

N° d'ordre : 151

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
U.F.R. Sciences Fondamentales et Appliquées

par

BONAVENTURE MBAYA

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

Diplôme National — Arrêté du 5 juillet 1984

Spécialité : Biochimie

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA BIOSYNTHÈSE DES STEROLS CHEZ LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

soutenue le 23 juin 1988 devant la Commission d'Examen :

Mme M.A. HARTMANN, Directeur de Recherches CNRS. Institut de Botanique de Strasbourg
(Président rapporteur)

MM. M. AIGLE, Professeur, Université de Bordeaux

Y. CENATIEMPO, Professeur, Université de Poitiers (rapporteur)

F. NAU, Professeur, Université de Poitiers

Y. TOURTE, Professeur, Université de Poitiers

F. KARST, Professeur, Université de Poitiers

Ce mémoire est l'aboutissement d'un travail de recherches effectué au laboratoire de Biochimie et Génétique des microorganismes, J.E. C.N.R.S. 034620, Université de Poitiers. Il témoigne donc de la formation intellectuelle, scientifique et technique que j'y ai reçue. Je dois exprimer, ici, toute ma gratitude envers Monsieur le Professeur F. Karst qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et me guider, 5 années durant, dans l'évolution de ce travail, même dans les moments difficiles. J'ai pu ainsi bénéficier de son esprit scientifique rigoureux qui donne à tous le besoin de toujours faire mieux.

Je suis très honoré de la présence de Mme M.A. Hartmann, Directeur de Recherches C.N.R.S. à l'Institut de Botanique de Strasbourg, qui a bien voulu accepter la présidence du jury.

Qu'à travers ces lignes, Messieurs les professeurs M. Aigle, Y. Cenatiempo, F. Nau et Y. Tourte trouvent ici toute ma reconnaissance et tous mes remerciements pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail, en acceptant de participer à ce jury.

Pendant ce travail, j'ai profité de l'expérience et des conseils de Mlle M. Servouse, Maître de Conférences, dont la rigueur, aussi bien en matière de propreté expérimentale que dans l'interprétation scientifique des résultats m'a été d'une grande utilité. Par sa disponibilité, elle a toujours su, prêter une oreille attentive aux difficultés que j'ai pu rencontrer dans ma progression et m'apporter l'aide dont j'avais besoin. Qu'elle veuille bien accepter mes très sincères remerciements.

J'aimerais associer à ces remerciements, Monsieur M. Guilloton, Maître de Conférences, qui, entre deux séances de travaux dirigés, a toujours trouvé le temps de me faire bénéficier de son expérience de biochimiste.

J'adresse également mes remerciements à :

D. Guyonnet qui, par sa disponibilité, son enthousiasme et son amitié, m'a préparé les produits et l'ensemble des milieux de cultures qui ont été utilisés dans ce travail.

à Mlle L. Bourlonton qui a effectué avec soin ce travail dactylographique, malgré des conditions souvent difficiles.

Je ne saurais terminer cette page sans remercier très sincèrement tous les membres du laboratoire : Ahmad, Marc, Christophe, Véronique et tous les autres, pour leur sympathie. Chacun, à quelque niveau que ce soit, a su apporter sa contribution à la création de cette bonne ambiance détendue, qui atténue les difficultés du travail. Je les assure, très sincèrement, de toute mon amitié.

Je dédie ce travail à toute ma famille restée dans cette Afrique lointaine mais si proche, je ne pourrais écrire ici, les noms de ceux sur qui j'ai pu m'appuyer, depuis mes parents et mes grands-parents qui m'ont montré le chemin de la sagesse, de la perfection et de la rigueur morale, jusqu'à mon épouse et nos enfants qui m'ont appris la folie de vivre.

Enfin, à vous tous qui, alliés de l'ombre, ne pourrez lire ces pages, obscures à vos yeux, je propose ces quelques lignes, reflet de ma raison de vivre :

Les anciens n'avaient pas nos instruments de laboratoire ni notre méthode expérimentale ; mais par leur intuition de génie, servie certainement par des moyens que nous pressentons à peine, ils avaient compris ce que la Science a découvert et vérifié peu à peu au moyen de ses procédés propres : l'Unité des forces de la Nature, l'Unité des éléments, l'Unité de la matière ; au point que les corps simples ont cessé d'être irréductibles les uns aux autres

et que chimistes, physiciens et biologistes les considèrent comme de simples arrangements atomiques, expliquant ainsi l'un des rouages de la Vie.

Ainsi, de nos jours, les vérités fondamentales de la Vie ne s'expriment plus sous le langage imagé des symboles ; elles se formulent en termes scientifiques, de telle sorte qu'au symbole du Feu-principe des anciens, les Sciences modernes recourent à l'hypothèse de l'énergie comme base des phénomènes physiques.

