu préciser jusqu'à présent le site et le mode exact de l'action (Kinsky : 1962^{a, b}).

L'incubation de cellules de levure en présence d'antibiotique polyénique permet donc la libération dans le milieu de molécules d'autant plus grosses que le temps d'action est plus long, sans pour autant qu'il y ait sortie de protéines. Une cellule ainsi traitée se comporte donc comme un agrégat

de matériel cellulaire enfermé dans une membrane semipermeable ayant perdu toute spécificité quant au transport actif et au sens de passage des petites molécules. Des substrats d'enzymes peuvent ainsi pénétrer librement dans la cellule, des produits de réaction en sortir et ce matériel est adéquat pour l'essai de certaines activités enzymatiques "in vitro". Dans une suspension de cellules perméabilisées, les protéines se trouvent localement à une concentration égale à celle existant dans la cellule.

L'emploi de cellules perméabilisées pour un dosage enzymatique n'est justifiable que pour autant que les résultats ainsi obtenus soient identiques ou comparables à ceux obtenus par mesure d'activité en extrait, préparé au départ de la même suspension cellulaire.



- 1 : argR cultivée en milieu minimum
- 2 : argR cultivée en milieu minimum + 200 µg L-arginine/ml
- 3 : souche sauvage cultivée en milieu minimum
- 4 : souche sauvage cultivée en milieu minimum + 200 µg L-arginine/ml

Figure 2 : Taux différentiel de synthèse de l'OTC, dans des souches répressible et non répressible, mesuré en cellules perméabilisées (trait plein) et en extrait (trait interrompu).

T A B L E 2

Activité spécifique d'OTC mesurée en extrait
et en cellules perméabilisées.

<u>SOUCHES</u>	<u>GENOTYPE</u>	ACTIVITE SPECIFIQUE OTC Milieu de culture [∇]				% REPR.	
		<u>M.am</u>		<u>M.am + Arg</u>		<u>ext.</u>	<u>perm.</u>
		<u>ext.</u>	<u>perm.</u>	<u>ext.</u>	<u>perm.</u>		
1278b	sauvage	47	37	2,6	1	95	97
3581d	"	40	32	4,8	1	91	97
BJ102	argR	83	77	76	73	8	5
MG168	P _{arg} ⁻	41	38	25	21	39	45

[∇] Culture agitée à 29°C,

M.am : milieu minimum,

M.am + Arg : milieu minimum + L-arginine 200 µg/ml.

Les valeurs de la table 2 et la figure 2 montrent que cette technique est, ici, parfaitement licite. Les écarts entre les activités spécifiques mesurées en extrait et sur cellules perméabilisées sont de l'ordre de 20 % et sont dus à l'existence d'un phénomène de séquestration de l'activité d'OTC par une protéine ligande (voir page 94). L'importance relative de cette séquestration est plus grande - elle peut atteindre 80 % - dans des cellules sauvages (r^+) ayant crû en présence d'arginine. Ces écarts ne gênent cependant pas l'interprétation des résultats et on peut même estimer que les valeurs obtenues en cellules perméabilisées sont un reflet plus fidèle de l'état physiologique réel de la cellule.

REPRESSIBILITE DE L'OTC

Parmi les enzymes de la biosynthèse de l'arginine dans *S. cerevisiae*, l'OTC est, comme c'est aussi le cas dans *E. coli*, l'enzyme dont l'activité spécifique, mesurée "in vitro", est la plus élevée; elle est aussi parmi ceux dont la synthèse est la plus répressible par l'arginine.

Si l'activité spécifique de l'OTC peut varier d'une souche à l'autre et, pour une même souche, en fonction des conditions de croissance, elle est, pour la plupart des cellules utilisées dans ce travail, de l'ordre de 35 unités après croissance en milieu minimum et de 2 unités après croissance dans le même milieu additionné d'arginine (200 $\mu\text{g/ml}$). L'intensité de la répression, exprimée en pourcentage d'inhibition du taux de synthèse dû à la présence d'arginine exogène, est de 90 à 95 %. Toutes ces valeurs, ainsi que les suivantes, ont été obtenues, sauf spécification contraire, dans des suspensions de cellules perméabilisées à la nystatine.

Le taux de synthèse de l'OTC dans une levure sauvage, en absence d'arginine exogène, est loin de correspondre au maximum possible; on peut tendre vers celui-ci en cultivant, en chémostat, un mutant arg^- , la vitesse de croissance y étant limitée par le flux d'arginine. Un résultat semblable peut être obtenu par culture confinée d'une souche partiellement exigeante en arginine, dans un milieu dépourvu de cet acide aminé. Dans ce dernier cas, on peut atteindre des valeurs de l'ordre de 220 unités d'activité pour l'OTC, c'est dire que

dans les cellules prototrophes, l'arginine endogène impose une répression importante (de l'ordre de 85 %).

Dans la mesure où l'on estime que l'arginine est le corépresseur de la synthèse de l'OTC - ou en tout cas, un précurseur de ce corépresseur - on est en droit de s'attendre à ce que toute condition qui diminue la concentration intracellulaire en arginine permettra une dérégulation et que celle-ci sera d'autant plus poussée que la concentration du corépresseur tendra vers zéro. C'est le cas en chémostat et dans un mutant auxotrophe partiel. Cette condition est aussi réalisée lorsqu'une souche exigeant l'arginine est mise en culture confinée dans un milieu où cet acide aminé est en concentration limitante, la phase stationnaire y est alors déterminée par l'épuisement de l'aliment limitant. A ce moment, il est évident que la concentration intracellulaire d'arginine est extrêmement faible sinon nulle et on doit s'attendre à une dérégulation importante des enzymes dont la synthèse est réprimée par l'arginine. Les résultats de la table 3 sont loin de confirmer cette vue : ce sont les valeurs moyennes des activités spécifiques d'OTC mesurées dans des souches arg⁻ ayant crû dans un milieu minimum additionné de 6, 8 ou 10 µg de L-arginine/ml, la récolte des cellules étant effectuée alors que la croissance a cessé.

On voit tout d'abord que dans aucune souche, et quelle que soit l'activité enzymatique absente, on n'atteint, pour l'OTC, une activité spécifique aussi élevée que dans une souche bradytrophe ayant crû en milieu minimum. Cela pourrait s'expliquer par le fait que, dans l'auxotrophe, l'arginine faisant défaut, la synthèse de l'OTC y est fortement freinée; on ne s'attend cependant pas à des écarts aussi importants. Cette remarque ne s'applique d'ailleurs plus lorsque l'auxotrophe est cultivé en chémostat : en imposant à un double mutant ar5 - ar7 (3484a) un taux de croissance de 0,1/h (ce qui correspond à un temps de génération de 6 - 7 heures en culture confinée), on atteint pour l'OTC, mesurée en cellules perméabilisées, une activité spécifique de 22 unités, valeur anormalement faible compte tenu du pool d'arginine trouvé dans ces cellules (31 nM/mg poids sec).

Reste un point qui, peut-être, est essentiel à savoir, que l'arginine est endogène dans les mutants partiels, toujours exogène pour les auxotrophes.

T A B L E 3

Activité spécifique d'OTC dans des souches exigeant l'arginine
ayant crû dans un milieu où cet acide aminé est limitant

MUTATION		CULTURE [∇]	ACT. SPEC. OTC ^{∇∇}	ARG INTRA- CELLULAIRE ^{∇∇∇}
Locus	Enzyme			
ar6 - ar5	Kinase - Déshydrogénase	épuis. arg	82	
ar5	Déshydrogénase	épuis. arg	74	
ar8	Transaminase	épuis. arg	116	
ar7	Transacétylase	épuis. arg	95	
ar3	OTC		--	
ar1 - ar10	AS synthétase	épuis. arg	35	
ar4	Lyase	épuis. arg	17	
ar5 - ar7		chémostat $\mu = 0,1/h$	22	0,031
<u>auxotrophes partiels</u>				
	MG406 (ar7)	mil. min.	227	
	MG409 ?	mil. min. g = 6,5 h		0,015
	4104b ?	mil. min. g = 6,5 h	216	

[∇]Cultures : épuis. arg : la culture est faite en milieu minimum auquel sont ajoutés selon le cas 6, 8 ou 10 μg de L-arginine/ml; les cellules sont récoltées alors que la croissance a cessé,

chémostat : milieu minimum + 8 μg L-arginine/ml; le flux choisi impose à la culture un μ (taux de doublement = taux de dilution) de 0,1 par heure, ce qui équivaut à un g (en culture confinée) de 6,7 h.

^{∇∇}Activité spécifique : μM citrulline/h/mg de protéine à 37°C; toutes les mesures sont faites en cellules perméabilisées.

^{∇∇∇} $\mu\text{M}/\text{mg}$ poids sec (Ramos , et al., en préparation).

Mais, peut-on voir là, la cause des différences de dérégulation observées ? Il faudrait pour cela admettre que l'arginine exogène peut aisément donner naissance au corépresseur alors que l'arginine endogène ne jouerait ce rôle qu'avec peu d'efficacité puisque pour des pools comparables et des vitesses de croissance identiques, un auxotrophe cultivé en chémostat et un mutant partiel montrent des activités spécifiques fort éloignées (table 3). Cela pourrait être réalisé en supposant soit des chemins d'utilisation différents de l'acide aminé selon son origine, soit en considérant 2 pools d'acides aminés, métaboliquement distincts. La première hypothèse est assez peu vraisemblable, mais l'existence de 2 pools d'acides aminés a été suggérée à plusieurs reprises tant dans les cellules de mammifères (Kipnis *et al.* : 1961), que dans *Neurospora* (Matchett, Demoss : 1964), dans la levure (Halvorson, Cowie : 1961) et dans *E. coli* (Britten, McClure : 1962). Sans préciser s'ils sont physiquement distincts, la plupart de ces auteurs proposent l'existence d'un pool "expandable" et d'un pool métabolique ou interne, l'importance du premier étant fonction de la concentration d'acides aminés exogènes. Dans le cas particulier du tryptophane dans *N. crassa*, l'acide aminé endogène est utilisé préférentiellement pour la synthèse des protéines et est aussi plus efficace pour la répression de la tryptophane synthétase (Matchett, Demoss : 1964). Dans le même sens, de Robichon (1967) estime que, pour la synthèse de l'aspartokinase et de l'homosérine déshydrogénase dans *Saccharomyces cerevisiae* "... la répression provoquée par les acides aminés exogènes n'est pas très efficace". Ces conclusions sont l'inverse de celle à laquelle nous avons été amenés !

Cette notion de la multiplicité des pools est d'ailleurs assez troublante et dans tous les cas où elle a été présentée, cette hypothèse est en quelque sorte amenée de façon négative, en ce sens que des résultats pourraient être expliqués par la présence de 2 pools, mais cette existence est, pour le moment, formelle, et aucune preuve directe n'en a jamais été donnée. En ce qui concerne la répression de synthèse d'enzymes biosynthétiques, on peut tout aussi logiquement admettre qu'elle dépend de l'importance du pool de réserve que du pool métabolique - la cellule sera simplement plus "prévoyante" dans un cas que dans l'autre !

L'examen des résultats donnés dans la table 3 fait apparaître une seconde anomalie, à savoir que l'épuisement de l'arginine exogène ne provoque pas la même dérèpression de l'OTC dans tous les auxotrophes étudiés : les écarts entre les activités spécifiques mesurées dans les divers mutants peuvent être très importants. Quelles que soient les critiques que l'on puisse émettre à l'encontre de ce type d'expérimentation, il est évident que, traitées de la même façon, toutes les souches devraient montrer la même dérèpression. S'il y a une relative homogénéité dans les valeurs d'OTC obtenues pour plusieurs souches mutées dans le même gène, l'hétérogénéité est manifeste lorsque les mutations affectent des locus différents. Il apparaît cependant que les dérèpressions les plus faibles sont obtenues dans les souches ayant perdu l'activité de l'AS synthétase ou de la lyase. C'est là ce à quoi on pourrait s'attendre si l'ornithine était, elle aussi, impliquée dans la répression de synthèse de l'OTC. En effet, l'ornithine peut s'accumuler dans ces mutants, alors que sa concentration sera faible dans les souches ayant perdu une autre activité enzymatique exigée pour la synthèse de l'arginine. Cependant, on a vu que le double mutant ar5 - ar7, cultivé en chémostat, ne subit qu'une dérèpression insignifiante. C'est dire que l'importance relative des pools d'arginine et d'ornithine et le rôle respectif de ces deux acides aminés dans la répression de synthèse de l'OTC, sont, pour le moment, loin d'être éclaircis. Cet aspect de la répression est actuellement à l'étude dans ce laboratoire (Ramos *et al.*, en préparation).

Devant de tels résultats, on pourrait même se demander si l'arginine est réellement corépresseur de la synthèse de l'OTC. L'un des moyens de vérifier ceci est de déterminer la relation existant entre la concentration intracellulaire de l'arginine et le taux de répression de l'OTC, ce qui est classiquement réalisé par la culture, en chémostat, d'un auxotrophe. Cette technique est cependant laborieuse et offre de nombreux aléas. C'est l'existence de perméases, concentrant le substrat exogène, qui impose l'utilisation du chémostat, et en absence de mécanisme de transport actif, la concentration intracellulaire est, dans une culture confinée, beaucoup plus directement proportionnelle à la concentration externe.

La figure 3 montre la relation existant entre la concentration d'ar-

ginine dans le milieu et l'activité spécifique et le taux de répression de l'OTC dans une souche bradytrophe dont la pénétration de l'arginine est altérée. Quelle que soit la complexité du système, ces résultats montrent que l'arginine est le - ou l'un des - corépresseur(s) de la synthèse de l'OTC, sinon qu'elle en est le précurseur puisqu'on ne peut, pour le moment, confirmer ou infirmer l'idée que le corépresseur efficace soit l'acide aminé activé, hypothèse qui a été avancée pour *N. crassa*.

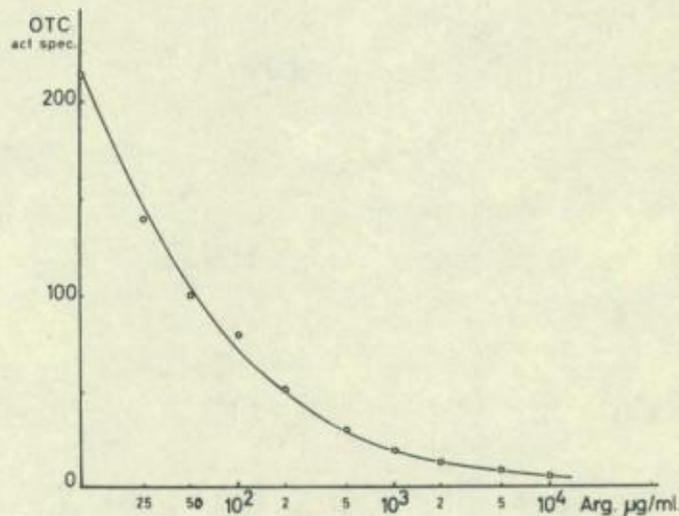


Figure 3 : Activité spécifique de l'OTC en fonction de la concentration d'arginine dans le milieu de culture, dans la souche 4104b, auxotrophe partiel et perméase⁻ pour l'arginine.

Un mutant arg_{10} (argininosuccinase négatif) de *Neurospora crassa* accumule de l'argininosuccinate (AS). Cette accumulation est accrue par dérépression des enzymes de la séquence, par exemple lorsque le champignon est mis en croissance dans un milieu où la concentration d'arginine est limitante. La concentration intracellulaire d'AS peut aussi être augmentée en présence de concentration non limitante d'arginine exogène, mais à condition d'ajouter, dans le milieu, la citrulline, substrat de l'AS synthétase (Nazarío : 1967^a). La citrulline n'empêche pas la pénétration de l'arginine; ce-

pendant, la présence simultanée, dans le milieu de culture, de ces deux acides aminés provoque une diminution de la vitesse de croissance et une dérépression de l'OTC. L'argininosuccinate est un inhibiteur compétitif de l'arginine pour l'arginyl-tRNA synthétase - sans pour autant être activé (Nazario : 1967^b). Un accroissement du rapport (AS)/(Arg) doit donc provoquer une diminution de la concentration d'arginyl-tRNA. C'est en supposant que ce dernier composé est le corépresseur vrai de la synthèse des enzymes de la chaîne de l'arginine, que l'auteur explique la dérépression de l'OTC dans des conditions où le pool d'arginine est important.

Cette conclusion est parfaitement logique. Elle ne tient cependant pas compte du fait que si l'AS peut se comporter comme analogue de l'arginine au niveau de la synthétase, il pourrait aussi le faire au niveau de l'aporépresseur et donner lieu aux mêmes résultats, au cas où l'arginine serait le corépresseur efficace.

De plus, certaines anomalies apparaissent si, reprenant les données des graphiques publiés (Nazario : 1967^a), on dresse le tableau suivant :

ADDITION AU MILIEU DE CROISSANCE	ARG μM/mg	AS μM/mg	OTC ACT. SPEC.	REND. DE CROIS. mg après 63 h
Arg limitant 0,5 mM	20	200	50	40
Arg 5 mM + citrulline 2,5 mM	70	180	50	20
Arg non limitant 5,0 mM	50	25	20	60

On voit ainsi que le rendement de croissance ("growth response") est de 40 mg en présence d'arginine limitant et 20 mg seulement en présence de deux acides aminés, alors que les rapports (AS)/(Arg) sont respectivement de 10 et 2,57 dans ces conditions. Or, si la limitation de la vitesse de croissance n'est due qu'à l'effet inhibiteur de l'AS, on devrait s'attendre, pour le moins, au résultat inverse. Une hypothèse pourrait cependant être avancée qui éliminerait cette contradiction, à savoir l'existence de 2 pools d'acide aminé en présence d'arginine exogène non limitant; l'un des deux pools seulement serait efficace comme substrat de la synthétase et contiendrait moins de 25 % de l'arginine total.

Dans le cas de l'OTC, l'identité des activités spécifiques obtenues dans les deux conditions de croissance, ne peut s'expliquer que si ces valeurs représentent une dérépression totale, une vitesse de synthèse différentielle maximale, ce qui, évidemment, n'est pas exclu.

Ces expériences ont été répétées avec *Saccharomyces cerevisiae*, en utilisant la souche MG542 (lyase⁻). Cultivée en présence d'arginine en concentration non limitante, la répression de la synthèse de l'OTC est totale (activité spécifique ≈ 1 u) qu'il y ait, ou non, ajoutée de citrulline (1000 $\mu\text{g/ml}$). (Pour éviter l'effet inhibiteur de NH_4^+ sur la pénétration de la citrulline, la culture a été réalisée dans un milieu dépourvu de cet ion et où le glutamate est la source principale d'azote).

Ces essais ne confirment absolument pas, pour *S. cerevisiae*, les résultats obtenus avec *Neurospora*. Il est cependant évident que ceci ne préjuge pas la nature du corépresseur vrai et n'enlève pas à l'arginyl-tRNA la possibilité de jouer ce rôle pour le contrôle de la synthèse des enzymes de la séquence menant à l'arginine.

Souches de *Saccharomyces cerevisiae*

Tous les résultats présentés au paragraphe précédent ont été obtenus à partir de souches isogènes; les auxotrophes, complets ou partiels, dérivent

tous d'une même souche mère et les croisements, lorsqu'ils étaient nécessaires, ont été effectués entre souches isogènes. Lorsque la chose était impossible, on s'est cependant efforcé de n'utiliser que des cellules dont le comportement, en ce qui concerne l'objet de cette étude, est très proche. Cette remarque est essentielle et valable aussi pour la suite de l'exposé. (L'origine et la filiation de toutes les souches utilisées sont résumées dans le chapitre relatif aux : Matériel et Méthodes).

Il est en effet apparu au cours de ce travail que des résultats variables ne peuvent être obtenus et que des comparaisons ne peuvent être tentées qu'entre souches isogènes sous peine, éventuellement, de conduire à des conclusions aberrantes. Des cellules, que leur dénomination pourrait faire croire proches, montrent des niveaux d'enzymes fort différents; dans YF (+) et YF (-), toutes deux dérivées d'une Yeast Foam diploïde, on trouve respectivement 100 et 35 u d'activité d'OTC après croissance en milieu minimum. Les études relatives aux systèmes de transport actif des acides aminés ont fait apparaître la même hétérogénéité parmi les lignées de *S. cerevisiae*, la même nécessité d'utiliser des souches isogènes (Grenson *et al.*: 1966).

De tels exemples pourraient être multipliés. D'origines fort diverses, on est en droit de supposer que toutes ces souches ont accumulé un certain nombre de mutations qui les rendent actuellement peu semblables. La définition des espèces est d'ailleurs assez large et les critères taxonomiques utilisés permettent l'inclusion de souches dissemblables à d'autres points de vue. La même situation apparaîtrait probablement dans la plupart des espèces microbiennes dès lors qu'elles seraient l'objet de recherches intensives. N'est-on pas aussi fondé à penser que le nombre de variétés et de souches dans une espèce microbienne sera d'autant plus grand que les générations auront été plus nombreuses, ce qui est certainement le cas pour des organismes utilisés par l'homme depuis fort longtemps - volontairement ou non. La plupart des souches industrielles dont dérivent les souches de laboratoire sont d'ailleurs diploïdes sinon polyploïdes et souvent aneuploïdes : cet état permet certainement l'accumulation de mutations récessives et n'affectant pas la vitesse de croissance.

Les variations quantitatives de l'OTC, d'une souche à l'autre, sont

d'ailleurs difficiles à comprendre car elles ne semblent pas être fonction ni du gène de structure de l'enzyme, ni des gènes de régulation.

T A B L E 4

Activité spécifique et % de répression de l'OTC dans :

1. Tétrades issues du croisement de souches isogènes MG676 (ar3) x 3501c (argRI)

	a			b			c			d		
	M.am	M.am + arg	% R									
3987				90	75	17				39	2	95
3988	83	71	14	86	76	12						
3989	40	2	95				84	68	19			
3990				92	72	22				41	2	95

2. Tétrades issues du croisement de souches non isogènes DE14 (ar3) x 1422c (argRI)

1538							18	1	93	47	1	98
1540				107	74	31	173	155	12			
1542				113	8	93				122	119	2
1544				75	56	25	38	3	92			

Les résultats repris dans la table 4 ont été obtenus dans des ségrégeants du croisement (argR x ar3), les haploïdes conjuguants étant soit non isogènes (1422c x HM6), soit isogènes (3501c x MG676). Toutes les souches prototrophes issues d'un croisement portent ici le même gène de structure pour l'OTC et, pour les répressibles, le même

gène $argR^+$. Cependant, on voit que, parmi les souches $argR^+$, le niveau d'enzyme peut varier de 18 à 50 et même 113 u d'activité lorsque les ségrégeants sont issus d'un croisement entre souches non isogènes, alors que l'homogénéité des résultats est très satisfaisante - 39 à 41 u - pour les ségrégeants $argR^+$ issus du croisement entre souches isogènes. Si les écarts relatifs sont moindres parmi les souches peu répressibles, il n'en subsiste pas moins une hétérogénéité importante dans le premier cas - 75 à 173 u - comparée à l'homogénéité du second cas - 83 à 92 u -. Il serait évidemment intéressant et important, devant une telle situation, de vérifier les concentrations intracellulaires d'arginine.