En fait, ce que la science a transformé, depuis le siècle des lumières, ce n'est certainement pas la Connaissance, mais l'ensemble des a-priori sur lesquels nous bâtissons notre image du monde.

ABRÉVIATIONS UTILISÉES

| | |
|-------------------|---|
| AMV | : Acide mévalonique |
| AMVP | : Acide mévalonique phosphate |
| AMVPP | : Acide mévalonique pyrophosphate |
| ATP | : Adénosine 5' triphosphate |
| CoA | : Coenzyme A |
| DTT | : Dithiothréitol |
| EDTA | : Ethylene diaminetetracetic acid |
| FPP | : Farnésyl pyrophosphate |
| G6P | : Glucose 6 phosphate |
| G6PDH | : Glucose 6 phosphate déshydrogénase |
| HMG CoA | : β hydroxy β - méthylglutaryl Coenzyme A |
| IPP | : Isopentényl pyrophosphate |
| KOH | : Potasse |
| KF | : Fluorure de potassium |
| MgCl ₂ | : Chlorure de magnésium |
| MnCl ₂ | : Chlorure de manganèse |
| NADP, NADPH | : β -Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate et sa forme réduite |
| PEP | : Phosphoénol pyruvate |
| PK | : Pyruvate kinase |
| TCA | : Trichloroacetic acid |
| Tris | : Tris (hydroxymethyl) aminométhane |
| Triton X 100 | : Octyl phenoxy polyéthoxyéthanol |
| Tween 80 | : Polyoxyethylene sorbitan mono-oleate |
| TS | : Thermosensible |

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| <u>INTRODUCTION GENERALE</u> | 1 |
| I - BIOSYNTHESE DES STEROLS ET DES ISOPRENOIDES | 6 |
| II - LOCALISATION DES ENZYMES DE LA BIOSYNTHESE DES STEROLS | 12 |
| III - MUTANTS ISOLES | 13 |
| IV - REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES STEROLS ET METHODOLOGIE D'APPROCHE DANS L'ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION | 13 |

CHAPITRE I

| | |
|---|----|
| <u>MATERIEL ET METHODES</u> | 18 |
| I - MATERIEL | 19 |
| 1. Souches utilisées | 19 |
| 2. Nomenclature | 20 |
| II - METHODES | 20 |
| 1. Techniques de culture | 20 |
| 1.1. Milieux de culture | 20 |
| 1.2. Conditions de culture | 23 |
| 1.2.1. Cultures en milieu Liquide | 23 |
| 1.2.2. Cultures en milieu solide | 23 |
| 2. Mesure de la croissance cellulaire | 24 |
| 2.1. Sur milieu solide | 24 |
| 2.2. En milieu liquide | 24 |
| 3. Détermination du poids sec | 24 |
| 4. Techniques génétiques | 25 |

| | |
|---|----|
| 4.1. Détermination des phénotypes des souches | 25 |
| 4.2. Croisement et détermination du signe sexuel | 25 |
| 4.3. Test d'allélisme phénotypique ou test de complémentation | 26 |
| 4.4. Isolement des zygotes | 26 |
| 4.5. Mutagenèse par irradiation aux ultra-violets | 26 |
| 5. Obtention des fractions membranaires et des enzymes solubles | 26 |
| 5.1. Préparation de la fraction enzymatique brute (12000 g) | 26 |
| 5.2. Préparation des fractions microsomales et des enzymes solubles | 27 |
| 6. Préparation des substrats purifiés | 27 |
| 6.1. Préparation du squalène 2-3 époxyde | 27 |
| 6.2. Préparation des solutions de composés entrai- neurs | 28 |
| 6.2.1. L'ergostérol | 28 |
| 6.2.2. Le lanostérol | 29 |
| 6.2.3. Le squalène | 29 |
| 7. Marquage de la voie de biosynthèse des stérols par des substrats radioactifs | 29 |
| 7.1. Incubation de cellules en présence d'acétate de sodium [¹⁴ C] | 30 |
| 7.2. Incubation de cellules perméabilisées en pré- sence d'AMV [¹⁴ C] ou de FPP [¹⁴ C] | 30 |
| 7.3. Cinétique d'incorporation de l'acétate de sodium [¹⁴ C] | 33 |
| 8. Dosages biochimiques..... | 34 |
| 8.1. Dosage du squalène et de l'ergostérol | 34 |

| | |
|--|----|
| 8.1.1. Saponification et extraction | 34 |
| 8.1.2. Dosage photolorimétrique du squalène | 34 |
| 8.1.3. Dosage de l'ergostérol par spectrophotométrie ... | 35 |
| 8.2. Dosage des protéines | 37 |
| 8.2.1. Quantification rapide des protéines | 37 |
| 8.2.2. Dosage par la méthode du biuret | 37 |
| 9. Techniques Analytiques des produits réactionnels | 38 |
| 9.1. Identification par chromatographie sur plaque de gel de silice (TLC) | 38 |
| 9.2. Identification par réactions chimiques | 39 |
| 9.2.1. Identification du squalène 2-3 époxyde par réaction au perchlorate | 39 |
| 9.2.2. Identification du lanostérol et de l'ergos- térol par acétylation | 40 |