Si ces variations rendent difficile l'interprétation de certains résultats, elles peuvent aussi parfois conduire à des conclusions erronées. Ainsi le dosage d'OTC dans des diploïdes homo- et hétérozygotes pour arg^+ , résultat de la conjugaison de souches non isogènes, nous avait d'abord fait croire à une indépendance de l'activité spécifique de l'OTC par rapport au nombre de gènes de structure; les résultats obtenus en utilisant des souches isogènes montrent qu'il n'en est rien (voir : dosage des gènes, page 83).

Dans notre cas, la dissonance la plus flagrante apparaît certainement dans le travail de Dixon et Rose (1964, 1966). Ces auteurs se proposent d'étudier l'influence de la biotine sur la synthèse de l'OTC. Ils utilisent pour ce faire une souche de *S. cerevisiae* dont les caractéristiques génétiques ne sont pas autrement précisées. Dans cette levure, l'arginine exogène est sans effet sur le niveau d'enzyme, lorsque les cellules ont crû en présence d'une concentration optimale de biotine, mais provoque une diminution nette de la synthèse de l'enzyme lorsque la concentration de la vitamine dans le milieu de culture est suboptimale. De plus, la L-ornithine induit la synthèse de l'OTC dans des cellules ayant crû dans un milieu déficient en biotine, mais réprime cette synthèse si ce même milieu est additionné de norbiotine. La norbiotine seule permet d'ailleurs des activités sensiblement supérieures - 2 à 3 fois - à celles présentes après croissance en présence de biotine. Les autres enzymes de la séquence biosynthétique de l'arginine ne semblent subir aucune de ces influences.

En résumé, dans cette souche de *S. cerevisiae* "... il est clair que

le contrôle de la synthèse de l'OTC dans la levure est indépendant de celui de la synthèse des autres enzymes de la séquence ..." (Dixon, Rose : 1966) et que l'OTC est, dans des conditions "normales" de croissance - concentration optimale en biotine -, inductible par l'ornithine et insensible à l'arginine.

Sans vouloir se livrer à une exégèse complète de ce travail, quelques remarques s'imposent cependant. D'un point de vue méthodologique tout d'abord, les graphiques présentés ne permettent pas de décider de la nature exponentielle de la croissance; bien au contraire, il semble que, même en présence d'une concentration optimale de biotine, la croissance soit linéaire, ce qui est très difficile à comprendre. Les conditions imposent d'ailleurs une "vitesse de croissance" anormalement faible, le temps de doublement étant de 10 à 15 h. Dans ces conditions, l'état physiologique des cellules varie constamment et les activités spécifiques des enzymes sont fortement dépendantes de l' "âge de la culture". On observe des variations du simple au double pour l'OTC et jusqu'au quintuple pour d'autres enzymes. Enfin, les conclusions supposent pour la synthèse de l'OTC une réaction nécessitant la biotine, ce qui revient à supposer un mode de synthèse particulier pour cette protéine enzymatique. C'est là une conclusion à laquelle il est difficile de souscrire et il est probable qu'elle résulte du choix malheureux qui a été fait de l'OTC comme objet de l'étude. Cet enzyme peut en effet montrer des variations d'activité importantes après croissance en présence d'acides aminés n'ayant aucun rapport structurel avec l'arginine. On peut donc supposer que toute condition affectant la concentration intracellulaire de ces acides aminés affectera aussi le niveau d'enzyme. Les rôles précis de la biotine n'étant pas toujours connus, une déficience en cette vitamine pourrait se traduire par des variations du pool d'acides aminés.

Quelle que soit l'interprétation donnée à ces résultats, il n'en demeure pas moins que des dissemblances importantes apparaissent avec notre travail. Ceci ne doit cependant pas nous étonner outre mesure et il suffit de rappeler que *E. coli* K-12 et B sont loin d'être comparables quant à leur régulation de la biosynthèse de l'arginine. Dans le premier, ainsi que dans *E. coli* W, l'arginine réprime la synthèse des enzymes, alors qu'elle induit légèrement celle-ci dans la souche B (Gorini *et al.*: 1961; Gorini : 1963; Jacoby, Gorini : 1969).

Nous pouvons nous résumer en disant que, dans les souches de *S. cerevisiae* que nous avons utilisées, la répression imposée par l'arginine exogène est de l'ordre de 90 à 95 %. Dans une souche sauvage, la vitesse de synthèse de l'OTC est loin d'atteindre le maximum possible - obtenu dans des mutants auxotrophes partiels en absence d'arginine exogène - l'arginine endogène y maintient donc une répression importante. Ces remarques distinguent la levure d'un autre *ascomycète*, *Neurospora crassa*, dans lequel l'activité spécifique de l'OTC est pratiquement insensible à la présence d'arginine dans le milieu de culture (5 mM) et la dérpression ne peut être montrée que dans des auxotrophes arg^- , dont la croissance est limitée par l'arginine (Davis : 1965). Encore, dans ces conditions, les variations de niveau d'enzyme ne sont-elles que de 2 à 3 fois, soit une répression maximum de 65 % (Nazario : 1967^a).

A l'opposé, la vitesse de synthèse de l'OTC dans *E. coli* K-12 et W est très sensible à la concentration intracellulaire d'arginine et les variations du niveau d'enzyme sont importantes; elles sont du même ordre de grandeur que celles rencontrées dans *S. cerevisiae* après croissance confinée en milieu minimum supplémenté ou non d'arginine. Le milieu AF (Novick, Maas : 1961) provoque un appauvrissement relatif de l'arginine dans le pool d'acides aminés de *E. coli* et induit une forte dérpression. Il est à noter que ce même milieu est pratiquement sans effet sur les levures que nous avons utilisées. Enfin, la croissance en chémostat, limitée par l'arginine, d'un *E. coli* arg^- permet d'atteindre une vitesse de synthèse de l'OTC près de 1000 fois supérieure à celle existant lorsque cette synthèse est réprimée.

Il a été montré dans *E. coli* K-12 que la synthèse de l'ensemble des enzymes de l'anabolisme de l'arginine est sensible à la répression (Glansdorff, Sand : 1965). Dans *S. cerevisiae*, l'activité spécifique très faible de certains de ces enzymes en rend l'étude difficile; on a cependant pu montrer que, si les taux de répression sont divers, tous sont susceptibles de dérpression dans certaines conditions (Minet *et al.*, en préparation).

CHAPITRE VII

MUTANTS DE REGULATION

Analogues d'acides aminés

Les analogues structuraux de nombreux acides aminés inhibent la croissance des microorganismes; un analogue peut, à priori, interférer avec toutes réactions mettant en jeu la substance naturelle et certains d'entre eux sont incorporés dans les protéines en place de l'acide aminé homologue. La question de savoir s'il est ou non incorporé dans les protéines peut, en principe, être tranchée par l'examen des courbes de croissance obtenues en présence de l'analogue : une croissance linéaire résulte de la formation de substances cellulaires - plus précisément de protéines - enzymatiquement inactives, la quantité de protéines actives restant constante et égale à celle présente au moment de l'addition de l'antimétabolite (Munier, Cohen : 1956). Une croissance linéaire indique donc une incorporation de l'analogue d'acide aminé en quantité suffisante pour rendre inactive la majeure partie, sinon la totalité, des protéines enzymatiquement exigées pour la croissance. Les mécanismes de synthèse protéique n'étant pas spécifiques, il est difficile de supposer que cette incorporation ne se fait que dans quelques espèces polypeptidiques. L'accroissement de la masse des autres macromolécules doit, lui aussi, se faire linéairement dès lors que la machinerie impliquée dans leur synthèse reste constante. Il suffit donc que la synthèse protéique soit linéaire pour que la variation de masse - et de D.O. - en fonction du temps, le soit aussi.

Une croissance linéaire est cependant loin d'être le seul résultat possible de la présence d'un analogue d'acide aminé dans le milieu de culture, et il suffit pour s'en convaincre d'examiner les courbes expérimentales publiées à ce sujet. Des résultats intermédiaires peuvent être obtenus qui se rapprochent d'autant plus de la croissance linéaire que le pourcentage d'in-

corporation sera plus important, c'est-à-dire que la fraction inactive de protéines nouvelles sera grande. Ici encore l'examen des courbes de croissance permet, théoriquement, de déterminer la valeur de cette fraction.

Dans une croissance exponentielle, la variation de masse en fonction du temps est à chaque instant fonction de cette masse ce qui s'exprime par

$$\frac{dX}{dt} = kX$$

équation dont l'intégration, si k est constant, donne

$$X = X_0 e^{kt}$$

Lors d'une croissance linéaire, la masse cellulaire nouvellement formée est inactive et la variation de X en fonction du temps est définie par

$$\frac{dX}{dt} = kX_0$$

où X_0 est la masse cellulaire active au début de la croissance linéaire. A chaque instant, la masse totale est donc

$$X = X_0 kt + X_0$$

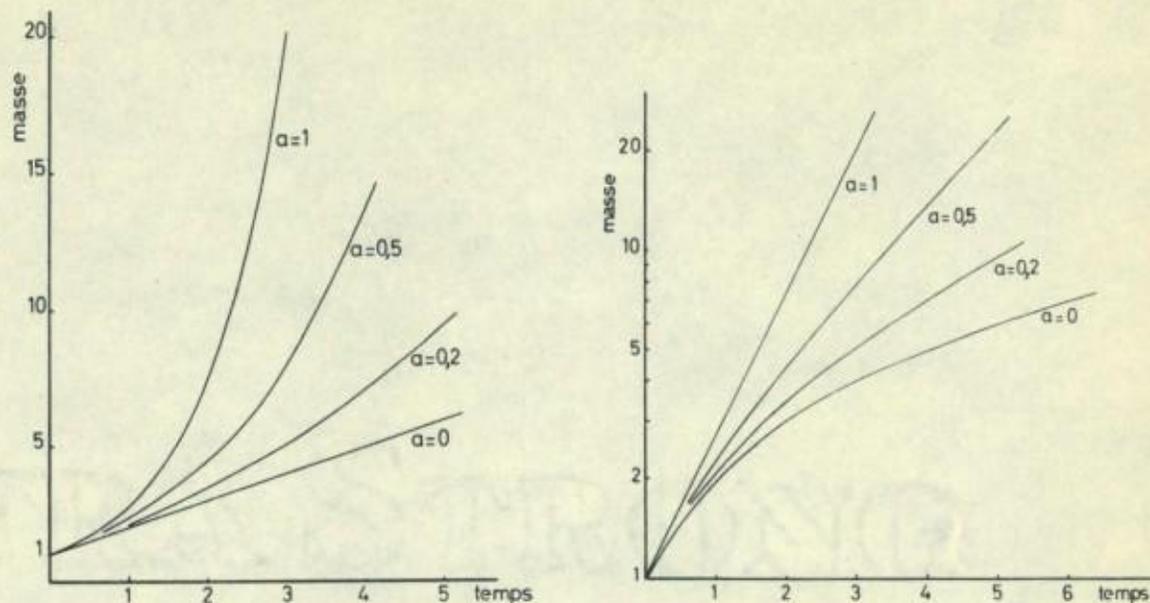
Si seule une fraction - α - du matériel formé est active, l'accroissement de la masse cellulaire en fonction du temps sera la somme d'un accroissement exponentiel et d'un accroissement linéaire qui peut s'écrire

$$\frac{dX}{dt} = k(1 - \alpha)X_0 + \alpha kX = kX_0 + \alpha k(X - X_0) \quad (1)$$

expression qui contient évidemment les 2 précédentes; la croissance est exponentielle si la totalité du matériel formé est active ($\alpha = 1$) et peut participer à la croissance, elle est linéaire si $\alpha = 0$.

L'intégration de (1) donne

$$X = X_0 \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} + \frac{1}{\alpha} e^{kat} \right)$$



Figures 4 : Courbes de croissance théorique (voir texte).

$\alpha = 1$: croissance exponentielle,

$\alpha = 0$: croissance linéaire,

$\alpha = 0,2$; $\alpha = 0,5$: croissance procédant à la fois des 2 modes.

La figure 4 montre l'expression graphique de cette équation pour différentes valeurs de α .

Il est évident que ces considérations ne sont valables que dans la mesure où la composition cellulaire reste constante, ce qui est le cas dans la levure en présence d'analogues d'acides aminés. Cohen, Halvorson et Spiegelman (1958) ont montré que, dans *Saccharomyces italicus* en présence de p-fluorophénylalanine 10^{-2} M, le taux de synthèse différentiel des protéines en fonction du poids sec est constant et identique à celui trouvé lors d'une croissance en absence d'analogues. Ceci pourrait cependant ne pas toujours être vrai. Ainsi, lorsque la synthèse protéique est complètement arrêtée, par l'actidione, par exemple, la masse cellulaire - mesurée par D.N. - peut encore être doublée, résultat, probablement, d'une synthèse importante de polysaccharides et, dans une moindre mesure, d'ARN. La synthèse résiduelle d'ADN est certainement négli-

geable pour des mesures de D.O. La constance des concentrations relatives des macromolécules pourrait donc être altérée lors de l'utilisation d'analogues ayant un effet poison, c'est-à-dire freinant l'activité de synthèse des protéines.

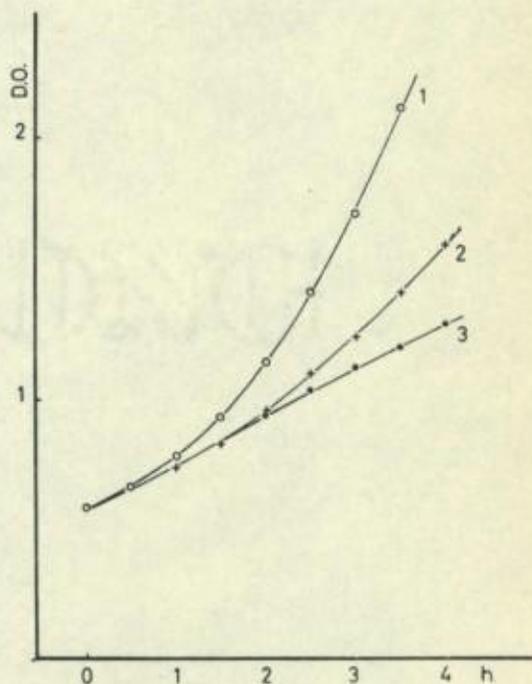
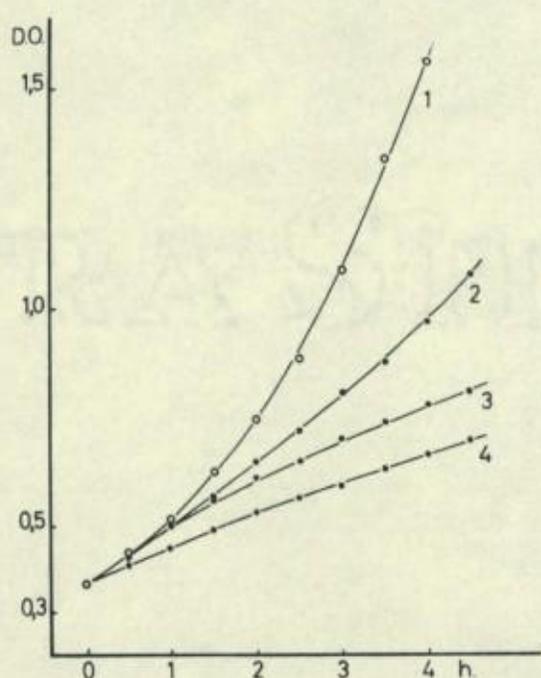
De toute façon, une croissance linéaire ne peut se prolonger pendant bien longtemps, en présence de p-fluorophénylalanine, si la masse s'accroît, le nombre de cellules reste, lui, constant, c'est dire qu'il y a accroissement de la taille des cellules (Cohen *et al.*: 1958). Il en résulte une diminution du rapport surface/volume de la cellule pouvant affecter l'efficacité des échanges cellulaires. (La comparaison avec les souches polyploïdes n'est pas valable ici, puisque les membranes contiennent, elles aussi, des protéines).

On trouve dans la littérature de nombreux exemples de croissance linéaire en présence d'analogues, mais aucun auteur n'a cependant attiré l'attention sur le fait que, pour un même organisme, les vitesses de croissance ne sont pas toutes identiques. Ceci est d'autant plus surprenant que le matériel participant à la croissance est rigoureusement identique dans chaque cas et que les milieux sont semblables, hormis la présence de l'analogue. Une interprétation plausible de ces différences pourrait être que tous les analogues ne sont pas manipulés également vite par les enzymes d'activation ou que les analogues activés sont inégalement incorporés : les différences ne sont pas quantitatives mais qualitatives, les enzymes actifs étant toujours présents en concentration relative égale à celle existant dans la cellule avant l'addition de l'antimétabolite.

Les figures 5 et 5' montrent les courbes de croissance obtenues pour *S. cerevisiae* en présence d'analogues d'acides aminés utilisés au cours de ce travail.

Il faut remarquer que dans aucun cas, la vitesse de croissance linéaire n'atteint le maximum possible : le temps de doublement(θ) minimum est de 1,44 fois le temps de génération de la croissance exponentielle. Une telle croissance peut être représentée dans un graphique aux coordonnées arithmétiques, par la tangente à la courbe exponentielle, tracée à l'instant de l'addition de l'analogue. Ce résultat ne peut pratiquement jamais être obtenu, il représente une situation idéale vers laquelle on pourrait tendre en empêchant

la réplication de l'ADN, cette molécule étant la seule douée de propriété autocatalytique. En effet, la vitesse de synthèse des polypeptides est directement proportionnelle à la quantité de mRNA, laquelle est, elle même, proportionnelle au nombre de gènes et ceci est applicable à toute la machinerie nécessaire à la synthèse protéique. Un dernier empêchement à l'obtention, en pratique, de la courbe linéaire théorique peut résulter d'un appauvrissement en acides aminés, conséquence d'une rétroinhibition ou d'une répression due à l'analogue. Dans l'un et l'autre cas, il y aura au cours du temps augmentation de la concentration relative de l'analogue et la vitesse de croissance va décroître jusqu'à atteindre la vitesse de croissance - linéaire - correspondant à une absence totale de l'acide aminé homologue.



Figures 5 et 5' : Croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.

Souche 1705d :

- 1) en milieu minimum,
- 2) idem + azétidine 100 µg/ml,
- 3) idem + DL-fluorophénylalanine
200 µg/ml,
- 4) idem + β-2-thiénylalanine
100 µg/ml

Souche 3581d :

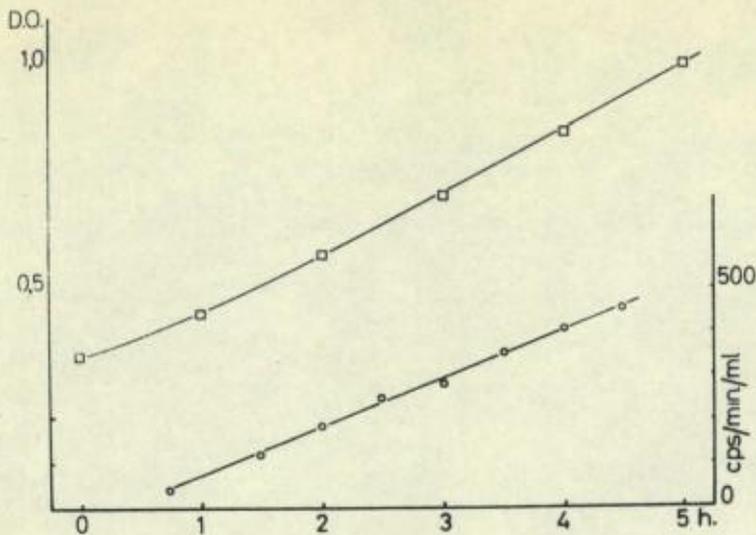
- 1) en milieu minimum,
- 2) idem + L-canavanine sulf. 5 µg/ml
- 3) idem + idem 10 µg/ml

Recherche de mutants de régulation

La canavanine est un analogue structural de l'arginine, qui inhibe la croissance de nombreux microorganismes; son incorporation dans les protéines a été montrée dans *Staph. aureus* (Richmond : 1959) et dans *E. coli* (Schachtele, Rogers : 1965) entre autres. La canavanine peut, à priori, interférer avec toutes réactions mettant en jeu son homologue. Lorsque l'antimétabolite agit en tant qu'inhibiteur compétitif, son action sera d'autant plus faible que la concentration du métabolite naturel sera plus élevée. C'est donc le rapport des concentrations qui déterminera l'efficacité d'inhibition de croissance. Ceci a été clairement montré pour *E. coli* K-12 où la canavanine est sans effet sur des cellules en croissance sur milieu minimum, mais est efficace dans les conditions où le pool d'arginine interne est faible - mesuré par la dérégulation de l'OTC (Maas : 1961).

Ne disposant pas de canavanine radioactive, la pénétration et le devenir de cette substance dans la cellule sont difficiles à déterminer. Cependant, le fait même qu'une telle substance inhibe la croissance prouve, en soi, la pénétration. Dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae*, on sait que la pénétration se fait par le truchement de la perméase de l'arginine : une souche p_{arg}^- est résistante à une concentration de 100 μg de L-canavanine/ml (Grenson *et al.* : 1966). On peut aussi montrer que la canavanine est incorporée dans les protéines de la levure : l'addition de 100 μg de L-canavanine par ml de milieu de culture provoque très rapidement l'apparition d'une croissance linéaire et l'incorporation de lysine marquée dans le matériel insoluble à chaud dans le TCA est parallèle à la variation de D.O. (figure 6). Lorsqu'un analogue se comporte comme inhibiteur compétitif sans être incorporé, sa présence se traduit par une croissance exponentielle dont le g est plus grand. On peut préciser que l'incorporation de l'antimétabolite dans l'OTC inactive la protéine formée puisque, dans des conditions où l'arginine n'arrête pas la synthèse de cet enzyme (mutants $argR$), la présence de canavanine empêche un accroissement de l'activité enzymatique totale (figure 7).

(voir figures 6 et 7, page 73)



Au temps 0 : addition de 100 μg L-canavanine/ml et 3 μM lysine/ml (radioact. spéc. : 4800 cpm/ μM).
Prise, en fonction du temps, de 1 ml + 1 ml TCA 10 %, portée à 100°C, pendant 30 minutes et filtrée sur Millipore.