CHAPITRE II

| | |
|---|----|
| CONSEQUENCES DE L'AMPLIFICATION DU GENE ERG 10 CODANT POUR L'ACTIVITE ACETOACETYL CoA THIOLASE : MARQUAGE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES STEROLS PAR L'ACETATE [¹⁴ C]..... | 44 |
| I - STRUCTURE DU PLASMIDE p1 416 | 45 |
| II - MESURE DU TAUX D'ERGOSTEROL DANS LE CLONE TRANSFORME | 48 |
| III - MARQUAGE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES STEROLS PAR L'ACETATE DE SODIUM [¹⁴ C] | 48 |
| 1. Mesure de la vitesse d'incorporation de l'acétate [¹⁴ C]..... | 48 |
| 1.1. Influence du pH | 52 |
| 1.2. Incorporation en fonction du temps | 53 |
| 1.3. Effets de la céruléine sur l'incorporation d'acétate [¹⁴ C] | 58 |
| IV - CONCLUSION | 61 |

CHAPITRE III

| | |
|---|----|
| MESURE DU TAUX D'ERGOSTEROL DANS LES DIPLOIDES HETEROALLELES ... | 62 |
| CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET GENETIQUE DES MUTANTS AUXOTROPHES POUR L'ERGOSTEROL | 64 |
| 1. phénotypes des souches | 64 |
| 2. Blocs enzymatiques des mutants auxotrophes | 65 |
| 3. Réalisation des diploïdes et dosages géniques | 67 |

CHAPITRE IV

| | |
|---|----|
| ETUDE D'UNE SOUCHE DE LEVURE PRESENTANT UNE TENEUR EN STEROLS ELEEVEE : NCYC 739. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE MUTANTS RESISTANTS A L'AMPHOTE- RICINE B | 72 |
| I - ANALYSE DU TAUX DE STEROLS DE LA SOUCHE | 73 |
| II - PHENOTYPE DE LA SOUCHE | 77 |
| III. CARACTERISTIQUES DE L'AMPHOTERICINE B | 77 |
| IV - ISOLEMENT DES MUTANTS RESISTANTS A L'AMPHOTERICINE B | 79 |

CHAPITRE V

| | |
|---|----|
| REGULATION DE L'ACTIVITE SQUALENE SYNTHETASE | 84 |
| I - CARACTERISTIQUES DE LA SQUALENE SYNTHETASE | 85 |
| II - REGULATION DE L'ACTIVITE SQUALENE SYNTHETASE | 85 |
| 1. Synthèse du Farnésyl pyrophosphate [¹⁴ C] | 89 |
| 1.1. Influence du Fluorure de potassium | 91 |
| 1.2. Influence de l'ATP et du phosphoénol pyruvate ... | 93 |
| 1.3. Calcul de l'activité spécifique du FPP [¹⁴ C] produit | 98 |
| 2 - Mesure de l'activité squalène synthétase | 98 |

| | |
|---|-----|
| 2.1. protocole expérimental pour la mesure de l'activité squalène synthétase | 99 |
| 2.1.1. Isolement et fractionnement des produits de réaction | 100 |
| 2.1.2. Calculs et expression des résultats | 100 |
| 2.2. Détermination de l'activité spécifique de la squalène synthétase dans la souche sauvage et les mutants auxotrophes pour l'ergostérol | 101 |
| 2.2.1. Mesure de l'activité squalène synthétase dans la souche sauvage FL100 | 101 |
| a) Activité en fonction du temps | 101 |
| b) Activité en fonction de la concentration en protéines enzymatiques | 102 |
| c) Influence de la température d'incubation | 102 |
| d) Exigences en cofacteurs et localisation de l'enzyme | 106 |
| 2.2.2. Activités squalène synthétase dans les mutants auxotrophes pour l'ergostérol | 108 |
| 2.3. Mesure de l'activité squalène synthétase en anaérobiose | 111 |
| 2.4. Effets de la carence en pantothénate sur la teneur en ergostérol et l'activité squalène synthétase | 113 |
| 2.5. Mesure de l'activité squalène synthétase dans des souches porteuses de plasmides multicopies | 118 |
| III - CONCLUSION | 121 |

CHAPITRE VI

| | |
|--|-----|
| REGULATION DE L'ACTIVITE SQUALENE EPOXYDASE | 123 |
| I - CARACTERISTIQUES DE LA SQUALENE EPOXYDASE | 125 |
| II - MESURE DE L'ACTIVITE ET REGULATION DE LA SQUALENE EPOXYDASE ... | 126 |

| | |
|--|-----|
| 1 - Utilisation du squalène [¹⁴ C] exogène comme substrat | 127 |
| 2 - Utilisation du squalène [¹⁴ C] endogène lié aux microsomes | 130 |
| 3 - Utilisation du FPP [¹⁴ C] comme substrat | 133 |
| 3-1. Incubation de cellules perméabilisées | 133 |
| 3-2. Incubation du FPP [¹⁴ C] avec un extrait acellulaire 12000 g ou avec des microsomes | 137 |
| 3.2.1. Mesure de l'activité squalène époxydase dans la souche sauvage FL100 | 138 |
| a) Activité squalène époxydase en fonction de la concentration en protéines et en fonction du temps | 138 |
| b) Exigences en cofacteurs | 142 |
| c) Effets de détergents, de drogues de la clas- se des allylamines et de certains métabo- lites terminaux de la voie de biosynthèse des stérols : lanostérol et ergostérol, sur l'activité enzymatique | 145 |
| 3.2.2. Mesure de l'activité spécifique squalène époxydase en anaérobiose et en carence en pantothénate | 148 |
| a) Activité squalène époxydase dans des condi- tions anaérobies : induction de la syn- thèse de l'enzyme par l'oxygène | 148 |
| b) Activité squalène époxydase dans des cellu- les carencées en pantothénate | 150 |
| 3.2.3. Activité spécifique squalène époxydase dans les mutants auxotrophes pour les stérols et dans des souches porteuses de plasmides multico- pies | 150 |
| 4. Mesure des activités squalène synthétase et squalène époxy- dase dans les diploïdes $\frac{+}{+}$, $\frac{\text{erg } 9}{+}$ et $\frac{\text{erg } 16}{+}$ | 155 |
| III - DISCUSSION | 157 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 161 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 171 |

I N T R O D U C T I O N

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire a été entrepris en vue de préciser les mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des stérols chez la levure Saccharomyces cerevisiae.

Les stérols sont présents dans toutes les cellules eucaryotiques. Ils sont, de ce fait, très largement répandus dans les règnes végétal et animal. Des espèces comme les insectes ou les crustacés, qui sont incapables de les synthétiser, les puisent dans leur régime alimentaire. Les procaryotes n'en possèdent généralement pas, bien que certaines bactéries, du groupe des archéobactéries, synthétisent des triterpènes de la famille des hopanes, proches des stérols des cellules eucaryotiques (Nes , 1974; Ourisson et al. , 1979 ; Poralla et al., 1986)

Sur le plan de la structure chimique, les stérols sont des alcools tétracycliques, dont le squelette carboné est formé par la polymérisation d'unités isoprènes (2 méthyl 1-3 butadiène). Ils ont 27 à 29 carbones et tous les stérols naturels possèdent un hydroxyle en 3 β . Ils renferment, presque tous, une ou plusieurs doubles liaisons en position 5, 7 ou 22.

Parmi les stérols les plus répandus, on trouve respectivement (fig. 1) :

- Le cholestérol, spécifique des cellules animales
- L'ergostérol, le stigmastérol et le sitostérol, caractéristiques des champignons et des végétaux supérieurs.

Les divers rôles biologiques des stérols ne sont pas encore totalement définis. Mais on sait qu'ils seraient au moins de deux types : un rôle structural d'une part et un rôle physiologique d'autre part.

Sur le plan structural, les stérols font partie des composés fondamentaux de la membrane plasmique, où ils sont intercalés entre les molécules de phospholipides de la bicouche lipidique (Demel et al., 1976). Ils jouent un rôle essentiel dans les propriétés membranaires : fluidité, élasticité, perméabilité (De Gier et al., 1968).

Chez les mammifères la teneur en stérols varie en fonction des tissus (17 % de cholestérol dans la matière sèche du cerveau humain, 0,15 à 0,20 % dans le sang p/v). Dans les cellules de levure, l'ergostérol (ergosta 5-7-22 trienol) est le stérol majoritaire. Il représente 0,5 à 4 % du poids sec selon les souches, et 12 à 20% des lipides totaux. Le rôle structural de l'ergostérol peut être rempli par toute une famille de stérols présentant un pôle hydrophile (hydroxyle en 3 β) et une longue chaîne latérale qui leur donnera une taille (19 Å) compatible avec la demi couche lipidique de la membrane. Ceci a pu être mis en évidence lors de cultures anaérobies, dans lesquelles les cellules de levures exigent un apport exogène de stérols (Andreason et al., 1953) ainsi qu'à l'aide de mutants auxotrophes pour les stérols (Nes., 1977; Henry, 1982; Karst et al., 1986).

A côté de ce rôle structural, on connaît depuis de nombreuses années le rôle physiologique des hormones stéroïdes, dans les cellules animales (progestérone, testostérone) ainsi que chez les insectes : Ecdysone (hormone de la mue) (fig. 1).