Figure 6 : Incorporation de lysine en présence de canavanine,
Souche : 1705d en croissance sur milieu minimum.

○ — ○ radioactivité
□ — □ D.O.

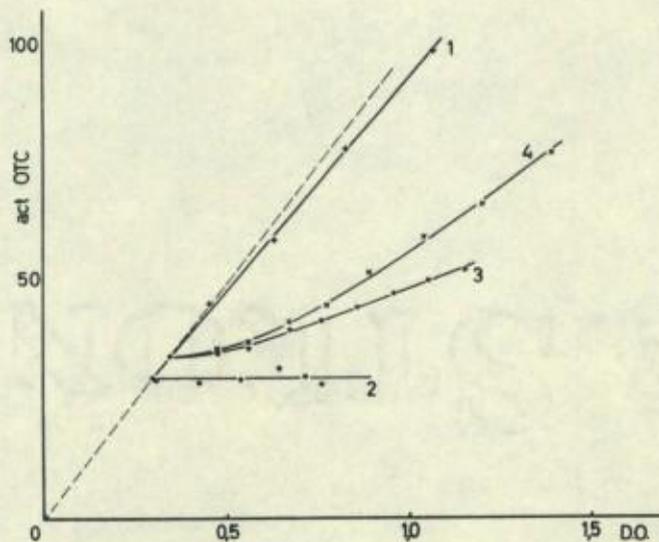


Figure 7 : Activité d'OTC par ml de culture dans une souche arg^{R} (BJ241)
après addition de

- 1) L-arginine 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,
- 2) L-canavanine sulfate, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,
- 3) idem , 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$,
- 4) idem 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + L-ornithine 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

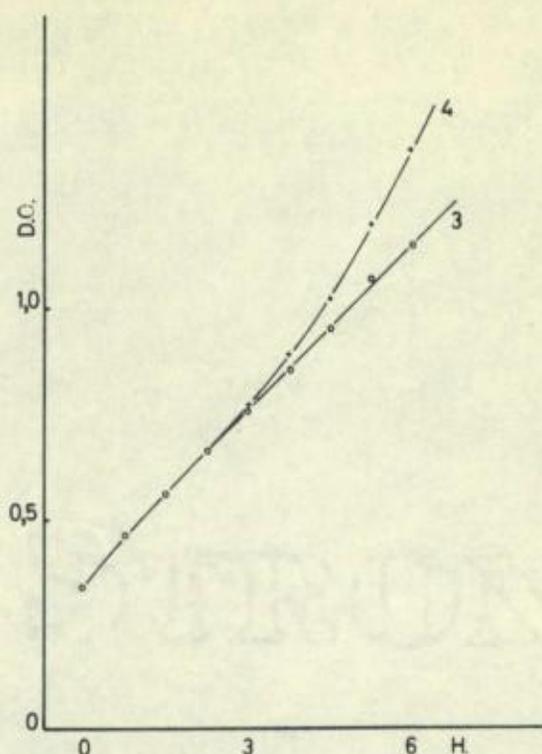


Figure 8 : Croissance de la souche argR (BJ241) - voir légende figure 7.

Lorsqu'une souche sensible de *S. cerevisiae* est étalée sur un milieu contenant de la canavanine, des colonies de cellules résistantes peuvent apparaître (Srb : 1956). D'après ce qui précède, cette résistance peut procéder de deux types au moins de variation :

- 1) la canavanine pénétrant grâce au système de transport actif spécifique de l'arginine, toute cellule ayant perdu ce mécanisme deviendra résistante à l'analogue;
- 2) l'efficacité de l'antimétabolite est fonction de sa concentration relative par rapport à l'acide aminé naturel; toutes variations permettant d'accroître le pool d'arginine insensibiliseront donc d'autant la cellule vis-à-vis de la canavanine.

La concentration interne de l'acide aminé est régie par les deux mécanismes classiques de contrôle : rétroinhibition de la réduction de l'acétylglutamate (De Deken : 1963) et la répression de synthèse des enzymes (Minet et

al., en préparation). Une variation au niveau d'un seul de ces mécanismes ne doit pas nécessairement conduire à un accroissement important des réserves en acides aminés intracellulaires. En effet, si rétroinhibition et répression sont pleinement efficaces, l'action de l'un d'eux seulement peut réduire le flux d'arginine au niveau exigé par la croissance cellulaire. Il faudrait donc pour contrebalancer l'effet de la canavanine, qu'il y ait disparition - ou affaiblissement - des deux modes de contrôle. Deux mutations sont donc théoriquement nécessaires pour provoquer une augmentation importante du pool d'arginine. La fréquence d'apparition simultanée dans une cellule de deux mutations spécifiques, et par conséquent, la probabilité d'obtenir un tel mutant, est très faible. On pourrait circonvenir cet inconvénient en annihilant l'effet de l'un des deux mécanismes de contrôle. La rétroaction négative du produit final d'une séquence de biosynthèse sur l'un des premiers enzymes de celle-ci diminue l'affinité de cet enzyme pour son substrat avec, comme conséquence, une diminution en cascade de la concentration des substrats des enzymes suivants. Pour peu que sa pénétration soit possible, on peut donc aisément court-circuiter la rétroinhibition en fournissant à la cellule un métabolite intermédiaire de la chaîne de biosynthèse. L'ornithine remplit ces conditions pour *Saccharomyces cerevisiae*, elle est aussi substrat de l'enzyme utilisé pour la mesure de la répression.

Le milieu utilisé pour la sélection de mutants de régulation, contient 8 μg de L-canavanine par ml et 200 μg de L-ornithine/ml; une dose plus élevée de canavanine favorise la sélection de mutants p_{arg}^- , ceux-ci étant plus résistants à l'analogue que les mutants de régulation.

La figure 9 montre la validité du raisonnement : une souche sauvage (1278b), deux mutants de régulation (argRI2 et argRII3) et une souche perméase (MG163), ont été étalés sur 4 milieux contenant soit le milieu minimum, soit celui-ci additionné de 8 μg de L-canavanine/ml, de 8 μg de L-canavanine + 200 μg de L-ornithine/ml ou de 100 μg de L-canavanine. (voir page 76).

Différents agents ont été employés pour augmenter la fréquence de mutations : HNO_2 , R.X., EMS et cela au départ de différentes souches de *S. cerevisiae*. A partir de la souche 1278b, traitée par HNO_2 , 422 colonies croissant en présence de canavanine + ornithine ont été isolées, purifiées et analysées

quant à leur niveau d'OTC. Cette mesure est faite après croissance en milieu minimum + 200 µg de L-arginine/ml. Dans ces conditions, l'activité spécifique de l'OTC (mesurée en cellules perméabilisées à la nystatine) doit être voisine ou inférieure à 5 u pour les souches sauvages, de 20 à 25 u pour des mutants p_{arg}^- et on peut s'attendre, dans les mutants de régulation, à une activité égale ou supérieure à celle du sauvage en absence d'arginine.

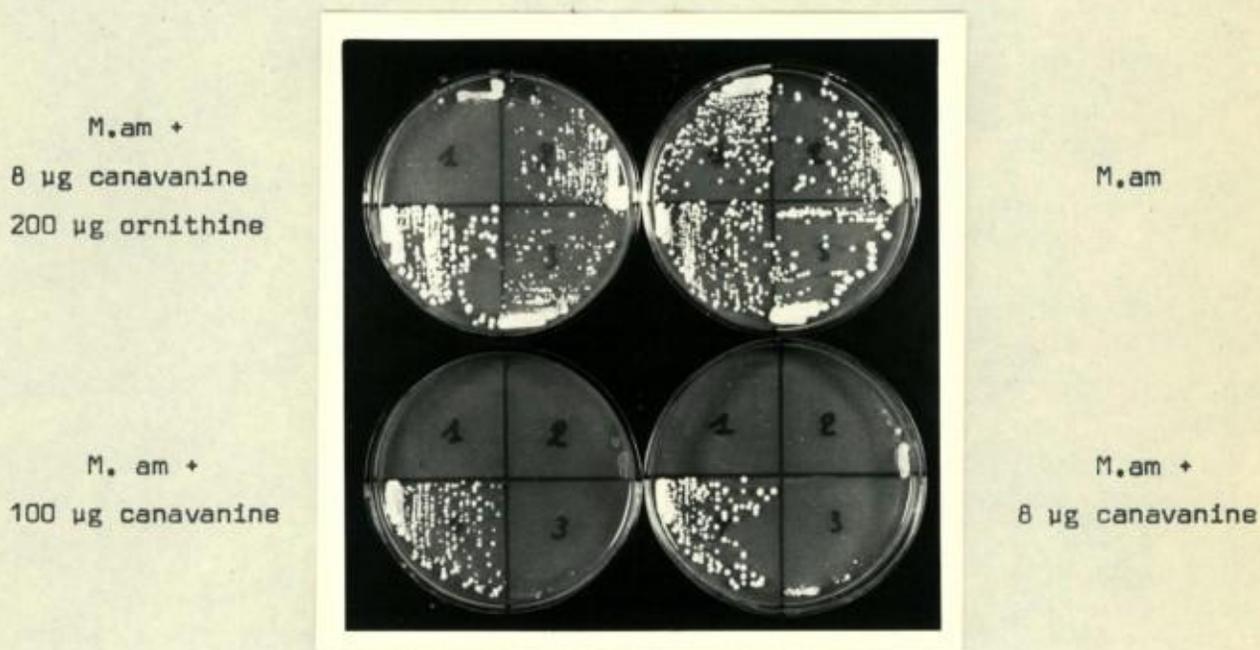


Figure 9 : Croissance de :

- 1) type sauvage (1278b),
- 2) argRI2 (BJ102),
- 3) argRII3 (BJ203),
- 4) souche perméase⁻ (MG163).

La figure 10 montre la répartition du nombre de mutants obtenus dans ces conditions en fonction du niveau d'OTC. Parmi les 422 souches canav^r

isolées, 90 montrent une activité spécifique inférieure à 16 u, ceci traduit soit une répression supérieure à 55 %, soit une diminution de la vitesse de synthèse de l'enzyme et la cause de cette résistance à la canavanine n'a pas été étudiée. La majorité des mutants ont, après croissance en présence d'arginine exogène, un niveau d'OTC compris entre 18 et 28 u, soit une répression de 50 à 20 %. Deux souches de ce groupe ont été analysées et se sont révélées être des mutants p_{arg}^- . Enfin, les 42 mutants ayant une activité spécifique d'OTC supérieure à 50 u ont été analysés. La fréquence élevée d'apparition des mutants affectés dans le mécanisme de transport actif spécifique de l'arginine n'a rien d'étonnant, elle n'implique pas nécessairement une fréquence plus élevée de cette mutation, mais simplement une résistance plus forte à l'analogue et une sélection plus aisée.

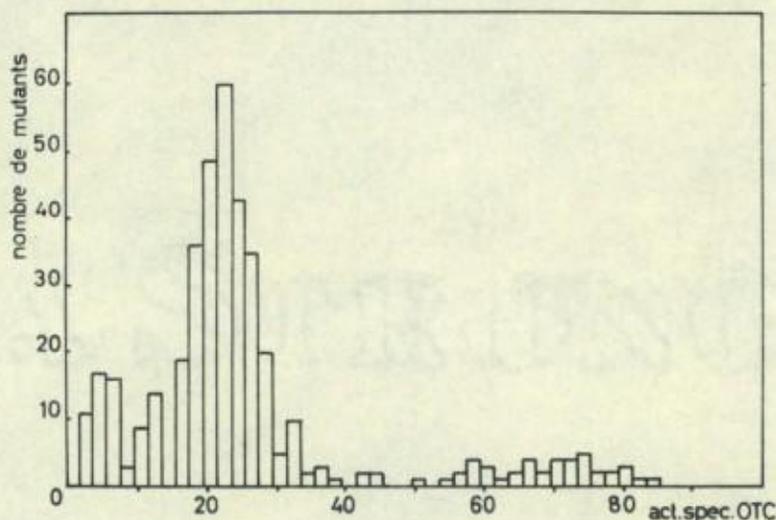


Figure 10 : Nombre de souches $canav^R$ en fonction de l'activité d'OTC, après croissance en milieu M.am + arginine.

Dans les mêmes conditions, 14 mutants de régulation ont été isolés, à partir de la souche 3581d traitée aux R.X. et 7, à partir de 1705d après action d' HNO_2 . Un mutant dont la répressibilité est thermosensible a aussi été obtenu au départ de 3581d et traitement à l'EMS.

TABLE 5

		HAPLOIDES						DIPLOIDES RESULTANT DU CROISEMENT avec 3962c (a) 1278b (a)					
Milieu de culture ¹		Am		Am + A		% R ³	Am	Am + A	% R ³	Am	Am + A	% R ³	
Souches	Genotype	g (min)	OTC	(Arg) ²	OTC		(Arg) ²	OTC		OTC	OTC		OTC
1278b (a)	(sauvage)	117	37	0,08	1	0,26	97						
BJ102 (a)	argRI	117	73		65		11	35	3	91			
BJ202 (a)	argRII	115	97		84		13	45	8	83			
BJ203 (a)	argRII	120	85	0,10	70	0,3	18	37	7	81			
BJ204 (a)	argRII		80		65		19	41	5	88			
BJ210 (a)	argRII	120	81		74		9	45	5	89			
3581d (a)	(sauvage)	116	32	0,08	<1	0,27	98						
BJ240 (a)	argRII	115	87		78		10			56	1	98	
BJ241 (a)	argRII	115	84	0,10	72	0,30	14			56	2	96	
BJ112 (a)	argRI	117	93		83		11			56	2	96	
BJ313 (a)	argRIII	123	97		82		15			52	2	96	

¹ Milieu de culture : Am = milieu minimum, dans lequel NH₄⁺ est la seule source d'azote.

Am + A = milieu minimum + 200 µg L-arginine/ml.

² (Arg) : Concentration intracellulaire d'arginine exprimée en micromoles par mg de poids sec (Ramos *et al.*, en préparation).

³ % R : Pourcentage de répression = $\frac{\text{activ. spéc./Am} - \text{activ. spéc./Am + A}}{\text{activ. spéc./Am}} \times 100.$

Analyse enzymatique des mutants

Le tableau 5 donne quelques exemples de résultats d'analyse enzymatique obtenus dans les mutants. En absence d'arginine exogène, le niveau d'OTC est proche, pour la plupart d'entre eux, de 80 u, ce qui correspond à un accroissement de 2,5 à 3 fois par rapport à la souche sauvage. Il faut remarquer que, dans aucun cas, on n'atteint le niveau maximum d'enzyme possible, à savoir celui observé dans un mutant auxotrophe partiel ayant crû en absence d'arginine exogène. Le niveau atteint dans ce dernier cas, est lui-même, 3 fois supérieur à celui obtenu dans nos mutants, ce qui laisse supposer dans ceux-ci une répression résiduelle de 60-65 % due à l'arginine endogène. Cependant, il faut rappeler que le niveau d'enzyme mesuré dans un bradytrophe n'est, non plus, jamais atteint lors de la croissance d'un auxotrophe arg^- dans un milieu où la concentration en arginine est limitante. Et dans ce dernier cas, tout comme en chémostat d'ailleurs, l'activité spécifique de l'OTC est du même ordre de grandeur que celui mesuré dans les mutants de régulation. Ceci pose d'ailleurs un problème non résolu.

La croissance en présence de 200 μg de L-arginine ramène l'activité spécifique de l'OTC dans les mutants à environ 75 u, c'est-à-dire que la répression n'y est jamais supérieure à 20 % : cette répression ne peut être augmentée par un accroissement de la concentration de l'arginine exogène jusqu'à 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

L'accroissement de la concentration externe de l'arginine ne provoque d'ailleurs qu'un faible accroissement de la concentration intracellulaire pour cet acide aminé, la perméase étant rapidement saturable ($K_m = 10^{-6}$ M, Grenson et al., 1966). Mais l'importance du pool en arginine peut être accrue par croissance dans un milieu ne contenant pas d'ammonium (la présence d' NH_4^+ inhibe, dans certaines souches - dont 1278b -, la pénétration d'arginine. Grenson et al., 1966). Dans ces conditions, la concentration intracellulaire d'arginine est multipliée par 5 à 8 fois et la répression de synthèse de l'OTC est rétablie dans les souches argR^- .

Dans un milieu où le glutamate est la principale source d'azote, l'addition d'arginine - 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - peut imposer une répression qui varie de 35 à 85 % selon les souches.

La perméabilité cellulaire, dont l'altération pourrait partiellement rendre compte des résultats, n'est pas affectée. En présence de 0,02 mM de L-arginine/ml, la vitesse initiale de pénétration de l'acide aminé est de 0,0200 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ prot. dans la souche sauvage (1278b) et de 0,0208 et 0,0206 respectivement dans BJ102 et BJ203.

Enfin, il faut signaler, et le fait est important, qu'aucune variation de la vitesse de croissance ne peut être détectée, résultant de la mutation, tant en présence qu'en absence d'arginine exogène. En milieu minimum, le μ est pour toutes les souches de $118 \text{ min}^{-1} \pm 2 \text{ min}^{-1}$.

Ces résultats diffèrent sensiblement de ceux obtenus dans les mêmes conditions au départ d'*E. coli* K-12. La résistance à la canavanine peut y apparaître comme conséquence d'une mutation au niveau de la perméase (Schwartz, Maas : 1960), mais celle-ci est cependant plus rare que le phénotype canav^{r} dû à une variation abolissant la répression. De plus, la plupart des mutants argR^- permettent une vitesse de synthèse de l'OTC proche du maximum possible (Maas : 1961).

Analyse génétique des mutants

En vue de déterminer la nature de la mutation, les mutants ont été croisés avec une souche isogène sauvage : dans tous les cas, la mutation est récessive, le diploïde montrant un phénotype identique à celui de la souche sauvage (tableau 5). La sporulation a été induite dans quelques hybrides et les ascus disséqués. Dans toutes les tétrades analysées, la ségrégation du caractère muté est mendélienne. Cette analyse permet aussi l'obtention de mutants de signes conjugués opposés.

La récessivité de la mutation permet d'exclure, dans le modèle de Jacob et Monod, une variation au niveau de l'opérateur et le caractère monogénique de la mutation nous autorise à noter argR^- les souches canav^{r} obtenues, sans pour autant en préciser, pour le moment, la nature exacte.

Des essais de complémentation ont été faits pour tous les mutants

en utilisant l'un d'eux comme souche de référence. Sur la base de ces résultats, l'ensemble des mutants se répartit en 3 classes génétiquement distinctes : 4 souches appartiennent à la classe argRI (souche type : BJ102), 48 à la classe argRII (souche type : BJ203) et 1 à la classe argRIII (souche BJ313)(table 6).

T A B L E 6

Test de complémentation entre argRI, argRII et argRIII,
activité et % de répression de l'OTC dans les diploïdes (a x α)

	ACTIVITE D'OTC APRES CROISSANCE SUR MILIEU								
	Am	Am + A	% R	Am	Am + A	% R	Am	Am + A	% R
BJ112 (argRI)	90	69	23	46	1	98	42	1,5	96
BJ240 (argRII)	53	1	98	71	54	24	57	4	93
BJ313 (argRIII)	58	7	88	58	3	95	95	84	12
(a) / (α)	BJ102 (argRI)			BJ203 (argRII)			5225a (argRIII)		

Les locus définis par les mutations argRI, argRII et argRIII sont distincts et éloignés, puisque aisément séparables. La table 7^a montre la ségrégation des caractères argRI et argRII; à partir des diploïdes (argRI, +) x (+, argRIII) et (argRII, +) x (+, argRIII) on a obtenu respectivement 1 DP, 1 DNP, 6 T et 2 DP, 2 DNP, 4 T pour 8 asques disséqués dans chaque cas. Aucun de ces gènes n'a été localisé avec précision sur les chromosomes de la levure; on sait cependant que tous ségrègent indépendamment du gène de structure de l'OTC et que argRI et argRII sont distincts des gènes de structure des autres enzymes de la séquence biosynthétique de l'arginine.

TABLE 7^a

Ségrégation des mutations *argRI* et *argRII*;

Effet non cumulatif de *argRI* et *argRII*

Tétrades	a			b			c			d		
	Am	Am + A	% R	Am	Am + A	% R	Am	Am + A	% R	Am	Am + A	% R
3435	70	59	16	73	62	15	36	2	95	32	1	97
3436	30	1	97	69	61	12	70	59	16	68	56	18
3437	73	68	7	69	62	10	68	60	13	76	71	7
3438	74	62	16	73	63	14	75	74	1	38	2	95

Tétrades (a, b, c, d) résultant du croisement BJ102 x 3170a, (*argRI*, +) x (+, *argRII*).

Am = milieu minimum.

Am + A = milieu minimum + 200 µg L-arginine/ml.

TABLE 7^b

Non additivité des mutations *argRI*⁻, *argRII*⁻, *argRIII*⁻

Souches	Génotype	g min	OTC		
			M.am	M.am + A	% R
5716c	(<i>argRI</i> ⁻ , <i>argRII</i> ⁻ , <i>argRIII</i> ⁻)	123	89	80	10
5716c x BJ112	(id. x <i>argRI</i> ⁻)		82	74	10
5716c x BJ240	(id. x <i>argRII</i> ⁻)		83	81	2
5716c x BJ313	(id. x <i>argRIII</i> ⁻)		107	89	17

La ségrégation des caractères à partir de diploïdes hétérozygotes pour deux mutations, donne des tétrades de 3 types : ditype parental (DP), tétratype (T) et ditype non parental (DNP); dans ces dernières, 2 souches étant du type sauvage, les 2 autres portent nécessairement les 2 mutations. On voit dans la table 7^a, que niveau d'enzyme et intensité de la répression ne sont guère différents dans (argRI^- , argRII^-) de ce que l'on trouve dans argRI^- ou argRII^- et sans analyse génétique, il est impossible de distinguer un double mutant d'une souche ne portant qu'une seule de ces mutations. Il n'y a donc aucun effet d'additivité.

Cette remarque est aussi valable pour les couples (argRI^- , argRIII^-) et (argRII^- , argRIII^-) et le reste pour le triple mutant (argRI^- , argRII^- , argRIII^-). Dans ce dernier cas, la présence des trois mutations a été vérifiée par croisement avec des souches argRI^- , argRII^- et argRIII^- , les diploïdes obtenus étant de phénotype argR^- (table 7^b).

Dosage de gènes

Si un enzyme est réprimé pendant la croissance sur milieu minimum, toute diminution de concentration intracellulaire du corépresseur doit se refléter sur le niveau d'enzyme et une dérèpression proportionnelle doit apparaître. Dans une cellule diploïde hétérozygote pour l'un des gènes des enzymes de la chaîne biosynthétique d'un acide aminé, la concentration de cet enzyme devrait être moitié de celle présente dans l'homozygote; il en résulterait une diminution corrélative du pool de l'acide aminé et un ralentissement de la vitesse de croissance. Ceci, en retour, doit provoquer une dérèpression de la synthèse de l'enzyme jusqu'à atteindre une valeur double de sa valeur normale dans l'haploïde, c'est-à-dire une activité spécifique égale à celle trouvée dans celui-ci. Dans le même temps, les gènes de structure des autres enzymes de la chaîne, s'ils sont corégulés, seront, eux aussi, dérèprimés et s'ils existent en deux exemplaires dans la cellule, l'activité spécifique de ces enzymes atteindra une valeur double de celle trouvée dans les diploïde ou haploïde sauvages. On devrait donc, dans ces conditions, s'attendre à un jeu

d'équilibre entre vitesse de croissance et vitesse de synthèse des enzymes. Ceci ne doit cependant être vrai que si tous les enzymes de la chaîne métabolique ont une activité identique dans la cellule. Dans de nombreux cas, la mesure "*in vitro*" des activités spécifiques des enzymes d'une séquence de réactions montre des valeurs fort diverses; les conditions de ces mesures diffèrent d'ailleurs entre elles et s'écartent souvent de celles existant dans la cellule. Les mesures d'activités "*in vitro*" ne sont donc pas le reflet exact des activités réelles "*in vivo*".

On sait cependant que certains enzymes sont présents dans la cellule en concentration largement excédentaire. Dans ce cas, la vitesse de synthèse du produit terminal de la chaîne sera dépendante de l'activité d'un ou de plusieurs enzymes catalysant la ou les réactions limitantes. La concentration de ces enzymes correspondra exactement aux besoins cellulaires. Il n'y aura pas proportionnalité entre le nombre de gènes de structure et l'activité spécifique.

Dans *Neurospora crassa*, des hétérozygotes peuvent être obtenus, qui contiennent des proportions diverses de gènes sauvages et mutés. L'ATCase est réprimée pendant la croissance de l'homocaryon sauvage en milieu minimum et la relation entre nombre de gènes de structure et activité de l'enzyme n'est pas linéaire dans des hétérocaryons, en absence d'uridine exogène. L'ATCase semble donc, de ce point de vue, être le - ou l'un des - enzyme(s) clef du chemin conduisant à la synthèse des pyrimidines dans *N. crassa* (Donachie : 1964^b).

Dans la biosynthèse de l'arginine, l'OTC montre toujours une activité spécifique beaucoup plus élevée que celle des autres enzymes; c'est le cas dans *E. coli* (Glansdorff, Sand : 1965), c'est aussi le cas pour *Saccharomyces cerevisiae* (Minet *et al.*, en préparation). Il ne semble donc pas que cet enzyme catalyse une étape limitante dans la production de cet acide aminé. Un même pool d'arginine doit donc pouvoir être maintenu - permettant des vitesses de croissance identiques - avec des niveaux d'OTC inférieurs à ceux existant dans la cellule sauvage. Deux diploïdes homo- et hétérozygotes pour l'OTC croissent à la même vitesse sur milieu minimum. On peut donc leur supposer des pools d'arginine comparables sinon identiques et on peut s'attendre à trouver dans l'hétérozygote une activité spécifique moitié de celle trouvée

dans l'homozygote. La table 8 montre qu'il en est bien ainsi.

T A B L E 8

Effet de la dose de gène OTC

Diploïdes	Genotype		g (h)	ACTIVITE SPECIFIQUE DE L'OTC			
				Am		Am + A	% R
	OTC	argRI		OTC	(Arg) [∇]		
3962c x 1278b	+ / +	+ / +	2,0	34	0,05	2	94
3962c x MG676	+ / -	+ / +	2,0	16	0,05	1	94
3987d x 3987b	+ / +	- / +	2,1	42		3	93
3987d x 3987c	+ / -	+ / -	2,0	19		1	95
3988b x 3987b	+ / +	- / -	2,1	72		70	3
3988b x 3987c	+ / -	- / -	2,0	30		29	3

[∇](Arg) = concentration intracellulaire en arginine, exprimée en micromoles/
mg poids sec.

En comparant, dans des homo- et hétérozygote, les activités spécifiques des enzymes d'une chaîne régulée, on devrait donc pouvoir déterminer quelles sont les étapes limitantes de la biosynthèse.

On peut cependant, à la lumière de ces résultats, s'interroger sur l'efficacité d'une régulation qui permet la synthèse d'un excès considérable de protéines enzymatiques. L'économie cellulaire est loin d'y trouver son compte et la régulation par répression de synthèse d'enzymes ne permet pas, dans ce cas, une épargne de protéines.

Le dosage de gènes soumis à une répression n'est donc possible que lorsqu'ils régissent la synthèse d'enzymes existant en large excès dans la cellule. Cette exigence disparaît si l'enzyme n'est pas - ou plus - soumis à la répression. Dans ce cas, le gène, dépourvu de contrôle, se comporte simplement comme catalyseur de la synthèse protéique et la vitesse de synthèse est alors proportionnelle au nombre de gènes. C'est dire qu'un dosage de gènes est toujours possible, soit en condition de répression maximum, soit en dérpression - ou induction - maximum, soit encore dans des mutants R^- . 20 μ g d'uridine impose une répression maximum de l'ATCase dans *N. crassa*; dans des hétérocaryons croissant dans ces conditions, l'activité de cet enzyme est directement proportionnelle à la fraction de gènes pyr_3^+ capables de catalyser la synthèse d'une ATCase active (Donachie : 1964^b).

La table 8 montre que dans les diploïdes homozygotes $\text{arg}R^-$, l'activité spécifique de l'OTC est proportionnelle au nombre de gènes efficaces, le rapport gène/enzyme reste constant. Dans ce cas, on ne doit pas non plus s'attendre à des variations importantes du pool d'arginine : les quantités d'enzymes sont toujours supérieures à celles exigées pour la croissance et on peut supposer que le flux d'acide aminé est contrôlé par la rétroinhibition. Une partie de la synthèse des enzymes est gratuite.

Nature des mutants de régulation

Bien que d'autres modèles aient été proposés, c'est certainement celui décrit en 1961 par Jacob et Monod qui est le plus généralement admis; c'est aussi celui que nous considérerons dans la présente discussion.

Une mutation de régulation est toute mutation qui, pour une concentration en effecteur inchangée, impose, dans la cellule mutée, des vitesses de synthèse enzymatique différentes de celles existant dans la cellule même. La variation du taux de synthèse différentiel du - ou des - enzyme(s) est alors la conséquence directe d'un dérèglement du mécanisme de contrôle. En ne considérant que ce sens restreint, les mutations qui affectent la concentration de l'effecteur ne sont pas des mutations de régulation et les variations de taux de syn-

thèse enzymatique qui en découlent ne sont que des conséquences secondaires, indirectes de la mutation.

Une remarque s'impose dès l'abord, à savoir qu'aucune des mutations étudiées ici, ne se traduit par la non production de la macromolécule, mais bien par la formation d'une molécule altérée. Plusieurs arguments peuvent étayer cette assertion, entre autres que la répression peut être rétablie dans les mutants, lorsque la concentration intracellulaire d'arginine est fortement augmentée.

Nous envisagerons, en premier lieu, les mutations dont la conséquence est une variation dans la production du corépresseur. Mais quel peut être, dans le cas qui nous occupe, l'effecteur vrai ? Trois possibilités sont à considérer, à savoir que le corépresseur est :

- 1) l'arginine libre,
- 2) l'arginine activée (arg~tRNA),
- 3) un autre métabolite, dont l'arginine serait un précurseur.

Les mutants argRI, argRII et argRIII montrent des taux de synthèse de l'OTC plus élevés que dans la souche sauvage. Si ces mutations ont fait varier la concentration du corépresseur, celle-ci devrait donc avoir diminué dans les cellules mutées. La mesure des concentrations intracellulaires d'arginine montre que celle-ci est plus élevée dans les mutants que dans les souches argR⁺ (table 5). On peut donc négliger les hypothèses selon lesquelles les mutations permettraient une sortie importante de l'arginine cellulaire. Donc, ou bien l'arginine est le corépresseur et alors argRI, argRII, argRIII sont des mutations de gènes de régulation, ou bien l'arginine n'est pas le corépresseur efficace. Dans ce cas, la possibilité la plus vraisemblable est que l'effecteur de répression soit l'arg~tRNA.

L'exemple le mieux étudié de mutation affectant la synthèse de tRNA^{aa} et influençant le taux de synthèse de plusieurs enzymes est certainement celui du circuit de régulation de la biosynthèse de l'histidine dans *Salmonella typhimurium*.

Un exemple plus proche de celui qui nous occupe a été publié par

Nazario (1967^{a, b}) : l'auteur y suggère que dans *N. crassa*, l'arg-tRNA pourrait être le corépresseur efficace de la synthèse des enzymes de la chaîne de l'arginine. Pour l'instant, retenons que dans ces expériences, toute dérèpression de l'OTC s'accompagne d'un ralentissement de la vitesse de croissance.

Il ne semble donc pas que les mutations argRI, argRII ou argRIII puissent être assimilées à hisR ou hisS, ni qu'elles affectent d'une façon générale la production de l'acide aminé activé, puisque dans la majorité des cas cités, il y a variation de la vitesse de croissance en même temps que dérèpression, ce qui n'est pas le cas dans nos mutants. De plus, il est évident que la présence simultanée dans une cellule de 3 mutations, devrait avoir un effet cumulatif. Or des doubles ou triples mutants argR⁻ montrent des niveaux d'enzyme et des intensités de répression comparables à ceux de argRI, argRII ou argRIII et leur vitesse de croissance n'est en rien affectée. D'ailleurs, rien ne prouve que les mutations touchant la synthèse d'un acide nucléique de transfert ou d'une synthétase doivent être totalement récessives dans une levure diploïde, bien au contraire, elle peut l'être dans un mérozygote bactérien où le volume cellulaire ne change pas. Dans une levure, la récessivité ne peut être totale que si ces synthèses sont elles-mêmes régulées et si les concentrations ou l'activité est, dans la souche sauvage, supérieure à celle physiologiquement nécessaire à la croissance. Or rien n'est moins sûr; la régulation de l'enzyme d'activation n'a jamais été signalée; sa répression par le tRNA^{~aa}, qui pourrait l'inclure dans la chaîne de biosynthèse de son acide aminé, a été rejetée pour l'histidine : les conditions qui font varier la quantité de tRNA^{~his} ne font pas varier le niveau de cet enzyme (Roth, Ames : 1966).

Enfin, si l'attention a été polarisée sur le rôle de l'acide aminé activé en tant que corépresseur effectif, il ne faut pas perdre de vue que la chose n'a été prouvée que dans quelques cas et que les évidences existantes suggèrent que les acides aminés aromatiques pourraient agir eux-mêmes comme corépresseur (Ravel *et al.* : 1961; Neidhardt : 1966).

Les résultats obtenus vont dans le même sens en ce qui concerne l'arginine (Hirshfield *et al.* : 1968). Dans des mutants de *E. coli* K-12, où l'arginyl-tRNA synthétase est altérée, la synthèse des enzymes de la chaîne de l'arginine reste totalement répressible. Il n'y a pas, dans ce système, de corrè-

lation entre le degré de répression et la concentration d'arginyl-tRNA, puisque dans chaque souche essayée, il n'y a pas de différence appréciable dans le taux de charge du tRNA_{arg}, selon qu'il y a répression ou dérèpression de la synthèse des enzymes.

En résumé, la non additivité de l'effet des 3 mutations argRI, argRII et argRIII, leur récessivité et le maintien, en leur présence, de vitesse de croissance normale, sont peu en faveur de l'idée que ces mutations aient pu faire varier la concentration intracellulaire de tRNA-arg; il est évident que ceci n'exclut absolument pas la possibilité que cette molécule soit le vrai corépresseur.

Enfin, la synthèse de la carbamoylphosphate synthétase est répressible par l'arginine dans la levure sauvage et le reste dans les souches argR⁻.

Alors que l'on peut concevoir que la synthèse de tous les enzymes participant à la formation d'un acide aminé ne soit pas sous le contrôle d'un aporépresseur unique, il est plus difficile d'imaginer pourquoi tous ne seraient pas sous le contrôle de la molécule à la synthèse de laquelle ils concourent. La régulation perdrait alors beaucoup de son sens physiologique.

Ainsi, quelle que soit la nature du corépresseur efficace - et il est évident que nous ne préjugeons en rien sa nature exacte - il semble peu probable que les mutations argR⁻ affectent la synthèse de celui-ci. Il nous reste donc à considérer la possibilité que les mutations sélectionnées soient des mutations de régulation vraies, c'est-à-dire situées soit au niveau de l'opérateur, soit au niveau du - ou des - gène(s) de structure de l'aporépresseur.

L'éventualité d'une modification du site opérateur dans les mutants peut être rejetée avec certitude pour plusieurs raisons, chacune d'elles justifiant, à elle seule, le rejet de cette hypothèse :

- argRI, argRII, argRIII sont des mutations récessives, alors que les variations du site opérateur sont dominantes ou semi-dominantes.
- argRI, argRII, argRIII affectent la vitesse de synthèse de plusieurs enzymes dont les gènes de structure sont disséminés, il y a donc autant d'opérateurs que de gènes ou groupes de gènes de structure.
- argRI et argRII sont des gènes de structure puisque des mutations, dont l'ex-

pression est fonction de la température, sont allèles de ces 2 gènes.

Il semble donc raisonnable de supposer que les mutations argRI, argRII et argRIII affectent l'efficacité de l'aporépresseur. Cette hypothèse implique la nature oligomérique du répresseur qui serait donc composé d'au moins 3 sous-unités différentes; elles sont différentes puisque chacune des mutations argR⁻ conduit au phénotype R⁻. Ceci n'est d'ailleurs pas en contradiction avec l'idée que l'on se fait de la nature allostérique de cette molécule.

On peut alors s'interroger sur la nature précise des mutations qui peuvent se traduire par une diminution de l'affinité :

- de l'aporépresseur pour le corépresseur,
- du complexe aporépresseur - corépresseur pour les opérateurs,
- des protomères pour la formation de l'oligomère,

mais il est difficile de choisir parmi ces possibilités, d'autant plus qu'une mutation pourrait affecter simultanément plusieurs de ces caractéristiques.

Si la première hypothèse est à retenir, c'est-à-dire, s'il y a diminution de l'affinité de l'aporépresseur pour le corépresseur, ces mutations peuvent être assimilées aux mutations i^S des systèmes inductibles; cependant, la similitude s'arrête là car si i^S est dominant, une mutation de même nature sera récessive dans un système répressible. Mais il semble que la fréquence des mutations i^S dans l'opéron lactose soit faible, comparée à la fréquence d'apparition des mutations du type i^- et très peu de mutations de ce type ont été décrites dans d'autres systèmes. Il serait donc étonnant que tous les mutants obtenus dans le système de régulation de l'arginine dans *Saccharomyces cerevisiae* soient de ce type, par ailleurs si rare.

Les mutations de gènes argR pourraient avoir modifié le site spécifique de l'aporépresseur pour les opérateurs. Très peu de choses sont actuellement connues quant à la nature de l'interaction aporépresseur - opérateur. Si la mutation n'affecte que ce site de l'aporépresseur, elle doit être insensible à la concentration de l'effecteur. Or, si dans les souches argR l'intensité de la répression est faible après croissance en présence de 200 µg d'arginine/ml, un accroissement important de la concentration intracellulaire de

l'arginine permet de rétablir une répression intense.

Reste à envisager la dernière hypothèse présentée à savoir que l'aporépresseur est un oligomère formé de sous-unités dont les gènes de structure sont *argRI*, *argRII* et *argRIII*; il résulte des mutations *argR* des protomères ayant perdu la possibilité de s'associer pour former l'aporépresseur pleinement actif. C'est là un type de mutation au sujet duquel nos connaissances sont très fragmentaires. On peut cependant citer le cas de la tryptophane synthétase, un enzyme oligomérique, pour lequel une classe de mutants a été obtenue, dont la lésion se situe dans le gène *B*, et qui produisent une protéine β_2 incapable de se combiner avec les protéines α (Crowford, Johnson : 1963). D'autres mutations dans le même gène peuvent sélectivement altérer l'effet stimulateur du pyridoxal phosphate et de la sérine sur la possibilité pour les β_2 mutés de se combiner avec α (Creighton, Janofsky : 1966). Si les exemples cités de ce type de mutation sont très peu nombreux, cette rareté est probablement due à la difficulté de l'étude plutôt qu'à une faible fréquence d'apparition. En effet, de nombreuses mutations provoquent la synthèse de "C.R.M." enzymatiquement inactif; ces protéines étant mises en évidence grâce à leur propriété antigénique, on ne peut absolument pas dire si d'éventuelles sous-unités peuvent ou non s'associer, puisque celles-ci possèdent les mêmes caractéristiques antigéniques que le complexe.

Peu d'arguments nous permettent de favoriser l'une ou l'autre de ces 3 possibilités; aussi nous contenterons nous pour l'instant, de supposer que les locus *argRI*, *argRII* et *argRIII* codent la synthèse de polypeptides dont l'association conduit à la formation d'unaporépresseur efficace.

Enfin, un dernier argument apparu ultérieurement, peut être utilisé en faveur de cette hypothèse : il s'agit de la non inductibilité du catabolisme de l'arginine dans de nombreuses souches *argR* (Thuriaux *et al.* : 1968). Il est évidemment aisé de voir un point commun entre les deux chemins métaboliques : le substrat du catabolisme, inductible dans les souches sauvages, est aussi le produit terminal de l'anabolisme et on peut facilement concevoir que l'inducteur d'une séquence puisse aussi être le corépresseur de l'autre. Ce double rôle doit alors être attribué à l'acide aminé libre puisque, si l'on peut admettre

que l'a.a.-tRNA soit le corépresseur vrai, on imagine mal que cette même molécule soit inductrice du catabolisme.

Or, les mutations *argR* ne provoquent pas une diminution de la concentration intracellulaire de l'arginine, bien au contraire. La non inductibilité du catabolisme ne peut donc être la conséquence d'une diminution de la concentration en inducteur, même si l'arginine n'est pas l'inducteur efficace, celui-ci doit en dériver.

Dans le schéma le plus simple, que l'on peut imaginer pour la souche sauvage, l'aporépresseur libre permet la synthèse des enzymes de l'anabolisme et empêche la transcription des gènes de structure des enzymes du catabolisme. L'association de l'effecteur à l'aporépresseur inverse ces affinités pour les opérateurs, libérant la dégradation et freinant la biosynthèse. Ce modèle est cependant contredit par le fait que la non inductibilité des *argR* est récessive. On en arrive à devoir imaginer un modèle à contrôle positif pour l'expression des gènes du catabolisme (Thuriaux *et al.*: 1968).

Quoi qu'il en soit et sans entrer dans le détail d'une discussion qui n'a pas sa place ici, la corrélation existant entre les régulations de l'anabolisme et du catabolisme de l'arginine et l'effet des mutations *argR* sur ce dernier métabolisme se conçoivent plus aisément si l'on suppose que celles-ci affectent la synthèse de l'aporépresseur.

A plusieurs reprises, nous avons fait état de ce que, dans les mutants *argR*, la dérégulation n'est pas totale, un niveau d'enzyme largement supérieur pouvant être atteint dans les souches bradytrophes croissant en absence d'arginine exogène. De plus, tous les mutants que nous avons sélectionnés montrent des taux de dérégulation comparables. Si l'on peut admettre que des mutations réparties au hasard dans un gène, produisent des protéines diversement altérées - dont l'inactivation varie de 0 à 100 % - la probabilité est vraiment très faible de garder, dans chaque mutant, une même activité résiduelle.

Nous avons interprété nos résultats comme traduisant la possibilité d'une répression résiduelle par les sous-unités intactes de l'aporépresseur. Une autre hypothèse peut être envisagée, qui suppose l'existence de deux méca-

nismes de contrôle distincts pour la synthèse des enzymes anaboliques de l'arginine. Un premier mécanisme serait physiologiquement opérationnel et permettrait la régulation de la synthèse de l'OTC dans ce que nous qualifierons de conditions habituelles de croissance (activités spécifiques de 0 à 80 u). Les locus *argRI*, *argRII* et *argRIII* coderaient pour les polypeptides formant l'aporépresseur de ce premier mode de contrôle. Un second mécanisme imposerait une répression plus permanente et son action ne serait levée que dans des conditions de croissance exceptionnelle (permettant des activités spécifiques allant jusque plus de 200 u).

On ne voit cependant pas la raison d'être de ce double contrôle ni, s'il existe, pourquoi toutes les souches sélectionnées sont mutées dans le même mécanisme; mais évidemment notre ignorance ne peut être considérée comme argument pour rejeter cette hypothèse.

En résumé, il nous est difficile de préciser avec certitude la nature des mutations *argRI*, *argRII* et *argRIII* dans *Saccharomyces cerevisiae*. Parmi les nombreuses possibilités, certaines peuvent être définitivement éliminées : les mutations ne touchent pas des sites opérateurs, ni ne diminuent la production du corépresseur si celui-ci est l'arginine. D'autres hypothèses semblent peu probables : que les mutations appauvrissent la cellule en *arg-tRNA*, qu'elles diminuent l'affinité de l'aporépresseur - considéré comme complexe polymérique - pour le corépresseur ou pour les opérateurs. Une hypothèse enfin, paraît la plus vraisemblable : variation de la structure primaire et finalement tertiaire des sous-unités de l'aporépresseur de façon à empêcher l'association de ces protomères pour former l'oligomère actif. Peut-être faut-il redire ici que ces conclusions ne sont en rien définitives, qu'il ne s'agit que d'une présomption et qu'elles ne préjugent pas la nature du corépresseur, ni l'éventualité de la participation d'autres effecteurs.

L'existence de 3 protomères différents dans l'oligomère efficace est le reflet de la complexité du contrôle du métabolisme de l'arginine dans la levure.