Les travaux de Parks et al., 1978, ont mis en évidence l'exigence spécifique en ergostérol pour le fonctionnement des mitochondries de levure. Ainsi, des mutants affectés dans la synthèse de l'ergostérol et accumulant des stérols intermédiaires, deviennent déficients respiratoires (Thompson et al., 1974 (b) ; Parks et al., 1978).

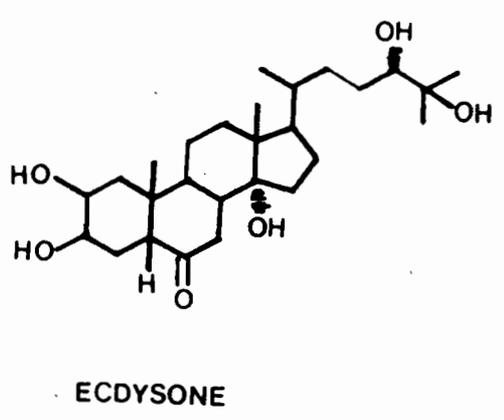
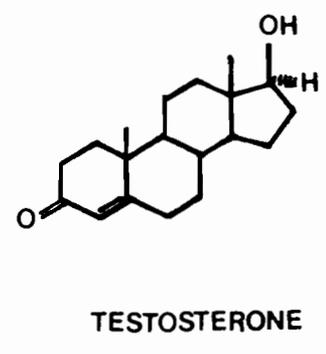
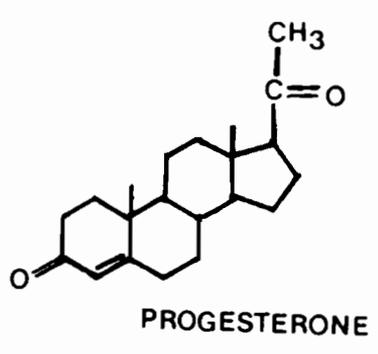
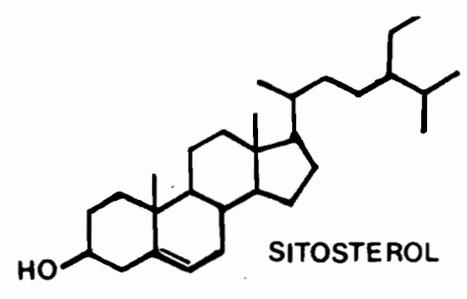
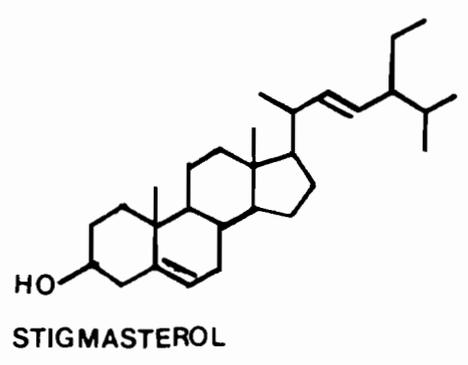
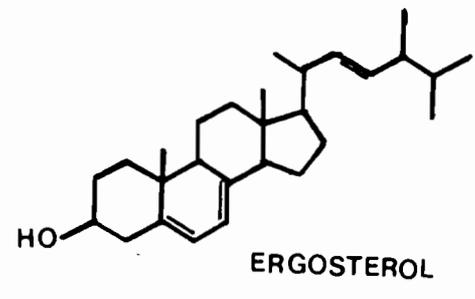
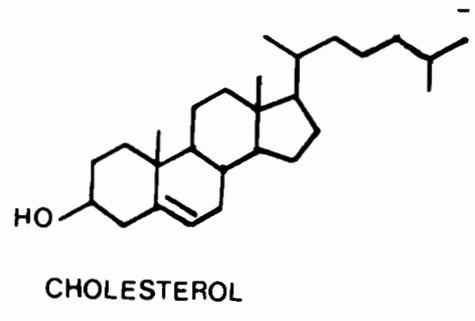


Fig. 1 - STEROLS ET HORMONES STEROIDES

Par ailleurs, Taylor et al., 1983 ont mis en évidence l'effet "sparking". Ils démontrent en effet que si les besoins structuraux peuvent être remplis par une grande variété de stérols (même par le cholestanol), un minimum d'ergostérol $\approx 0,5$ nmole est absolument nécessaire à la viabilité cellulaire. Cette observation a été confirmée par Pinto et al., 1983 : ces auteurs ont montré que les 24 β méthyl stérols étaient strictement exigés pour la croissance en anaérobiose. Très récemment, Dahl et al., 1987, ont montré que des concentrations d'ergostérol de l'ordre de 1 nmole interviendraient dans la régulation du cycle cellulaire. Les stérols auraient donc au moins 3 rôles :

- un rôle structural
- un rôle spécifique dans certains domaines de la membrane (mitochondries)
- un rôle hormonal.