CHAPITRE VIII

INACTIVATION DE L'OTC

Mise en évidence du phénomène

En présence d'une concentration suffisante de l'inducteur, la vitesse de synthèse de l'enzyme induit reste constante. Lorsque l'inducteur est épuisé ou éliminé, cette vitesse de synthèse est très rapidement ramenée à sa valeur initiale dans la cellule non induite. Les enzymes existants à ce moment sont dilués par l'accroissement de masse cellulaire résultant de la croissance. L'activité enzymatique totale reste donc constante et l'activité spécifique est diminuée de moitié pour chaque doublement de la masse. La mesure de la vitesse de synthèse de la β -galactosidase en fonction de la croissance, mise en honneur par Monod, Pappenheimer et Cohen-Bazire (1952) permet une expression aisée de ce phénomène. En effet, pour autant que les conditions de croissance restent constantes, le taux de synthèse différentiel ($\frac{dz}{dx} = p$) d'un enzyme est constant. Pour un enzyme inductible, p est nul ou très faible en absence d'inducteur - et cela quelles que soient les conditions de croissance précédentes -, p est positif en présence d'inducteur et sa valeur absolue est fonction, pour une même souche, du milieu physique et chimique. La relation exactement linéaire liant z à x rend particulièrement parlante l'expression graphique de l'évolution de la teneur en enzyme d'une population microbienne en croissance. Dès lors que cette loi linéaire est parfaitement établie, toute infraction à celle-ci devient particulièrement intéressante. Ainsi lorsqu'une levure, préalablement induite à l'utilisation du galactose, est transférée dans un milieu glucosé, l'activité de "galactozymase" disparaît rapidement, beaucoup plus rapidement que ce à quoi on peut s'attendre par la simple dilution de l'enzyme formé (Spiegelman, Reinert : 1947). Non seulement y a-t-il arrêt de synthèse, mais encore disparition de l'activité enzymatique présente. Ces auteurs montrent tout d'abord que la présence du substrat n'est ni suffisante, ni néces-

saire à la stabilisation de l'enzyme formé et, discutant de la nature de la formation des enzymes adaptatifs, supposent une interaction compétitive entre les systèmes formateurs d'enzymes. Cette notion de l'existence d'un équilibre de conversion ou d'échange entre les constituants cellulaires est d'ailleurs assez généralement admise à cette époque (Spiegelman : 1946; Monod : 1949). Dans cette optique, un enzyme disparaîtra lorsqu'un autre sera formé. La suppression de cette interaction peut être obtenue en supprimant l'un des éléments, par exemple, tout agent ou condition qui diminue fortement la synthèse protéinique. Deux types d'expériences sont réalisées pour vérifier ce point : on sait que la levure placée en anaérobiose en absence de substrat fermentescible métabolise très peu. Des levures totalement adaptées au galactose, placées dans ces conditions, gardent totalement leur activité de galactozymase. NaN_3 empêche le transfert d'énergie du métabolisme énergétique au métabolisme synthétique, cette substance empêche donc toute synthèse protéique et par conséquent, toute adaptation; elle stabilise aussi les enzymes induits par le galactose. C'est-à-dire que toutes conditions empêchant la synthèse protéique interfèrent aussi avec ce que, plus tard, Robertson et Halvorson (1957) ont nommé la déadaptation.

Le phénomène de la déadaptation de la "maltozymase" semble plus complexe (Robertson, Halvorson : 1957) : ce système comprend deux enzymes, une perméase spécifique du maltose et l' α -glucosidase; ce dernier enzyme existe sous deux formes, l'une libre et l'autre liée. Durant la déadaptation, la forme liée de l' α -glucosidase est solubilisée, puis les activités d' α -glucosidase et de perméase disparaissent. Une dialyse de l'extrait déadapté ne permettant pas une réactivation, il ne s'agit pas d'un effet toxique de l'un des produits du métabolisme du glucose. Et si ces auteurs citent les résultats, ils ne vont pas jusqu'à faire leur les conclusions de Spiegelman et Reinert (1947). Ceux-ci supposent qu'il y a bien interaction compétitive entre systèmes formateurs d'enzymes - cette pensée n'est cependant pas explicitée plus avant -. Mais cette hypothèse a été rejetée ultérieurement grâce à l'utilisation d'acides aminés radioactifs : la synthèse des protéines nouvellement formées ne se fait pas aux dépens d'acides aminés résultant de l'hydrolyse d'autres protéines.

Les cas de déadaptation décrits jusqu'à présent dans la levure ont

trait à des enzymes ou systèmes enzymatiques inductibles. L'OTC, enzyme répressible par l'arginine, dans la levure, peut manifester le même phénomène. Si l'activité de cet enzyme est suivie, lors de l'addition d'arginine au milieu de culture, on voit que cette activité disparaît rapidement (figure 11).

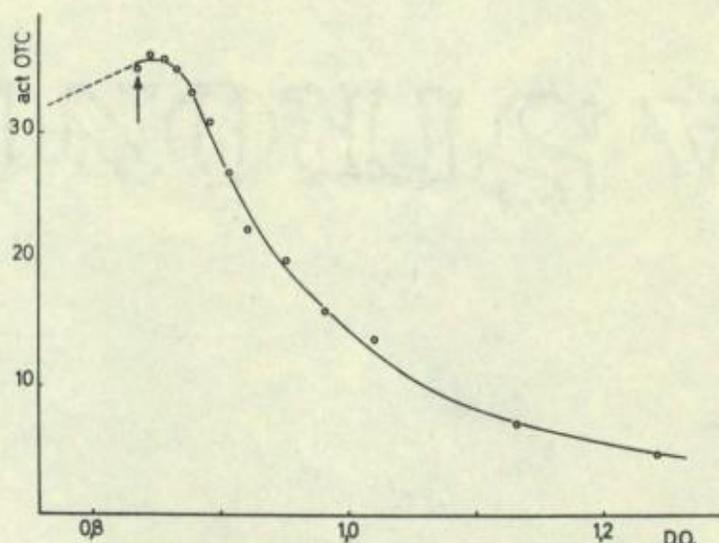


Figure 11 : Evolution de l'activité d'OTC, après addition d'arginine, dans une souche sauvage (1705d) ayant crû en milieu minimum.

N'étant pas représentable par une exponentielle décroissante, la cinétique de disparition d'activité peut difficilement être caractérisée par un temps de demi-vie. Après une latence qui par extrapolation peut être estimée à 5 minutes, on constate une réduction d'activité de 50 % pour un accroissement de masse cellulaire de 10 % seulement et le minimum - représentant une diminution de 90 % de l'activité - est atteint après 60 minutes, soit environ 0,5 génération. Une telle cinétique peut être assimilée au phénomène de déadaptation précédemment décrit. Une différence importante existe cependant. En effet, des résultats fort différents sont obtenus si au lieu de mesurer l'activité d'OTC en cellules entières, perméabilisées à la nystatine, celles-ci sont cassées à la presse de French. Dans ce cas, la cinétique peut être considérée

comme classique en ce que le taux de synthèse différentiel, après addition du répresseur, est semblable à celui mesuré en culture confinée dans les mêmes conditions (figure 12).

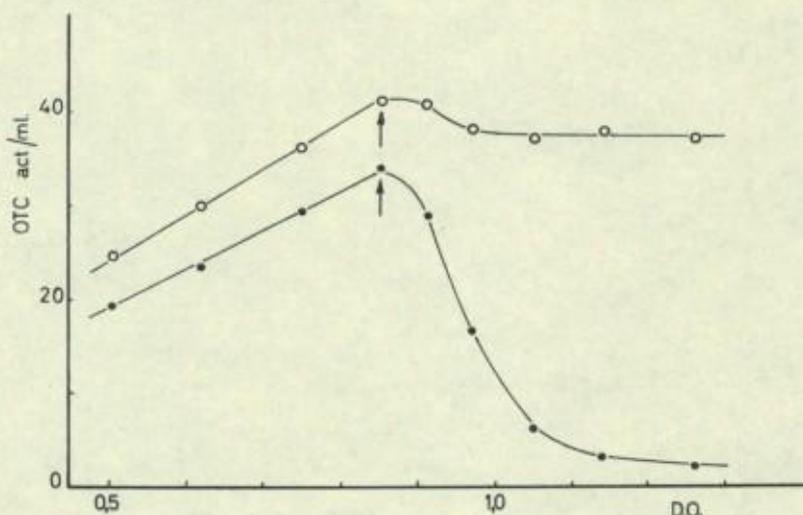


Figure 12 : Evolution de l'activité d'OTC dans une souche sauvage (1705d) après addition de 100 µg d'arginine.

○ = mesure effectuée sur extrait,

● = mesure effectuée sur cellules perméabilisées.

La divergence entre les comportements de l'OTC et des maltozymases et galactozymases est donc importante. Si dans ce dernier cas, la disparition de l'activité pouvait être assimilée à une disparition de la protéine enzymatique, une telle conclusion ne peut absolument plus être retenue ici. En effet, l'activité d'OTC, masquée dans les cellules perméabilisées, peut s'exprimer si ces mêmes cellules sont cassées.

Restait à savoir si les 2 phénomènes étaient réellement comparables, c'est-à-dire si les conditions qui empêchent la déadaptation de la maltozymase empêchent aussi le masquage de l'activité d'OTC. La figure 13 reproduit exac-

tement pour l'OTC une expérience de Spiegelman et Reinert (1947) pour l' α -glucosidase. L'addition d'azoture empêche ici aussi la disparition d'activité de l'OTC. Cette "stabilisation" de l'activité enzymatique est obtenue très rapidement et cela quelque soit le moment, au cours de la déadaptation, de l'addition de l'azoture. Il est donc évident que le masquage de l'OTC est un processus endoénergétique.

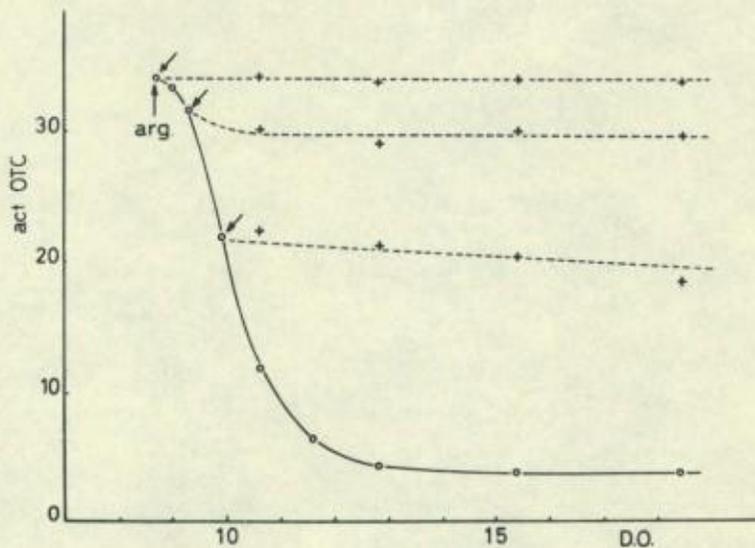


Figure 13 : Action de NaN_3 sur l'inactivation de l'OTC.

Culture de 1705d en milieu minimum, l'arginine (100 $\mu\text{g/ml}$) est ajoutée au moment indiqué par la flèche, la culture est répartie en 4 fioles. L'une sert de témoin et NaN_3 (5×10^{-3} final) est ajouté aux autres fioles au moment indiqué par les flèches.

Pour faciliter la comparaison, on n'a pas tenu compte de l'arrêt de croissance provoqué par l'azoture et les activités enzymatiques sont rapportées à la même abscisse que l'échantillon prélevé au même instant dans la fiole témoin.

Rôle de la synthèse protéique
dans l'inactivation de l'OTC.

La cycloheximide - connue aussi sous son nom commercial, actidione - est un antibiotique produit par *Streptomyces griseus* et actif contre de nombreux eucaryotes, mais non contre les procaryotes. Si les premières études faisaient croire à une inhibition de la synthèse protéique et du DNA (Siegel, Sisler : 1964^a), il est actuellement prouvé que l'effet premier de l'actidione se situe au niveau du transfert des acides aminés de l'aminoacyl-tRNA au polypeptide en voie de formation (Ennis, Lubin : 1964; Siegel, Sisler : 1964^b). La constatation que *Saccharomyces fragilis*, une espèce de levure résistant à la cycloheximide, possède des ribosomes insensibles, *in vitro*, à de fortes concentrations de cet antibiotique, permettait de préciser encore le site d'action de l'actidione (Siegel, Sisler : 1965). L'étude *in vitro* de l'incorporation de phénylalanine radioactive montre que la mutation récessive ac_8^r chez *Saccharomyces cerevisiae* se traduit par la formation de ribosomes pour lesquels 23 μ M d'actidione provoquent une inhibition d'incorporation de 50 %. Dans les mêmes conditions, un système obtenu à partir d'organismes sensibles est inhibé à 50 % par 0,64 μ M d'antibiotique. Un diploïde hétérozygote $ac_8^r / +$ contient en quantité égale des ribosomes normaux - sensibles - et des ribosomes résistants (Cooper *et al.*: 1967). Ce sont donc bien les ribosomes qui sont sensibles à l'action de l'actidione.

Toutes les souches de *Saccharomyces cerevisiae* n'étant pas également sensibles, (Kjellin-Ströby : 1965), nous avons déterminé la concentration efficace et la latence d'action de l'actidione sur nos souches. La figure 14 montre que 2 μ g de cycloheximide par ml de culture empêchent, après moins d'1 minute, l'incorporation de lysine radioactive dans le matériel précipitable au TCA.

L'actidione, tout comme NaN_3 , prévient l'oblitération de l'activité d'OTC après addition d'arginine. Cet effet se manifeste également que l'antibiotique soit ajouté à la culture en même temps que l'acide aminé ou au cours de la déadaptation (figure 15). Ceci indique sans ambiguïté que le processus

d'inactivation de l'OTC implique la synthèse d'une protéine.

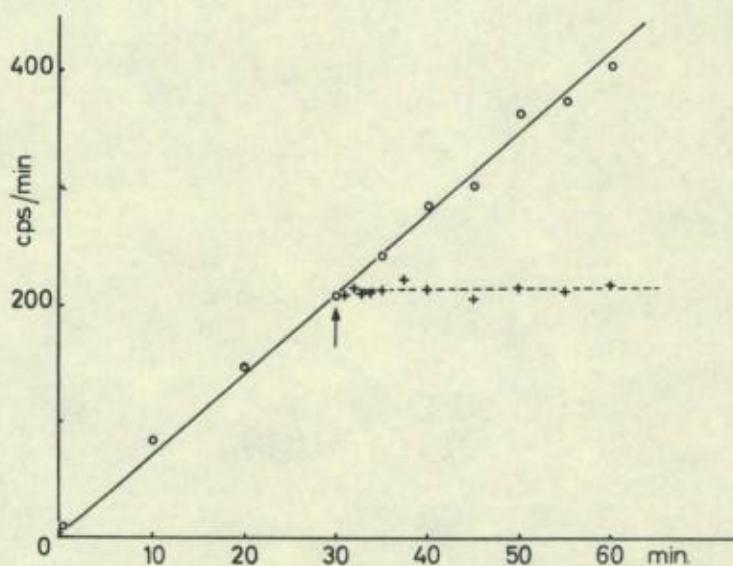


Figure 14 : Effet de l'actidione sur l'incorporation de lysine; culture de 1705d en milieu minimum.

Au temps 0 : addition de L-lysine ($2 \mu\text{M}/\text{ml}$; radioact. spéc. $4850 \text{ cps}/\text{min}/\mu\text{M}$).

A 30 min. : addition d'actidione ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) dans une fraction de la culture.

Prises de 1 ml, + 1 ml TCA 10 %, portées à 100°C , pendant 30 min, et filtrées sur Millipore.

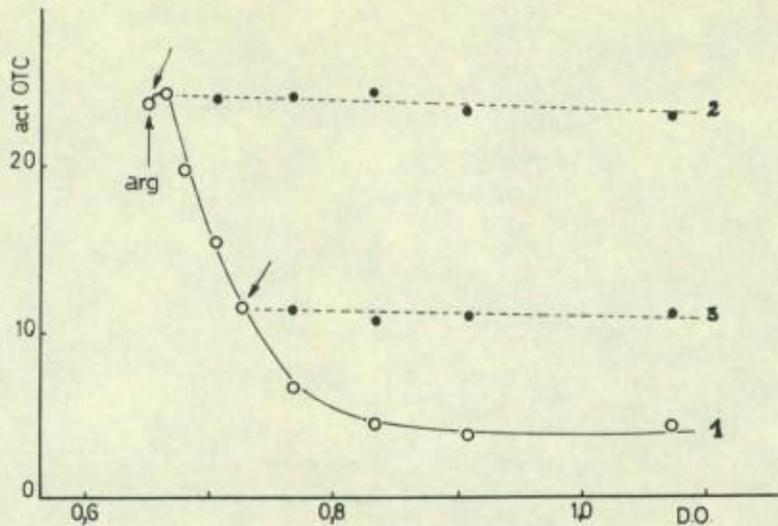


Figure 15 : Effet de l'actidione sur l'inactivation de l'OTC. Souche 1705d en croissance en milieu minimum.

Au temps 0 : addition d'arginine (100 $\mu\text{g/ml}$).

La culture est répartie en 3 fioles :

- 1) Evolution de l'activité d'OTC dans la fiole témoin;
- 2) + 2 μg d'actidione au temps 0;
- 3) + 2 μg d'actidione au moment indiqué par la flèche.

Comme dans le cas de la figure 13, il n'a pas été tenu compte de l'arrêt de croissance provoqué par l'addition d'actidione et les activités enzymatiques sont rapportées à la même abscisse que l'échantillon prélevé au même instant dans la fiole témoin.

Si ce type d'expérience ne permet guère, pour le moment, d'imaginer le mode d'action précis de la protéine induite, une remarque s'impose cependant dès maintenant.

Plusieurs mécanismes pouvaient théoriquement être imaginés pour expliquer cette disparition de l'activité d'OTC dans les cellules perméabilisées. La protéine induite eut pu posséder une activité enzymatique ayant

pour résultat de fausser le dosage de l'OTC par destruction, soit des substrats, soit du produit de réaction utilisé pour la mesure d'activité; ou bien, dépourvue d'activité enzymatique à ce niveau, la nouvelle protéine agit par inhibition - séquestration - de l'OTC. L'activité étant simplement masquée, la protéine OTC n'est pas détruite, son activité pouvant être révélée en extrait. La protéine induite ne peut donc en aucun cas être une protéase détruisant - spécifiquement ou non - l'OTC.

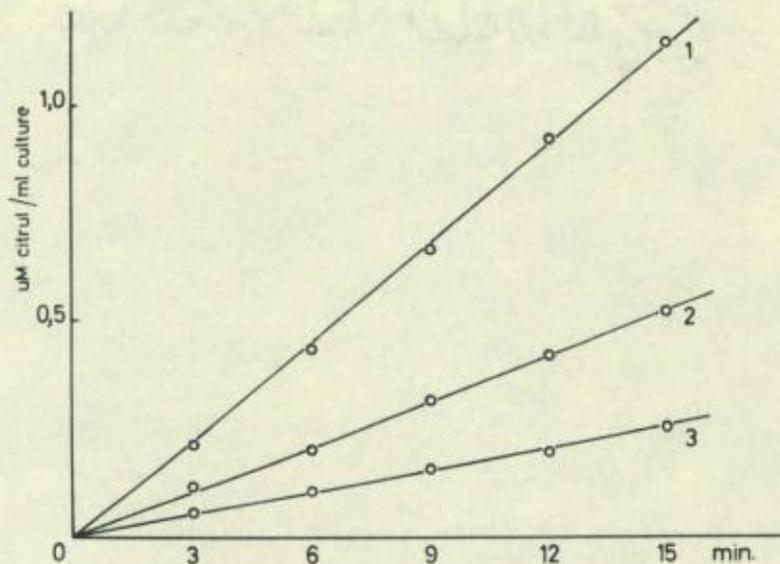


Figure 16 : Dosage de l'OTC, en fonction du temps, dans des cellules perméabilisées : 0 (1), 30 min (2), 60 min (3) après addition de 100 µg L-arginine par ml de culture. Souche 1705d ayant crû en milieu minimum. En abscisse, temps d'incubation à 30°C.

Nous avons vérifié que ni l'ornithine, ni le carbamylphosphate ne font défaut lors du dosage de l'OTC dans des cellules perméabilisées. La cinétique de formation de citrulline en fonction du temps est parfaitement linéaire (figure 16), ce qui ne pourrait pas être le cas si l'un ou l'autre

des substrats venait à manquer. Ce résultat pourrait cependant être obtenu, si une proportion constante de la citrulline formée était détruite. Un dosage de citrulline après incubation en présence de cellules perméabilisées - que l'OTC soit séquestré ou non - montre que la totalité de cet acide aminé est recouvrée dans tous les cas (figure 17).

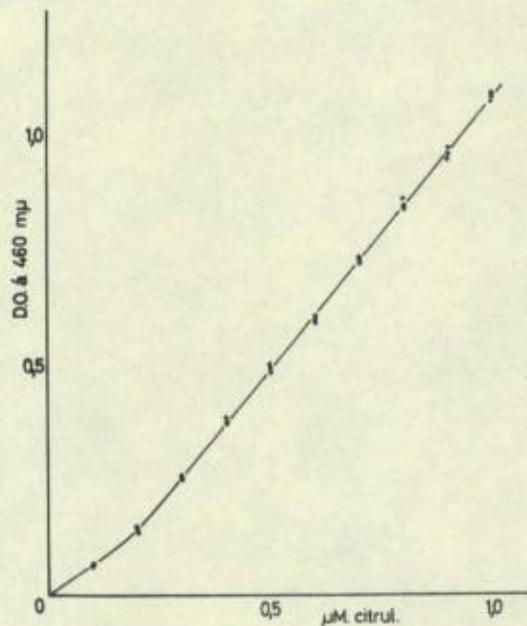


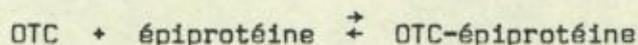
Figure 17 : Dosage de citrulline. Souche 1705d ayant crû en milieu minimum.

- 0 = citrulline témoin,
- + = citrulline + cellules perméabilisées avant addition d'arginine,
- = citrulline + cellules perméabilisées 1 h après addition de 100 µg L-arginine.

La seconde hypothèse - inhibition de l'activité - semble donc beaucoup plus vraisemblable. Une action à distance étant peu concevable, on peut supposer - sans préjuger en rien son mode d'action précis - que la pro-

téine inhibitrice se fixe sur l'enzyme. C'est sur cette base que nous utiliserons les termes "épi-protéine" ou protéine ligande pour qualifier la protéine induite. Dans cette éventualité, la protéine inhibitrice est dépourvue d'activité enzymatique, ce qui est d'ailleurs suggéré par les résultats représentés par la figure 15 (page 101). Dans le cas contraire, en effet, l'addition de l'actidione en cours de déadaptation ne devrait pas arrêter celle-ci, l'enzyme formé continuant à agir, sauf si l'activité de cet enzyme est sensible à l'antibiotique. Jusqu'à présent, aucun exemple d'enzyme sensible à la cycloheximide n'a été rapporté. L'action est donc stoechiométrique et non catalytique.

Rien ne permet, pour le moment, de prévoir la nature de l'interaction épi-protéine-OTC. Cependant, quelles que soient ces liaisons, il est évident que l'association des deux molécules protéiques est réversible et dès lors fonction de la concentration des éléments réagissants.



Les suspensions de cellules perméabilisées utilisées dans nos mesures contiennent environ 2×10^7 cellules par ml. Si on assimile la levure haploïde à une sphère de 5μ de diamètre, on peut estimer à

$$1/6 \times 3,14 \times (5 \mu)^3 \times (2 \times 10^7) = 1,3 \times 10^9 \mu^3 = 1,3 \times 10^{-3} \text{ ml,}$$

le volume occupé par les cellules par ml de suspension. La fabrication d'un extrait au départ d'une telle suspension se traduit donc par une dilution très forte - de l'ordre de $1000 \times$ - du matériel cytoplasmique. L'importance de cette dilution peut aisément rendre compte de la réactivation de l'OTC, résultant de la dissociation du complexe OTC-épi-protéine formé, stable dans la cellule perméabilisée.

Action des analogues d'acides aminés

Si la séquestration de l'activité d'OTC est le résultat d'une synthèse protéique, on doit s'attendre à ce que certains analogues d'acides ami-

nés puissent interférer avec cette inhibition. La p-fluorophénylalanine, la β -2-thiénylalanine, l'éthionine, l'acide azétidine carboxylique (Cohen *et al.*: 1958; Cohen, Munier : 1958; Munier : 1960) à raison de 200 μ g par ml de culture, provoquent l'apparition d'une croissance linéaire (voir figure 5 et remarque page 71). On peut donc supposer que ces analogues sont incorporés dans les protéines.

La β -2-thiénylalanine ajoutée à une culture, soit en même temps que l'arginine, soit au cours de la synthèse de l'épiprotéine, réduit rapidement l'inhibition de l'OTC (figure 18). Ces cinétiques peuvent être interprétées comme traduisant l'incorporation de l'analogue dans la protéine inhibitrice avec comme conséquence une distorsion de la structure tertiaire de celle-ci. La nouvelle molécule ainsi formée a perdu sa capacité de fixation sur - et d'inhibition de - l'OTC.

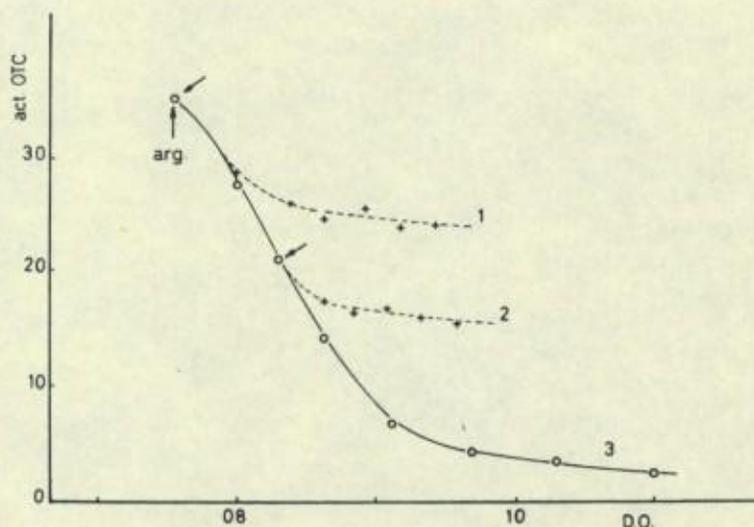


Figure 18 : Effet de la β -2-thiénylalanine sur l'inactivation de l'OTC.
Culture de 1705d en milieu minimum.

Au temps 0, addition de 100 μ g de L-arginine/ml.

La culture est répartie en 3 lots :

- 1 : + 100 μ g β -2-thiénylalanine au temps 0 (1),
- 2 : + 100 μ g β -2-thiénylalanine 20 minutes après addition de l'arginine,
- 3 : témoin.

Les autres analogues essayés ne montrent que peu ou pas d'effet. Ces résultats négatifs, s'ils ne confirment pas, n'infirment pas pour autant l'hypothèse de la synthèse d'une protéine. Dans une protéine, tous les acides aminés de la séquence primaire ne sont pas également importants dans la détermination de la structure tertiaire. On sait par exemple que, dans les limites imposées par le code génétique, toute mutation ne conduit pas nécessairement à la formation de protéines enzymatiquement inactives (Yanofsky *et al.*: 1966). De même, *E. coli*, en présence de 3-4-déhydroproline peut produire une phosphatase alcaline où 85 % des résidus des prolines sont remplacés par l'analogue. Les propriétés cinétiques de l'enzyme contenant l'antimétabolite (K_m et V_{max}) ne sont pas sensiblement différentes de celles de l'enzyme normal. Cependant, l'enzyme contenant la déhydroproline est beaucoup plus thermolabile - sa cinétique de dénaturation est d'ailleurs complexe (Fowden *et al.*: 1963). La même constatation a été faite au sujet de la β -galactosidase d'*E. coli* où, en présence d'analogue, l'enzyme peut être synthétisé, toutes les phénylalanines y étant remplacées par de l'o-, m- ou p-fluorophénylalanine. Cette nouvelle molécule garde toute son activité et ses caractéristiques enzymatiques, seules, sont changées ses caractéristiques physico-chimiques (Munier, Sarrazin : 1964). Dans le cas présent, on pourrait même supposer que l'activité inhibitrice de l'épiprotéine est moins sensible qu'une activité enzymatique à la présence d'analogues dans sa structure primaire. C'est, par exemple, le cas des "cross reacting materials" toujours susceptibles de réagir avec l'anticorps spécifique de l'enzyme, alors qu'ils ont perdu toute activité enzymatique.

Réactivation thermique

Si des cellules sont prélevées 60 minutes après addition d'arginine au milieu de culture, perméabilisées à la nystatine et chauffées durant 5 min à différentes températures, l'activité de l'OTC peut être recouvrée (figure 19). Pratiquement sans effet jusqu'à 50°C, l'activité maximale est obtenue après chauffage à 59°C. Des températures plus élevées provoquent une diminution ra-

pide de l'activité d'OTC. Ce traitement thermique à 59°C durant 5 minutes permet d'obtenir une activité spécifique égale à celle obtenue en extrait. Des cellules ne contenant pas ou peu de protéines inhibitrices, soumises au même traitement, ne révèlent qu'un léger accroissement de l'activité d'OTC, les chutes d'activités sont, dans les deux cas, tout à fait comparables.

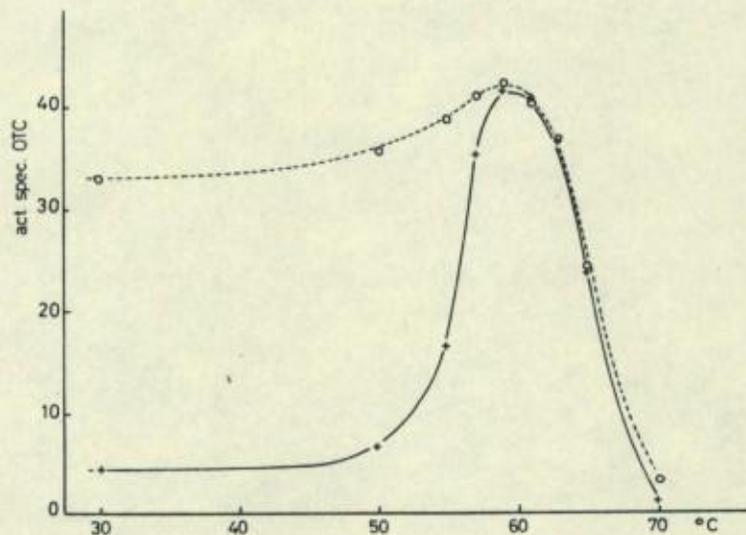


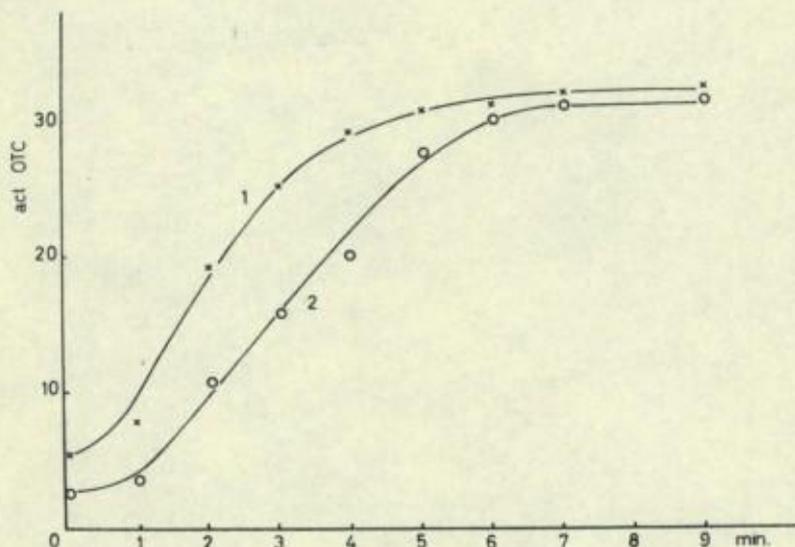
Figure 19 : Thermoréactivation de l'activité d'OTC dans des cellules perméabilisées avant et 1 h après addition d'arginine. Culture de 1705d en milieu minimum.

Les cellules sont prélevées avant (0 - 0), ou 1 h (+ - +) après addition de 100 µg L-arginine/ml; perméabilisées et chauffées 5 min aux températures indiquées en abscisse.

Ces résultats peuvent être interprétés comme étant la conséquence de la dénaturation de l'épiprotéine par la chaleur. Une élévation de température peut favoriser une dissociation du complexe enzyme - inhibiteur; cela

impliquerait que les liaisons unissant les deux molécules sont de faible énergie, hydrogènes, Van der Waals ou hydrophobes par exemple. Si cette possibilité n'est pas exclue, il n'y a cependant pas de raison de croire que ce soit là la seule action de la chaleur, sinon le refroidissement devrait permettre la réassociation des molécules. On peut donc admettre que le chauffage dénature irréversiblement la majeure partie de l'épiprotéine et la rend inefficace en tant qu'inhibiteur de l'OTC. La température de dénaturation est d'ailleurs tout à fait compatible avec la nature protéique de l'inhibiteur.

L'azétidine est incorporée dans les protéines de *Saccharomyces cerevisiae*, mais n'affecte que fort peu la capacité de séquestration de l'OTC par l'épiprotéine. Comme dans le cas cité de la β -galactosidase, le remplacement d'une fraction des résidus proline de l'épiprotéine par de l'azétidine, pourrait conduire à une molécule dont les propriétés physico-chimiques seraient modifiées. La figure 20 montre que 50 % de l'épiprotéine synthétisée en présence d'azétidine sont dénaturés par un chauffage de 2 minutes à 56°C alors que, par le même traitement, 20 % de la protéine normale sont détruits.



x - x cellules traitées
à l'azétidine,
o - o cellules non traitées
à l'azétidine.

Après 1 h, les cellules sont
prélevées, perméabilisées
et chauffées à 56°C durant
des temps variés.

Figure 20 : Thermoréactivation de l'activité d'OTC dans des cellules ayant crû, ou non, en présence d'azétidine. Une culture en milieu minimum de 1705d est divisée en 2 lots :

2) + 100 μ g L-arginine,

1) + 100 μ g L-arginine + 100 μ g d'azétidine.

Le fait que l'azétidine n'empêche guère la séquestration de l'OTC peut surprendre si on se souvient du rôle singulier que l'on assigne habituellement à la proline dans l'élaboration des structures secondaire et tertiaire des polypeptides. L'introduction dans la molécule d'un résidu, dont les dimensions et les angles de liaison sont différents de ceux de l'acide aminé naturel, devrait provoquer une distorsion importante de la protéine. Et cependant, on a vu qu'un enzyme (la phosphatase alcaline) pouvait garder son activité enzymatique après incorporation de 85 % de 3-4-déhydroproline.

Hétérogénéité des souches

Nous avons signalé précédemment l'hétérogénéité des souches de *S. cerevisiae* quant à leur niveau d'enzymes et éventuellement quant à la régulation de ceux-ci; la même remarque s'impose ici. Si on examine les cinétiques de déadaptation des souches 3581d et 1278b (figure 21), on voit qu'une concentration extracellulaire de 200 μg de L-arginine provoque une inactivation rapide de l'OTC dans 3581d, alors qu'elle est beaucoup plus lente dans 1278b. L'inactivation atteint 90 % dans 3581d pour un accroissement de masse de 33 % alors que dans les mêmes conditions, elle est de 20 % pour 1278b. En croissance confinée en milieu minimum + 200 μg L-arginine, ces 2 souches montrent une égale répression et la concentration intracellulaire d'arginine est comparable : 0,28 μM arg/mg prot. dans 3581d et 0,30 μM arg/mg prot. dans 1278b. Des mêmes concentrations d'équilibre pourraient cependant être atteintes à des vitesses différentes. On a montré que dans certaines souches, la présence d' NH_4^+ dans le milieu extérieur, diminue la capacité du système de transport actif de l'arginine (Grenson *et al.*: 1966) : c'est le cas de 1278b. En présence d' NH_4^+ (10^{-2} M), la vitesse de pénétration de l'arginine y est de 15×10^{-3} $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéine, elle est de l'ordre de 40×10^{-3} en absence d' NH_4^+ ; par contre, dans 3581d, la vitesse de pénétration de l'arginine, insensible à la présence d' NH_4^+ externe, est de 40×10^{-3} $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ prot. (Grenson : communication personnelle), c'est-à-dire du même ordre de grandeur que pour 1278b en absence d'ammonium (figure 22).

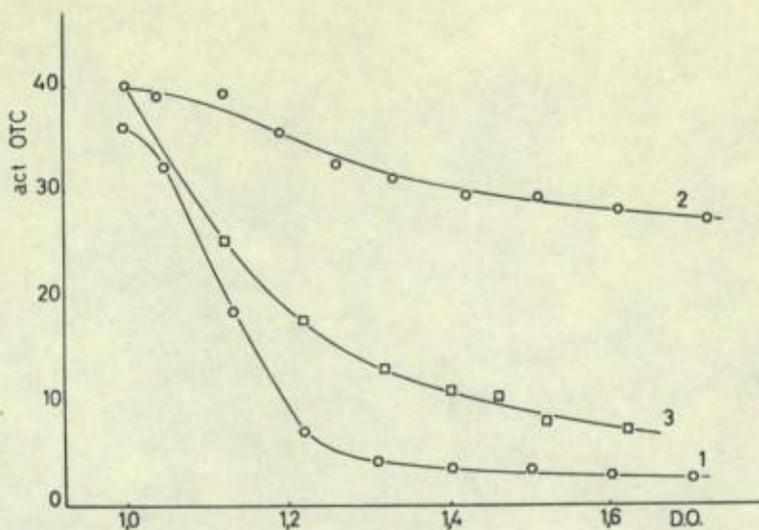


Figure 21 : Inactivation de l'OTC dans 3581d et 1278b. Cultures des deux souches en milieu minimum.

Au temps 0 :

1. souche 3581d + 200 μg L-arginine par ml,
2. souche 1278b + 200 μg L-arginine par ml,
3. souche 1278b transférée dans un milieu où l'arginine (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) est la seule source d'azote.

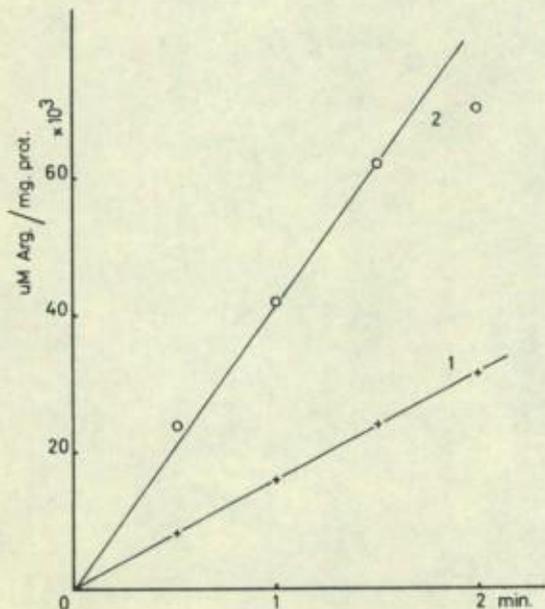


Figure 22 : Vitesse d'entrée de l'arginine dans 1278b (1) et 3581d (2) ayant crû en milieu minimum (méthode : voir Grenson *et al.*: 1966).

Si, à l'équilibre, les pools d'arginine sont identiques dans les deux souches, cette concentration n'est pas atteinte dans les mêmes délais pour 1278b et 3581d. Si les différences dans les séquestrations d'OTC dans 1278b et 3581d résultent de différences dans les vitesses de pénétration de l'arginine, cette dissemblance sera abolie dans des conditions où les pénétrations seront comparables. On voit (figure 21) qu'effectivement, en absence d' NH_4^+ externe, la séquestration de l'OTC dans 1278b est comparable à celle de 3581d en présence d' NH_4^+ . L'hétérogénéité des souches, dans ce cas, ne se trouve donc pas au niveau du phénomène de séquestration de l'enzyme, mais plutôt au niveau du système de pénétration de l'arginine.

La séquestration dans les mutants argR

Quelle que soit la nature du phénomène de séquestration, il est évident qu'il peut jouer un rôle régulateur et il était donc intéressant de voir comment se comportent, à cet égard, des mutants argR^- . La figure 23 montre l'évolution du taux de synthèse différentiel de l'OTC lorsque, à une culture d' argR^- , est ajoutée de l'arginine à raison de 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$. On voit qu'il y a un léger temps d'arrêt dans la synthèse de l'enzyme et que, très rapidement, celle-ci reprend à une vitesse constante, correspondant au taux de synthèse en culture confinée en présence d'arginine. Contrairement à ce qui se passe avec des cellules argR^+ , il n'y a ici aucune disparition de l'activité de l'enzyme. Il s'agit donc de deux comportements fort différents pour les souches argR^- et argR^+ . Le même comportement a été obtenu pour tous les argR^- essayés, qu'il s'agisse de argRI , argRII ou argRIII , dans les souches mutées de départ ou dans des ségrégeants de croisement, et cela quelle que soit la souche parentale. La corrélation absolue qu'il y a entre le passage $\text{argR}^+ \rightarrow \text{argR}^-$ et la disparition de la capacité d'oblitération de l'OTC permet de supposer une liaison entre ces deux phénomènes. Cette corrélation s'étend aussi à toutes les conditions de croissance. On a vu que les mutants argR^- obtenus ne sont pas absolus en ce qu'il subsiste toujours une faible répression, de l'ordre de 10 à 20 % en présence de 200 μg de L-arginine dans le milieu de culture. Cependant,

un accroissement important de la concentration intracellulaire d'arginine permet de rétablir, dans les souches argR^- , une répression de 90 % ou plus. Il est remarquable de constater que ces conditions, qui rétablissent le phénotype argR^+ , rétablissent aussi la séquestration de l'OTC. La courbe (2) de la figure 23 montre les résultats d'une expérience similaire à celle de la courbe (1), mais où des cellules argR^- sont transférées d'un milieu où la source d'azote est NH_4^+ à un milieu où le seul substrat azoté est l'arginine.

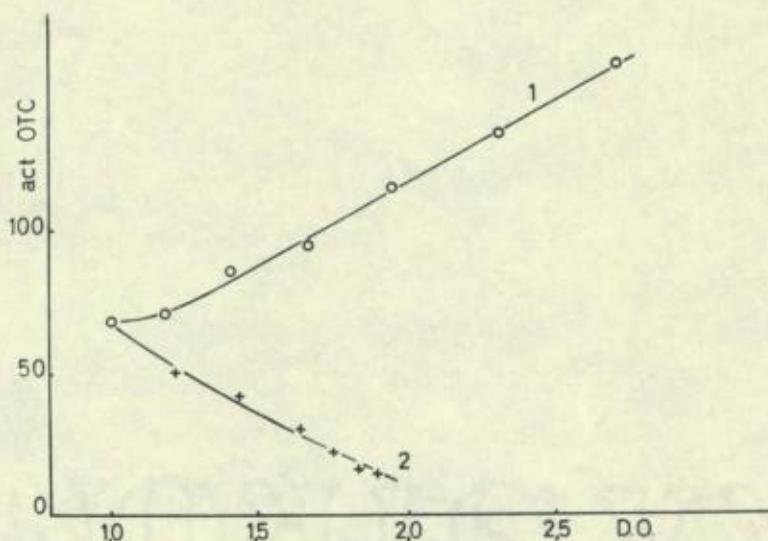


Figure 23 : Souche BJ104 (argRI) ayant crû en milieu minimum.

Au temps 0, les cellules :

- 1 - sont passées sur milieu minimum + 200 μg L-arginine/ml,
- 2 - après filtration et lavage, remises en suspension dans un milieu où l'arginine (1 mg/ml) est la seule source d'azote.

Dans de telles conditions, il y a une évidente disparition de l'activité de l'OTC. Si la cinétique est plus lente que dans le cas des argR^+ , le phénomène est cependant en tout point semblable. L'activité enzymatique masquée peut

être mise en évidence par simple rupture de cellule, c'est-à-dire par une dilution du contenu cytoplasmique. Nous avons dit que nombreuses sont les souches argR^- qui ont aussi perdu la possibilité d'utiliser l'arginine comme unique substrat azoté; dans ces conditions, la croissance est donc impossible et il était par conséquent difficile de montrer la répression, en culture confinée. La croissance résiduelle, consécutive au transfert $\text{NH}_4^+ + \text{Arg}$ permet cependant sa mise en évidence même dans des souches ayant perdu la possibilité de cataboliser l'arginine. L'expérience a été réalisée pour la plupart des mutants argR^- : tous ont montré une disparition plus ou moins rapide de l'activité d'OTC. L'importance de l'inactivation, en 1 h, varie de 0 à 70 %. C'est-à-dire que, contrairement à l'homogénéité de la répression dans les souches argR^- , il y a ici hétérogénéité dans l'efficacité de séquestration de l'OTC. Aucune technique ne nous étant actuellement connue, qui permettrait d'accroître encore la concentration intracellulaire de l'arginine, il est difficile de décider si ces différentes cinétiques sont le reflet d'exigences diverses pour la concentration en arginine.

Etude *in vitro*

L'étude "*in vitro*" du phénomène de séquestration de l'OTC a amplement permis de confirmer les hypothèses émises pour l'interprétation des résultats d'expériences effectuées sur cellules perméabilisées. Cette étude a été effectuée par F. Messenguy et fait l'objet d'une thèse de doctorat; des résultats préliminaires ont été publiés (Messenguy *et al.* : 1967; Messenguy, Wiame : 1969^{a, b}).

L'inhibition de l'activité de l'OTC peut être mise en évidence en utilisant des extraits acellulaires à très fortes concentrations protéiques; la dilution de ceux-ci révèle progressivement l'activité enzymatique. Dans un extrait brut de cellules où l'épiprotéine est induite, le maximum d'activité enzymatique est obtenu pour une concentration en protéine de l'ordre de 25 $\mu\text{g/ml}$, l'inhibition maximale exige 1 mg/ml . Ceci explique les résultats et confirme l'hypothèse selon laquelle la mise en évidence de l'activité d'OTC

par rupture des cellules perméabilisées résulte d'une dilution importante de la concentration protéique.