Ces différents rôles sont remplis par les stérols libres. Cependant des esters de stérols, extramembranaires et localisés dans des fractions lipidiques, s'accumulent dans des conditions de croissance ralentie (Bailey et al., 1974). Ils représentent des stérols excédentaires par rapport aux besoins cellulaires. Ils constitueraient une forme de réserve convertible en stérols libres, lorsque la croissance cellulaire est intense ou lorsque la synthèse des stérols est inhibée en anaérobiose (Taylor et al., 1978 ; Taketani et al., 1978).

I - BIOSYNTHESE DES STEROLS ET DES ISOPRENOÏDES

La biosynthèse des stérols est bien connue à ce jour, surtout depuis la découverte des précurseurs effectifs des stérols : l'acétate (Bloch et al., 1942), le squalène (Langdon et al., 1953), le lanostérol (Woodward et al., 1953), le mévalonate (Tavormina et al., 1956) et l'isopentényl pyrophosphate (Bloch et al., 1959).

Les différentes étapes enzymatiques sont représentées dans la fig. 2A.

La première étape est assurée par l'acétoacétyl CoA thiolase, qui catalyse la condensation de deux molécules d'acétyl CoA pour former l'acétoacétyl CoA. Cette molécule, en présence de l'HMG CoA synthétase, se condense avec une 3^e molécule d'acétyl CoA pour donner le β hydroxy - β - méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) (Rabinowitz et al., 1954).

La réduction de l'HMG CoA conduit à la formation de l'acide mévalonique (Durr et al., 1960). Cette réaction est catalysée par l'HMG CoA réductase.

La phosphorylation successive de l'acide mévalonique en acide 5 - phosphomévalonique puis en acide 5 pyrophosphomévalonique est catalysée par des kinases (AMV kinase et AMVP kinase) (Chen et al., 1958). Elle nécessite de l'ATP et des ions manganèse (Cornforth, 1966).

L'acide pyrophosphomévalonique se décarboxyle. Cette réaction de décarboxylation est catalysée par la mévalonate pyrophosphate décarboxylase, elle conduit à la formation de l'isopentényl pyrophosphate.

Une isomérase catalyse la migration de la double liaison de l'isopentényl pyrophosphate pour donner le γ -diméthylallyl pyrophosphate (Agronoff, 1960).

Le diméthylallyl pyrophosphate se condense ensuite avec une molécule d'isopentényl pyrophosphate pour former le géranyl pyrophosphate. Ce dernier se condense à son tour avec une autre molécule d'isopentényl pyrophosphate pour donner le farnésyl pyrophosphate (15 carbones). Une même enzyme catalyse ces deux réactions de condensation : la prényltransférase décrite par Lynen et al., (1958) et Eberhardt et al., (1960).

La squalène synthétase catalyse la condensation de deux molécules de farnésyl pyrophosphate pour former successivement le présqualène pyrophosphate (Rilling, 1966) et le squalène (Schechter et al., 1971).

Les étapes suivantes sont très importantes car elles conduisent à la cyclisation caractéristique de la structure chimique des stérols. Les travaux de Corey et al., 1967, ont permis de préciser les mécanismes de la cyclisation des stérols. Ces auteurs ont montré que le squalène est d'abord oxydé en 2-3 époxyde de squalène, par la squalène époxydase en présence d'oxygène moléculaire.

En aval du 2-3 époxyde de squalène, il y a une dichotomie dans la voie de biosynthèse des stérols, entre le phylum non photosynthétique (animaux, champignons) où l'époxyde de squalène donne le lanostérol (Benveniste et al., 1966 ; Gibbons et al., 1971) et le phylum photosynthétique (algues et végétaux supérieurs) où il est cyclisé en cycloarténol et **B** amyryne (Nes et al., 1965 ; Corey et al., 1967 ; Rees et al., 1968) fig. 2B.

Cette cyclisation est catalysée, chez la levure, par une squalène 2-3 époxyde-lanostérol cyclase (Van Tamelen et al., 1967 ; Bloch et al., 1967 ; Schechter et al., 1970). Les étapes ultérieures de

FIG. 2A - BIOSYNTHESE DE L'ERGOSTEROL CHEZ LA LEVURE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE

- ACTIVITES ENZYMATIQUES -

- (A) : - β CETOTHIOLASE
- (B) : - β HYDROXY- β METHYL GLUTARYL CoA SYNTHETASE
- (C) : - β HYDROXY- β METHYL GLUTARYL CoA REDUCTASE
- (D) : - ACIDE MEVALONIQUE KINASE
- (E) : - ACIDE PHOSPHO MEVALONIQUE KINASE
- (F) : - ACIDE PYROPHOSPHO MEVALONIQUE DECARBOXYLASE
- (G) : - ISOPENTENYL PYROPHOSPHATE ISOMERASE
- (H) : - PRENYL TRANSFERASE
- (I) : - SQUALENE SYNTHETASE
- (J) : - SQUALENE EPOXYDASE
- (K) : - SQUALENE EPOXYDE-LANOSTEROL CYCLASE