En extrait brut encore, on peut montrer la présence de la protéine inhibitrice après croissance en milieu minimum + L-arginine et son absence après croissance sans arginine exogène. Si des dosages d'activité d'OTC sont faits en extrait concentré et en présence de quantité croissante d'extrait contenant l'épiprotéine, l'intensité de l'inhibition observée n'est fonction que de la dose de protéine ligande et non du temps, ce qui confirme le caractère stoechiométrique et non enzymatique de l'action inhibitrice. La séquestration de l'OTC est extrêmement rapide - moins de 1 minute - et il est difficile d'en établir la cinétique. Cette technique de dosage *in vitro* de la protéine inhibitrice a aussi montré un fait important, difficile à mettre en évidence en cellules perméabilisées, à savoir que, en présence d'arginine exogène, la production d'épiprotéine est continue et non transitoire. C'est-à-dire qu'il y a induction - dans le sens classique - de la protéine inhibitrice, et qu'il y a corrélation absolue entre cette induction et la répression de synthèse de l'OTC. Si au niveau de la répression, il n'y a guère de différence selon que la croissance est faite en milieu minimum + 200 μg L-arginine ou en présence d'arginine seule (1 mg/ml), par contre, la capacité d'inhibition des extraits, obtenus après culture dans ces deux milieux, est sensiblement différente. Cette remarque est également valable pour les souches argR^- .

Ces études ont aussi permis de mettre en évidence le rôle d'effecteurs nécessaires à la réaction et présents dans un extrait non purifié. L'épiprotéine peut être purifiée par précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 55 % de saturation, puis par élution sur une colonne de DEAE cellulose au moyen d'un gradient de KCl. Une telle préparation d'épiprotéine purifiée est sans action sur de l'OTC, elle aussi purifiée. On pouvait s'attendre à ce que l'arginine soit nécessaire à l'association des deux protéines : cet acide aminé, à une concentration de 10^{-3} M permet d'atteindre une inhibition de 45 % de l'activité de l'OTC, mais c'est là une valeur que l'on ne peut dépasser en accroissant la concentration d'arginine. L'importance de la séquestration dans ces conditions étant loin de correspondre à celle obtenue en utilisant des extraits bruts ou des cellules perméabilisées, on pouvait suspecter la nécessité d'autres effecteurs.

L'ornithine et le zinc se sont révélés participer à la réaction : Zn^{++} est exigé à une concentration très faible : 10^{-5} M. L'inhibition d'activité de l'OTC par l'épiprotéine peut atteindre 40 % en présence de L-ornithine 10^{-2} M. Comme dans le cas de l'arginine, ce maximum ne peut être dépassé par accroissement de la concentration de l'effecteur - à des concentrations supérieures, l'ornithine devient inhibitrice de l'OTC, sans intervention de l'épiprotéine -. Cependant, les effets de ces deux acides aminés sont cumulatifs et on peut atteindre 80 % d'inhibition de l'activité par la présence simultanée d'arginine (10^{-3} M) et d'ornithine (10^{-3} M).

Le rôle physiologique de la séquestration de l'OTC

Nous l'avons dit, l'évanouissement d'une activité enzymatique n'est pas un phénomène rare. Dans les organismes supérieurs, son existence se justifie pleinement par la vitesse de croissance très faible des cellules et le renouvellement des espèces protéiques y permet une élimination d'enzymes devenus superflus; ceux-ci peuvent être sensibilisés à la protéolyse, provoquant ainsi leur disparition préférentielle.

Dans les eucaryotes inférieurs, la déadaptation a été montrée, essentiellement pour les enzymes cataboliques du maltose, du galactose, pour la malate déshydrogénase dans la levure, la β -galactosidase dans *Neurospora* (Bates *et al.*: 1967). Si, dans certains cas (*Dictyostellium discoideum*, par exemple), la différenciation ou la morphogénèse peut donner un sens à la disparition rapide de l'activité enzymatique, on ne peut certes pas invoquer cette raison dans la déadaptation, non plus d'ailleurs qu'une dilution trop lente de l'activité puisque les levures croissent à des vitesses comparables à celles des bactéries. Si l'on admet que peu de choses sont gratuites dans une cellule, une raison devrait donc présider à l'induction de ce phénomène.

Il est évidemment tentant de voir un parallélisme plus ou moins étroit entre eucaryotes inférieur et supérieur et ainsi de supposer que, la protéine ligande se fixant sur l'enzyme, l'OTC est partiellement dénaturé et

sensibilisé à l'action des enzymes protéolytiques. L'induction de l'épiprotéine se traduirait donc par une spécification du "turn-over". Des essais menés "in vitro" n'ont pas montré une différence importante de la sensibilité à la trypsine que l'OTC soit, ou non, associée à l'épiprotéine. Ces résultats négatifs n'infirmement cependant pas l'hypothèse : nous avons vu que le "turn-over" des protéines, dans le foie de rat, par exemple, ne peut être mis en évidence que dans le tissu, ou dans des tranches du tissu, mais pas en extrait. Il n'y a aucune raison qu'il n'en soit pas de même dans la levure. Une telle possibilité a cependant été explicitement évoquée pour expliquer l'instabilité de la tryptophane synthétase de *Saccharomyces cerevisiae* (Manney : 1968). Cette instabilité est observée dans des extraits obtenus à partir de cellules ayant crû en milieu minimum - elle n'apparaît pas après croissance en milieu complexe - et elle est due à l'action d'une macromolécule.

Un aspect du phénomène est cependant en défaveur de cette hypothèse, à savoir que la synthèse induite de la protéine inhibitrice est continue et non transitoire. Si la seule fonction de cette macromolécule est la "récupération" par la cellule des constituants de l'enzyme superflu, on voit mal pourquoi, l'enzyme ayant disparu, l'épiprotéine continuerait à être synthétisée. Ce serait là une économie à bien courte vue ! Cette remarque est d'ailleurs tout aussi valable si l'on n'attribue comme fonction à l'épiprotéine que l'inhibition d'activité de l'OTC. Il n'est donc pas déraisonnable d'imaginer que la protéine ligande joue, dans la cellule, un autre rôle et que son action inhibitrice n'est qu'un "accident" ultérieur survenu lors de l'évolution de l'organisme.

Rappelons qu'il y a corrélation absolue entre répression de synthèse de l'OTC et induction de l'épiprotéine et que cette corrélation s'étend aux mutants argR^- .

Une hypothèse a, un moment, été retenue supposant que l'aporépresseur de la synthèse de l'OTC pourrait aussi être l'épiprotéine. En présence d'une concentration intracellulaire d'arginine élevée, il y aurait association des sous-unités de l'aporépresseur, l'oligomère ainsi formé se fixant sur les opérateurs et empêchant la transcription des gènes de structure des enzymes

participant à la biosynthèse de l'arginine, le même oligomère étant susceptible de s'associer à l'OTC et par là d'inhiber son activité. Dans les mutants argR^- , l'association des sous-unités, et donc la séquestration de l'OTC, exige une concentration d'arginine supérieure à celle requise dans la souche sauvage. Ceci implique évidemment que la synthèse de l'aporépresseur est elle-même régulée, mais des mécanismes simples peuvent être imaginés qui permettent une régulation de la synthèse d'un aporépresseur. Si cette hypothèse est exacte, on peut s'attendre à ce que la concentration en arginine nécessaire à la séquestration de l'OTC, mesurée *"in vitro"*, soit plus élevée si l'épiprotéine utilisée provient d'une souche argR^- que si elle est extraite d'une souche sauvage. L'expérience montre qu'il n'en est rien et on peut donc éliminer l'aporépresseur comme candidat éventuel au rôle d'épiprotéine.

Les autres protéines connues, susceptibles de jouer ce rôle et inductibles par l'arginine, sont peu nombreuses et rien ne permet, à priori, de supposer cette fonction à l'un des enzymes du catabolisme de cet acide aminé. Un fait assez inattendu, et que nous avons déjà décrit, a cependant éveillé l'intérêt pour ces enzymes : la non inductibilité du catabolisme de l'arginine dans de nombreuses souches argR^- (Thuriaux *et al.* : 1968). L'induction de l'épiprotéine et la séquestration de l'OTC apparaissent dans toutes les conditions où il y a induction du catabolisme de l'arginine. De très fortes présomptions existent actuellement permettant d'identifier l'épiprotéine et l'arginase : lors de la purification, les deux activités sont toujours associées (Messenguy, Wiame : 1969).

L'induction de l'épiprotéine ne nécessite d'ailleurs pas toujours un apport important d'arginine. En effet, une séquestration non négligeable de l'OTC apparaît lors du transfert des cellules de levure d'un milieu minimum (NH_4^+) à un milieu où le glutamate est la seule source d'azote. Bien que, en état de régime, le pool d'arginine soit légèrement plus élevé lors de la croissance dans le second milieu, cette séquestration pourrait être considérée comme étant le résultat d'une dérégulation catabolique de l'arginase.

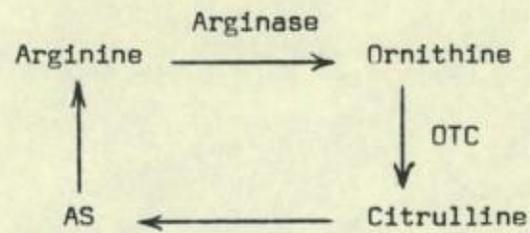
S'il est confirmé que arginase et épiprotéine ne forment qu'une seule et même molécule, il est plus que probable que, au cours de l'évolution, la première fonction est apparue avant la seconde. La sélection et le maintien

de celle-ci permet de la considérer comme avantageuse pour la cellule qui la possède.

L'ornithine, acide aminé non incorporé dans les protéines, est un métabolite intermédiaire tant de l'anabolisme que du catabolisme de l'arginine. De plus, l'ornithine est à l'origine de la synthèse de di- ou polyamines dont la fonction, si elle n'est pas encore clairement établie, pourrait être importante dans la neutralisation des charges négatives des acides nucléiques. L'ornithine est donc un intermédiaire métabolique dont la présence est indispensable dans la cellule et cette présence est assurée par le fait même de son appartenance aux 2 métabolismes de l'arginine, quelles que soient les conditions de croissance, l'un d'eux doit être fonctionnel. Le couplage du contrôle du catabolisme et de l'anabolisme est une assurance supplémentaire. Ceci implique évidemment qu'il n'y a pas de compartimentation au niveau de l'ornithine endogène et que cet acide aminé est également utilisable pour tous les besoins cellulaires quelle que soit la réaction qui lui donne naissance.

Mais, ceci dit, on peut s'étonner de trouver pour l'OTC, enzyme dont l'ornithine est substrat, une telle activité spécifique et l'on s'attendrait plutôt à voir de fortes activités pour les enzymes menant du glutamate à l'ornithine et des activités plus réduites pour les enzymes de la séquence ornithine + arginine. Est-ce précisément pour freiner le flux de métabolite en aval de l'ornithine que la fonction inhibitrice de l'arginase est apparue ? S'il en est ainsi, ce n'est certes pas la solution la plus économique, ni la plus efficace, il eut été bien plus aisé de réduire la vitesse de synthèse de l'OTC.

Répression et induction ne sont pas des mécanismes de contrôle de "tout ou rien" et il est évident que la biosynthèse et la dégradation de l'arginine peuvent coexister dans certaines conditions de croissance. L'une de ces conditions est la transition d'un milieu dépourvu, à un milieu contenant de l'arginine. Les enzymes biosynthétiques existent encore, alors que les enzymes de dégradation sont induits. Dans ces conditions, peut s'amorcer un cycle totalement inutile où l'arginine serait dégradée et resynthétisée selon le processus schématisé page 119. Ce cycle continuerait à fonctionner tant que la concentration en enzymes répressibles serait suffisante.



Cette fuite pourrait être colmatée par l'existence d'une OTC sensible à une rétroaction négative de l'arginine ou, aussi simplement, par l'action inhibitrice d'une molécule qui sera induite dans ces conditions, par exemple, l'arginase.

°
° °

R E S U M E

Un modèle élégant a été proposé, en 1961, par Jacob et Monod pour le contrôle de la vitesse de synthèse des enzymes du système lactose dans *Escherichia coli*. Malgré quelques dissonances, il semble que ce mécanisme puisse être appliqué à la régulation de nombreuses synthèses protéiques dans les bactéries.

Nous avons tenté de voir dans quelle mesure ce schéma peut aussi être étendu à la levure et cela pour l'un des enzymes de la biosynthèse de l'arginine : l'OTC.

La vitesse de synthèse de cet enzyme est sensible à la concentration intracellulaire d'arginine, et l'amplitude de ses variations peut être très importante. Des mutations peuvent être obtenues qui altèrent le contrôle exercé sur cette synthèse par l'acide aminé, mutations qui n'affectent pas la perméabilité cellulaire. L'hypothèse la plus probable situe ces mutations dans des cistrons codant la synthèse de trois polypeptides nécessaires à la formation de l'aporépresseur; ceci n'est absolument pas en contradiction avec le modèle classique, la non contiguité de ces cistrons dans la levure peut n'être que le reflet de la dispersion générale des gènes de structure dans les eucaryotes.

Mais la difficulté d'interprétation résulte de ce que ces trois groupes de mutations, phénotypiquement identiques, mais génétiquement distincts, ne permettent qu'une dérépression partielle et constante de l'OTC. Comme il est peu vraisemblable que, dans tous les mutants sélectionnés, l'affinité des sous-unités entre elles ait été réduite dans les mêmes proportions, il faut imaginer que cet état de fait traduit l'existence, soit d'autre(s) sous-unité(s) ayant une certaine affinité pour les opérateurs, soit d'un second mode de contrôle de la vitesse de synthèse des enzymes s'exerçant, par exemple, au niveau de la traduction des messagers. Le choix de l'une ou l'autre de ces solutions est, pour le moment, difficile; la recherche de très nombreux mutants de régulation

pourrait favoriser - ou non - le premier volet de cette alternative, la démonstration de l'existence du second état, actuellement, pratiquement impossible dans la levure.

L'OTC s'est cependant révélée être un enzyme très particulier : il est capable, en présence d'effecteurs, de s'associer à une protéine, association qui lui fait perdre son activité. L'un des effecteurs étant l'arginine, ce mécanisme mime une rétroinhibition - ici assez grossière puisque irréversible *in vivo* -.

Cette séquestration de l'OTC se distingue cependant des déadaptations déjà décrites dans la levure. L'association OTC - protéine inhibitrice est réversible *in vitro*, ce qui en a grandement facilité l'étude et permis de montrer que, seule l'activité de l'enzyme est abolie sans destruction de la protéine enzymatique.

Dans *Saccharomyces cerevisiae*, l'OTC est donc soumise à une régulation complexe; l'addition d'arginine dans le milieu de culture provoque une diminution importante de la vitesse de synthèse de l'enzyme et induit une séquence catabolique dont le premier chaînon peut inhiber l'activité de l'OTC excédentaire.

La raison d'être de ce double contrôle ne nous apparaît pas clairement même si des hypothèses plausibles peuvent être imaginées. Les *Saccharomyces* sont d'ailleurs, jusqu'à présent, le seul genre dans lequel ce phénomène a pu être mis en évidence et des genres réputés voisins en sont dépourvus.

MATERIEL ET METHODES

MILIEUX DE CULTURE

Le milieu minimum est un milieu minéral (n° 149), glucosé à 3 % et auquel est ajoutée une solution de vitamines (voir Grenson *et al.*: 1966); NH_4^+ y est la source d'azote.

Le milieu minéral n° 150 est identique au milieu 149, mais est dépourvu de source d'azote; ce milieu est utilisé lorsqu'on désire éviter l'effet inhibiteur de l'ammonium sur la pénétration des acides aminés dans la levure.

Les acides aminés sont ajoutés à raison de 200 $\mu\text{g/ml}$ dans le milieu 149 ou 1 mg/ml dans le milieu 150, sauf indications contraires.

Ces milieux sont, éventuellement, solidifiés par addition de 2 % de gélose.

CULTURE DES LEVURES

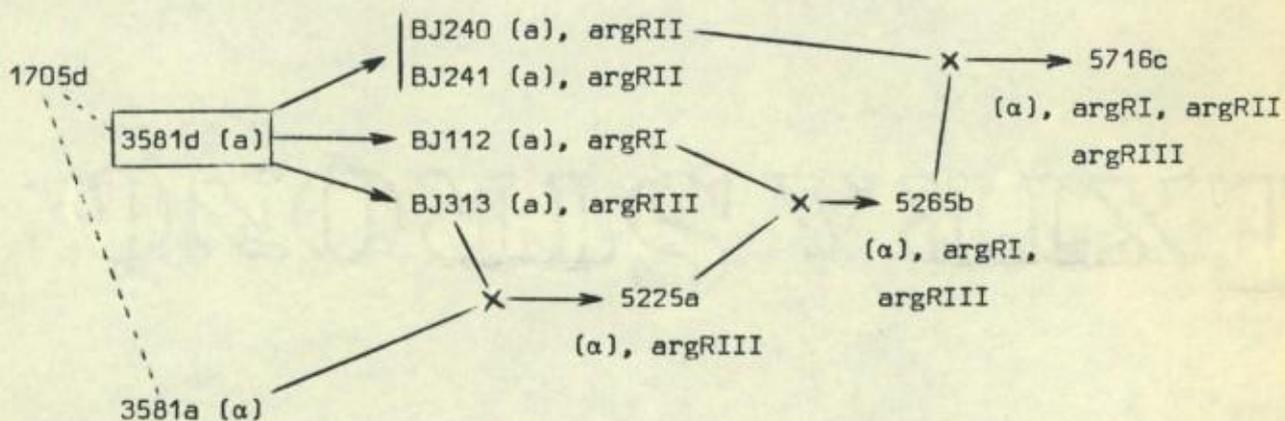
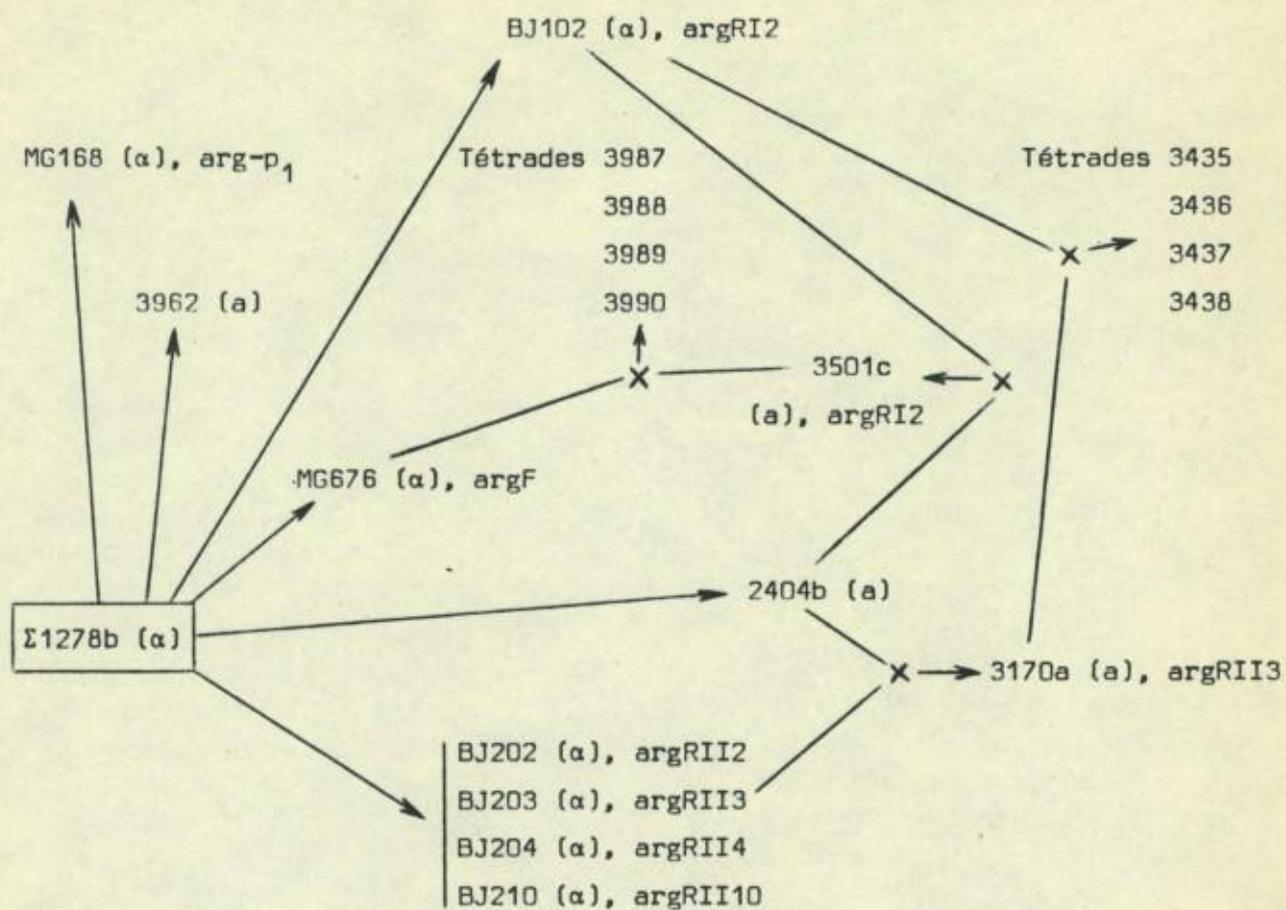
Les incubations sont faites à 29°C, sur plateau tournant pour les cultures en milieux liquides.

L'évolution de la population cellulaire est suivie par mesures de densité optique (D.O.) à 660 m μ à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman B. (La réponse n'étant pas linéaire, une correction est nécessaire).

SOUCHES

Toutes les souches utilisées sont des *Saccharomyces cerevisiae* issues des souches YF (α), YF (a), DP1-1Da (Slonimski) et 1422-11D (Howthorne).

Dans la mesure du possible, des comparaisons ne sont établies qu'entre souches isogènes; leurs filiations sont données dans le tableau suivant:



1422c $argRI$

DE14

YF (a)

MUTAGENESE

HNO₂ : Selon F. Lacroute (1966).

- 1 ml suspension de levure ($\sim 2 \times 10^7$ cellules)
- + 5 ml tampon acétate 0,2 N, pH 4,0
- + 0,3 ml NaNO₂ 0,1 M
- + 3,7 ml H₂O.

Après 30 minutes d'agitation, à 30°C (~ 1 % de survie), la suspension est neutralisée par addition de 10 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0.

EMS : (Ethyle méthane sulfonate), selon Lindegren *et al.* (1965).

- 0,3 ml EMS (Eastman Kodak)
- 9,2 ml tampon phosphate 0,2 M, pH 8,0
- 0,5 ml glucose 40 %
- + 10^7 à 10^8 cellules par ml.

Incuber 1 h à 30°C. La mutagénèse est arrêtée par addition de 9,8 ml de thiosulfate Na à 6 % pour 0,2 ml de suspension.

R,X. ou U,V. : Irradiation d'une suspension de cellules de façon à ne garder que 1 à 2 % de survivants.

PERMEABILISATION DES CELLULES DE LEVURE

La culture est centrifugée, les cellules remises en suspension dans H₂O bidistillée. Suspension de levures (environ 250 µg poids sec/ml) + 0,025 ml de solution stock de nystatine/ml, maintenue en agitation légère pendant 30 min à 29°C.

Solution stock de nystatine : 3 mg/ml dans méthanol (nystatine = mycostatine Squibb),
+ actidione 20 µg/ml.

EXTRAIT

La suspension de cellules (en général perméabilisées) est passée à la presse de French.

Les débris cellulaires ne sont pas éliminés pour le dosage enzymatique.

DOSAGE DE L'ORNITHINE TRANSCARBAMYLASE

selon Jones *et al.* (1955).

Incubation à 37°C, pendant 30 minutes, du mélange suivant :

- | | | |
|--|------------|-------------|
| - suspension de cellules perméabilisées + H ₂ O | | 1,0 ml |
| - L-ornithine | 37,5 µMole | } .. 1,5 ml |
| - carbamylphosphate (sel de lithium) | 26 µMole | |
| - Tris pH 8 | 375 µMole | |

La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 2,5 ml HCl 0,2 N. Un chauffage à 100°C pendant 10 minutes permet d'éliminer l'excès de carbamylphosphate.

La citrulline produite est dosée dans une fraction de ce volume.

Dosage de la citrulline : (Archibald : 1944).

- | | | |
|--|-------|----------|
| Prise d'incubation + H ₂ O | | 4 ml, |
| Mélange d'acides | | 1, 5 ml, |
| (acide sulfurique concentré 1/4, ac. orthophosphorique concentré 3/4 v/v), | | |
| Butane dione monoxime | | |
| (solution à 3 % dans éthanol) | ... | 0,25 ml. |

Ce mélange doit être homogénéisé par agitation rigoureuse.
Révélation : 30 minutes à 100°C.

L'intensité de la coloration produite est mesurée à 460 mµ.

Activité spécifique d'OTC : μ Mole de citrulline produite par heure, par mg de protéine[∇].

[∇] La teneur en protéine de la suspension de levure est estimée à partir de la D.O. (mesurée au Spekker avec filtres neutres); (1 ml de suspension de levure à D.O. 1,0 contient environ 250 μ g protéine).

B I B L I O G R A P H I E

Abréviations :

- B.B.A. : Biochemica and Biophysica Acta
B.B.R.C. : Biochemical and Biophysical Research Communications
C.S.H.S. : Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology
J.B.C. : Journal of Biological Chemistry
J.M.B. : Journal of Molecular Biology
P.N.A.S. : Proceedings of the National Academy of Sciences

- D.N. Anton : J.M.B. 33, 533 (1968)
M.R. Archibald : J.B.C. 156, 121 (1944)
J.M. Ashworth, M. Sussman : J.B.C. 242, 1696 (1967)
G.S. Attardi, S. Naono, J. Rouviere, F. Jacob, F. Gros : C.S.H.S. 28, 363 (1963)
W.K. Bates, S.C. Hedman, D.O. Woodward : J. Bacteriol. 93, 1631 (1967)
S. Bourgeois, M. Cohn, L.E. Orgel : J.M.B. 14, 300 (1965)
S. Brenner, J.R. Beckwith : J.M.B. 13, 629 (1965)
R.J. Britten, T.F. McClure : Bacteriol. Rev. 26, 292 (1962)
C. Burstein : Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 1901 (1965)
Carbondale Yeast Genetics Conference : Microbiol. Genet. Bull. 19 (suppl.) (1963)
H. Cherest, H. de Robichon : B.B.R.C. 28, 256 (1967)
A.L. Cline, R.M. Bock : C.S.H.S. 31, 321 (1966)
G.N. Cohen, H.O. Halvorson, S. Spiegelman : dans Microsomal particles and protein synthesis p. 100, R.B. Roberts ed. 1958
G.B. Cohen, R. Munier : B.B.A. 31, 378 (1958)
G.N. Cohen, J.C. Patte : C.S.H.S. 28, 513 (1963)
G.N. Cohen, J.C. Patte, P. Truffa-Bochi : B.B.R.C. 19, 546 (1965)
S.S. Cohen, J. Lichtenstein : J.B.C. 235, 2112 (1960)

- J. Daliers : Thèse de doctorat : U.L.B. (1965)
- A. Davies : J. Gen. Microbiol. 14, 425 (1956)
- B.D. Davis : Adv. Enzymology 16, 259 (1955)
- R.H. Davis : Science 142, 1652 (1963)
- R.H. Davis : B.B.A. 107, 54 (1965)
- R.H. Davis : dans Organizational Biosynthesis p. 303, H.J. Vogel, J.O. Lampen,
V. Bryson, ed. 1967
- R.H. Dedeken : B.B.R.C. 8, 462 (1962)
- R.H. Dedeken : B.B.A. 78, 606 (1963)
- B. Dixon, A.H. Rose : J. Gen. Microbiol. 34, 229 (1964)
- B. Dixon, A.H. Rose : Biochem. J. 99, 513 (1966)
- W.D. Donachie : B.B.A. 82, 284 (1964)
- W.D. Donachie : B.B.A. 82, 293 (1964)
- H.C. Douglas, D.C. Hawthorne : Genetics 49, 837 (1964)
- H.C. Douglas, D.C. Hawthorne : Genetics 54, 911 (1966)
- H.C. Douglas, G. Pelroy : B.B.A. 68, 155 (1963)
- W. Duntze, D. Neumann, H. Holzer : Europ. J. Biochem. 3, 326 (1968)
- H.F. Dvorak, Y. Anraku, L.A. Heppel : B.B.R.C. 24, 628 (1966)
- H. Eckstein, V. Paduch, H. Hilz : Europ. J. Biochem. 3, 224 (1967)
- L. Eidlic, F.C. Neidhardt : P.N.A.S. 53, 539 (1965)
- E. Engelsberg, I. Irr, J. Power, N. Lee : J. Bacteriol. 90, 946 (1965)
- H.L. Ennis, M. Lubin : Science 146, 1475 (1964)
- S.J. Ferguson, M. Boll, H. Holzer : Europ. J. Biochem. 1, 21 (1967)
- G.R. Fink, J.R. Roth : J.M.B. 33, 547 (1968)
- W.R. Finkenstadt, M. Laskowski, Jr : J.B.C. 240, 962 (1965)
- L. Fowden, S. Naele, H. Tristram : Nature 199, 35 (1963)
- H. Fukuhara : J.M.B. 17, 344 (1966)
- H. Fukuhara, A. Sels : J.M.B. 17, 319 (1966)
- J. Gallant, R. Stapleton : P.N.A.S. 50, 348 (1963)
- J. Gallant, R. Stapleton : J.M.B. 6, 431 (1964)
- A. Garen, S. Garen : J.M.B. 6, 433 (1963)
- A. Garen, N. Otsusi : J.M.B. 8, 841 (1964)
- S.D. Gero, C. Burstein : B.B.A. 117, 314 (1966)

- W. Gilbert, B. Müller-Hill : P.N.A.S. 56, 1891 (1966)
- W. Gilbert, B. Müller-Hill : P.N.A.S. 58, 2415 (1967)
- N. Glansdorff, G. Sand : B.B.A. 108, 308 (1965)
- L. Glaser, A. Melo, R. Paul : J.B.C. 242, 1944 (1967)
- L. Gorini : Bacteriol. Rev. 27, 182 (1963)
- L. Gorini, W. Gundersen, W. Burger : C.S.H.S. 26, 173 (1961)
- M. Grenson, M. Mousset, J.M. Wiame, J. Bechet : B.B.A. 127, 325 (1966)
- H. Halvorson : B.B.A. 27, 267 (1958)
- H.O. Halvorson : J. Exp. Zool. 157, 63 (1966)
- H.O. Halvorson, D.B. Cowie : dans Membrane transport and Metabolism p. 479
A. Kleinzeller, A. Kotyk, ed. 1961
- H.O. Halvorson, S. Winderman, J. Gorman : B.B.A. 67, 42 (1963)
- W. Harris, J.J. Ferguson : Feder. Proc. 26, 678 (1967)
- F.C. Heagy, J.A. Roper : Nature 170, 713 (1952)
- A. Herman, H.O. Halvorson : J. Bacteriol. 85, 895 (1963)
- A. Herman, H.O. Halvorson : J. Bacteriol. 85, 901 (1963)
- I.N. Hirshfield, R. Dedeken, P.C. Horn, D.A. Hopwood, W.K. Maas : J.M.B. 35,
83 (1968)
- H. Holzer, M. Boll, C. Cennamo : Angewan. Chem. 3, 101 (1964)
- H. Holzer, H. Schutt, Z. Mašek, D. Mecke : P.N.A.S. 60, 721 (1968)
- N.H. Horowitz : dans Evolving genes and proteins p. 20, V. Bryson et H.J. Vogel,
ed. 1965
- N.H. Horowitz, H. Macloed : Microbiol. Genet. Bull. 17, 6 (1960)
- K. Ippen, J.H. Miller, J. Scaife, J. Beckwith : Nature 217, 825 (1968)
- C. Ishitani, Y. Ikeda, K. Sakaguchi : J. Gen. Microbiol. 2, 401 (1956)
- F. Jacob, S. Brenner, F. Cuzin : C.S.H.S. 28, 329 (1963)
- F. Jacob et J. Monod : J.M.B. 3, 318 (1961)
- F. Jacob, D. Perrin, C. Sanchez, J. Monod : C.R. Academ. Sci. 250, 1727 (1960)
- F. Jacob, A. Ullman, J. Monod : C.R. Acad. Sci. 258, 3125 (1964)
- G.E. Jacoby, L. Gorini : J.M.B. 39, 73 (1969)
- J.G. Kaplan : J. Gen. Microbiol. 38, 197 (1954)
- H.S. Kingdon, B.M. Shapiro, E.R. Stadtman : P.N.A.S. 58, 1703 (1967)
- S.C. Kinsky : J. Bacteriol. 82, 889 (1962)
- S.C. Kingky : P.N.A.S. 48, 1049 (1962)
- J. Gorman : 1963, cités par H.O. Halvorson : J. Exp. Zool. 157, 63 (1966)

- D.M. Kipnis, E. Reiss, E. Helmreich : B.B.A. 51, 519 (1961)
- K. Kjellin-Ströby : P.N.A.S. 53, 1346 (1965)
- D.E. Koshland, G. Nemethy, D. Filmer : Biochemistry 5, 365 (1966)
- J.S. Kovach, M.A. Berberich, P. Venetianer, R.F. Goldberger : J. Bacteriol. 97, 1283 (1969)
- F. Lacroute : Thèse de Doctorat, Université de Paris 1966
- F. Lacroute : J. Bacteriol. 95, 824 (1968)
- F. Lacroute, A. Pierard, M. Grenson, J.M. Wiame : J. Gen. Microbiol. 40, 127 (1965)
- J.O. Lampen : J. Bacteriol. 74, 297 (1957)
- M. Laskowski, M. Laskowski, Jr. : Adv. Prot. Chem. 9, 203 (1954)
- R. Lavalley, F. Jacob, W.K. Maas : cités par W.K. Maas (1961)
- V. Leick : Nature 217, 1153 (1968)
- W.K. Maas : C.S.H.S. 26, 183 (1961)
- W.K. Maas, R. Maas : P.N.A.S. 48, 1887 (1962)
- W.K. Maas, G.D. Novelli, F. Lipmann : P.N.A.S. 39, 1004 (1953)
- B. Magasanik : dans Informational macromolecules : H.J. Vogel et al. ed. 1963 (p. 279)
- J. Mandelstam : Biochem. J. 69, 110 (1958)
- T.R. Manney : J. Bacteriol. 96, 403 (1968)
- F. Marini, P.M. Arnow, J.O. Lampen : J. Gen. Microbiol. 24, 51 (1961)
- A. Markowitz, N. Rosenbaum : P.N.A.S. 54, 1084 (1965)
- W.H. Matchett, J.A. Demoss : B.B.A. 86, 91 (1964)
- D. Mecke, H. Holzer : B.B.A. 122, 341 (1966)
- A. Melo, L. Glaser : B.B.R.C. 22, 524 (1966)
- F. Messenguy, J.M. Wiame : Arch. Inter. Physiol. Bioch. 77, 165 (1969)
- F. Messenguy, J.M. Wiame : FEBS Letters 3, 469 (1969)
- F. Messenguy, J. Bechet, J.M. Wiame : Arch. Intern. Physiol. Bioch. 75, 889 (1967)
- S.H. Miller, H.M. Sobell : P.N.A.S. 55, 1201 (1966)
- M. Minet, P. Thuriaux, J.M. Wiame, J. Bechet, M. Grenson : en préparation
- J. Monod : dans Unités biologiques douées de continuité génétique p. 181, C.N.R.S. Paris ed. (1949)
- J. Monod, F. Jacob : C.S.H.S. 26, 389 (1961)

- J. Monod, J.P. Changeux, F. Jacob : J.M.B. 6, 306 (1963)
- J. Monod, A.M. Pappenheimer, Jr., G. Cohen-Bazire : B.B.A. 9, 648 (1952)
- J. Monod, J. Wyman, J.P. Changeux : J.M.B. 12, 88 (1965)
- R.K. Mortimer, D.C. Hawthorne : Ann. Rev. Microbiol. 20, 151 (1966)
- E. Moustacchi, D.H. Williamson : B.B.R.C. 23, 56 (1966)
- R. Munier, : C.R. Acad. Sci. 250, 3524 (1960)
- R.L. Munier, G.N. Cohen : B.B.A. 21, 592 (1956)
- R. Munier, G. Sarrazin : C.R. Acad. Sci. 259, 677 (1964)
- D. Nakata, B. Magasanik : J.M.B. 8, 105 (1964)
- M.M. Nass, S. Nass, B. Afzelius : Exptl. Cell Res. 37, 516 (1965)
- M. Nazario : B.B.A. 145, 138 (1967)
- M. Nazario : B.B.A. 145, 146 (1967)
- F.C. Neidhardt : Bacteriol. Rev. 30, 701 (1966)
- H.C. Neu : J.B.C. 242, 3905 (1967)
- H. Neurath : Adv. Prot. Chem. 12, 319 (1957)
- R.P. Novick, W.K. Maas : J. Bacteriol. 81, 236 (1961)
- M. Ogur, S. Minckler, G. Lindegren, C.C. Lindegren : Arch. Bioch. Biophys. 40,
175 (1952)
- A.B. Pardee, A.C. Wilson : Cancer Res. 23, 1483 (1963)
- J.C. Patte, G. Lebras, G.N. Cohen : B.B.A. 136, 245 (1967)
- A. Pierard : Science 154, 1572 (1966)
- A. Pierard, J.M. Wiame : B.B.R.C. 15, 76 (1964)
- A. Pierard, N. Glansdorff, M. Mergeay, J.M. Wiame : J.M.B. 14, 23 (1965)
- M. Ptashne : Nature 214, 232 (1967)
- F. Ramos, P. Thuriáux , J.M. Wiame, J. Bechet : en préparation
- J.M. Ravel, B.F. Mollenhauer, W. Shive : J.B.C. 236, 2268 (1961)
- M.H. Richmond : Biochem. J. 73, 261 (1959)
- A.D. Riggs, S. Bourgeois : J.M.B. 34, 361 (1968)
- A.D. Riggs, S. Bourgeois, R.F. Newby, M. Cohn : J.M.B. 34, 365 (1968)
- J.J. Robertson, H.D. Halvorson : J. Bacteriol. 73, 186 (1957)
- H. de Robinchon-Szulmaster : Bull. Soc. Chim. Biol. 49, 1431 (1967)
- H. de Robinchon-Szulmaster, Y. Surdin, Y. KarasseWitch, D. Corrivaux : Coll.
Intern. C.N.R.S., n° 124, 255 (1963)

- J.R. Roth, B.N. Ames : J.M.B. 22, 325 (1966)
- J.R. Roth, D.F. Silbert, G.R. Fink, M.J. Voll, D. Anton, P.E. Hartman, B.N. Ames : C.S.H.S. 31, 383 (1966)
- F. Rudert, H.O. Halvorson : Bull. Res. Counc. of Israel 11A4, 337 (1963)
- J.R. Sadler, A. Novick : J.M.B. 12, 305 (1965)
- T. Satyanarayana, H.E. Umbarger, G. Lindegren : J. Bacteriol. 96, 2012 (1968)
- T. Satyanarayana, H.E. Umbarger, G. Lindegren : J. Bacteriol. 96, 2018 (1968)
- C.F. Schachtele, P. Rogers : J.M.B. 14, 474 (1965)
- R.T. Schimke : J.B.C. 239, 3808 (1964)
- R.T. Schimke; E.W. Sweeney, C.M. Berlin : J.B.C. 240, 322 (1965)
- M. Shepherdson, A.B. Pardee : J.B.C. 235, 3233 (1960)
- J.H. Schwartz, W.K. Maas : J. Bacteriol. 79, 794 (1960)
- R.W. Seed, I.H. Goldberg : P.N.A.S. 50, 275 (1963)
- D.E. Sheppard, E. Engelsberg : J.M.B. 25, 443 (1967)
- M.R. Siegel, H.D. Sisler : B.B.A. 87, 70 (1964)
- M.R. Siegel, H.D. Sisler : B.B.A. 87, 83 (1964)
- M.R. Siegel, H.D. Sisler : B.B.A. 103, 558 (1965)
- A.E. Silverstone, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, J.H. Miller, J.R. Beckwith : Nature 221, 1012 (1969)
- O. Skold, J.M. Buchanan : P.N.A.S. 51, 553 (1964)
- P.P. Slonimski : La formation des enzymes respiratoires chez la levure, Masson ed. 1953
- P.P. Slonimski, R. Acher, G. Pere, A. Sels, M. Somlo : Coll. Intern. C.N.R.S., n° 124, 435 (1963)
- S. Spiegelman : C.S.H.S. 11, 256 (1946)
- S. Spiegelman, S.M. Reinert : J. Gen. Physiol. 31, 175 (1947)
- A.M. Srb : C.R. Trav. Lab. Carlsberg Série Physiol. : 26, 363 (1956)
- R.Y. Stanier : J. Bacteriol. 54, 339 (1947)
- G. Stent : Science 144, 816 (1964)
- B.S. Strauss, R. Marone : B.B.R.C. 29, 143 (1967)
- M. Sussman : B.B.R.C. 18, 763 (1965)
- H. Tabor, C.W. Tabor, S.M. Rosenthal : Ann. Rev. Biochem. 30, 579 (1961)
- K.K. Tewari, J. Jayaraman, M.R. Mahler : B.B.R.C. 21, 141 (1965)
- P. Thuriaux, F. Ramos, J.M. Wiame, M. Grenson, J. Bechet : Arch. Intern. Physiol. Biochim. 76, 955 (1968)
- P. Thuriaux, J.M. Wiame, M. Grenson, J. Béchet : en préparation.

- M. Tingle, J. Gorman, A. Herman : *Bacteriol. Proc.* 1964 p. 107
- S. Udaka : *J. Bacteriol.* 91, 617 (1966)
- H.G. Umbarger : *Science* 123, 848 (1956)
- M.F. Utter, E.A. Duell, C. Bernofsky : dans *Some aspects of yeast metabolism*,
Mills ed. (1968)
- H.J. Vogel : *P.N.A.S.* 39, 578 (1953)
- S. Vyas, W.K. Maas : *Arch. Bioch. Biophys.* 100, 542 (1963)
- W.E.C. Wacker, G.A. Schoenenberger : *B.B.R.C.* 22, 291 (1966)
- J.B. Walker : *J.R.C.* 236, 493 (1961)
- N.S. Willetts : *B.B.R.C.* 20, 692 (1965)
- D. Winge, C. Roberts : *Compt. Rend. Trav. U. Lab. Carlsberg : Sci. Physiol.* 24,
263 (1948)
- B.E. Wright : *Science* 153, 830 (1966)
- M. Yanif, F. Gros : dans *Genetic elements : properties and functions*; D. Shugar
ed. 1967
- C. Yanofsky, J. Itu, V. Horn : *C.S.H.S.* 31, 151 (1966)

T A B L E D E S M A T I E R E S

BUT DU TRAVAIL	p. 1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	
<u>Chapitre I : Régulation de synthèse protéique dans les bactéries</u>	p. 3
- Le modèle de Jacob et Monod,	p. 4
- Nature de l'aporéresseur,	p. 5
- Nature de l'effecteur,	p. 8
- Site d'action du répresseur	p. 10
- Difficultés dans la généralisation du modèle,	p. 12
<u>Chapitre II : L'induction des chaînes cataboliques dans les eucaryotes</u>	p. 15
<u>Chapitre III : La répression des chaînes biosynthétiques dans les eucaryotes</u>	p. 25
<u>Chapitre IV : Contrôle de l'activité des enzymes</u>	p. 31
- Activation des zymogènes,	p. 34
- Stabilisation et sensibilisation d'enzymes,	p. 34
- Inactivation,	p. 37
DEUXIEME PARTIE .	
<u>Chapitre V : Introduction, la biosynthèse de l'arginine</u>	p. 44

Résultats :

Chapitre VI : Régulation de synthèse de l'OTC

- Perméabilisation des cellules,
la nystatine. p. 51
- Répressibilité de l'OTC. p. 54
- Souches de *Saccharomyces cerevisiae*. p. 61

Chapitre VII : Mutants de régulation

- Analogues d'acides aminés. p. 67
- Recherche de mutants de régulation. p. 72
- Analyse enzymatique des mutants. p. 79
- Analyse génétique des mutants. p. 80
- Dosage de gènes p. 83
- Nature des mutants de régulation p. 86

Chapitre VIII : Inactivation de l'OTC

- Mise en évidence du phénomène. p. 94
- Rôle de la synthèse protéique dans
l'inactivation de l'OTC. p. 99
- Action des analogues d'acides aminés. p. 104
- Réactivation thermique. p. 106
- Hétérogénéité des souches. p. 109
- La séquestration dans les mutants argR. p. 111
- Etude *in vitro*. p. 113
- Rôle physiologique de la séquestration
de l'OTC. p. 115

RESUME p. 120

MATERIEL ET METHODES p. 122

BIBLIOGRAPHIE p. 127