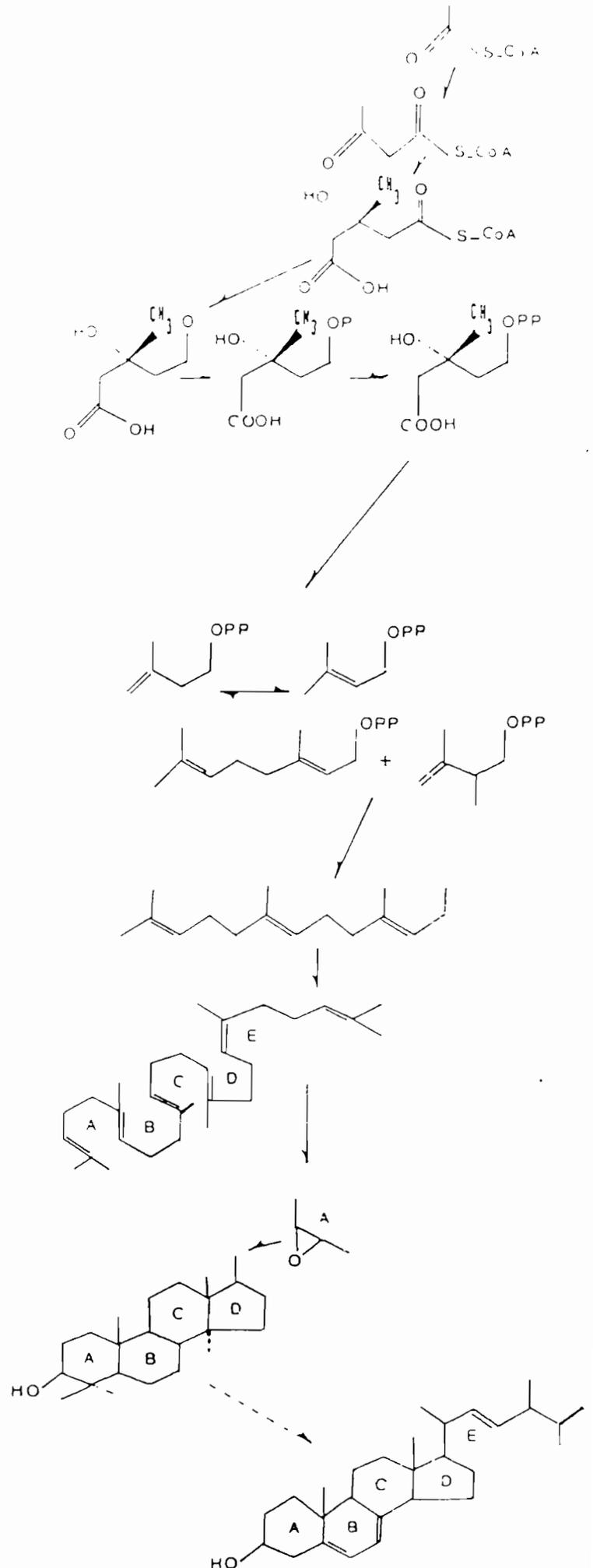
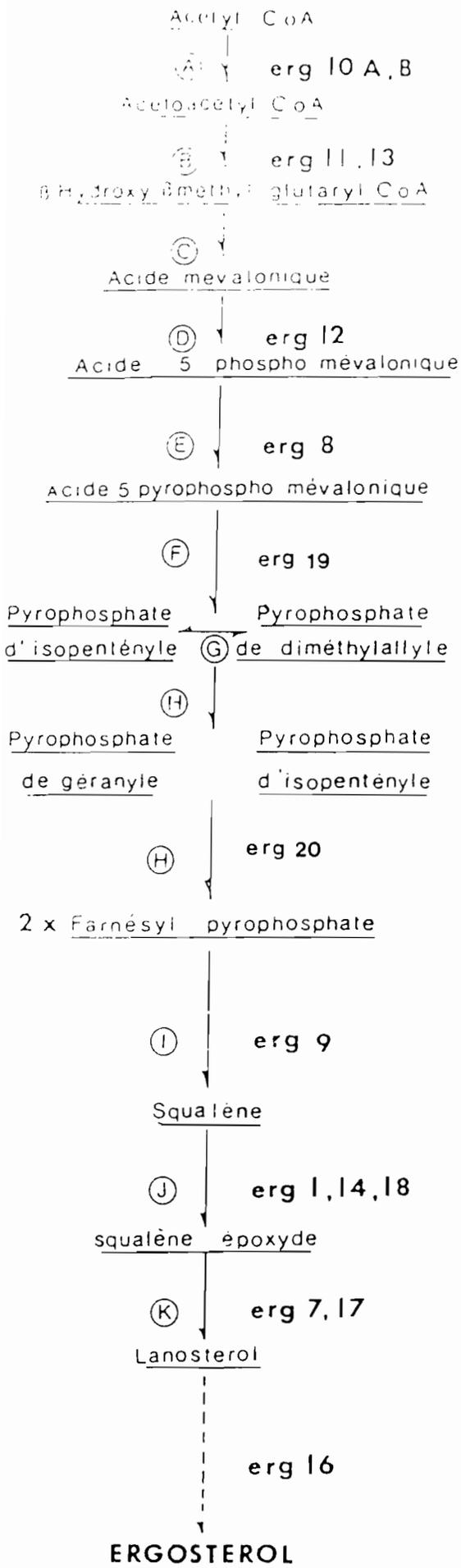
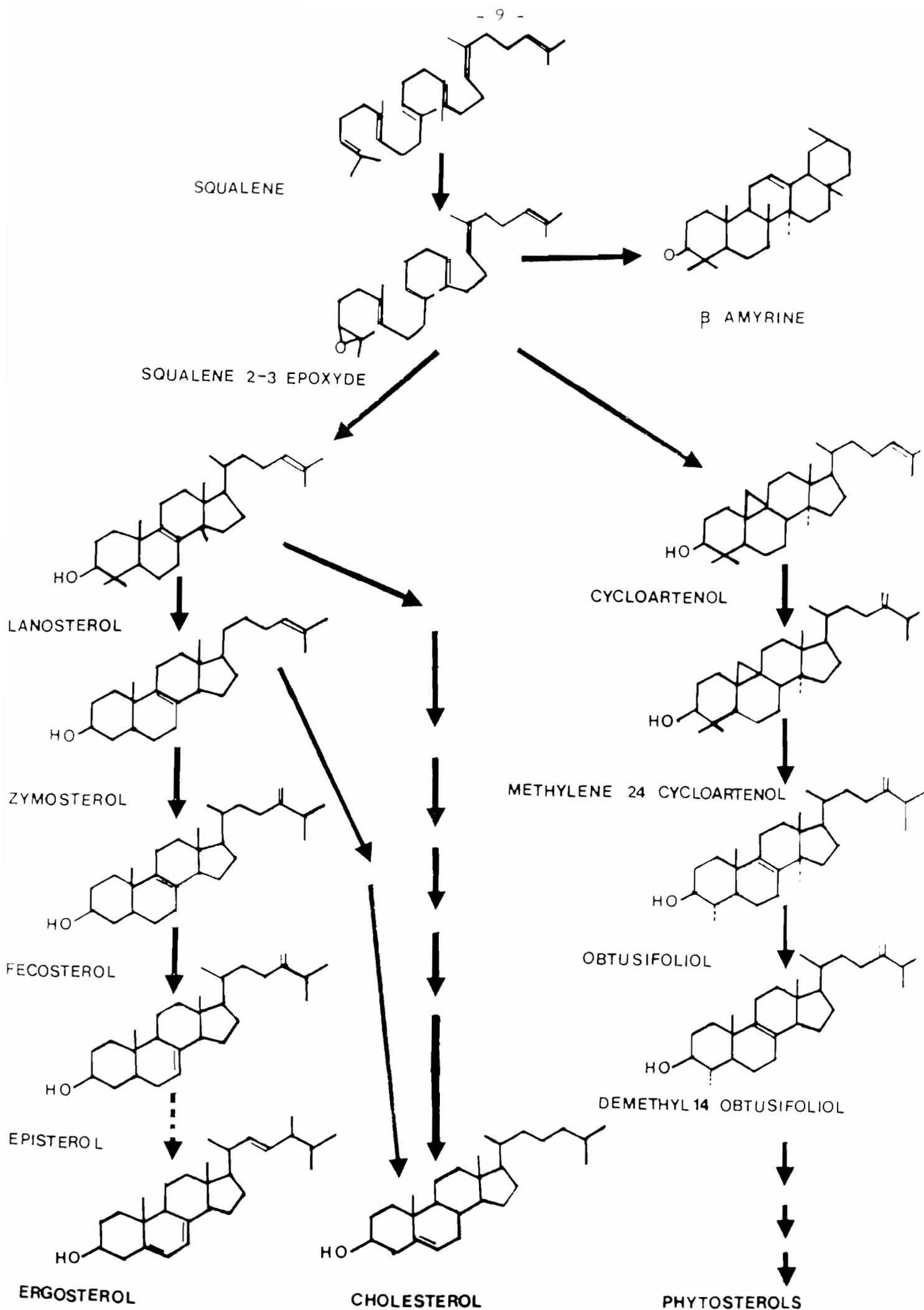


Fig. 2B - PARTICULARITES DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES STEROLS
CHEZ LES CHAMPIGNONS, LES ANIMAUX ET LES VEGETAUX CHLOROPHYLLIENS



transformation du cycloarténol en phytostérols et du lanostérol en cholestérol et en ergostérol, ne seront donc pas identiques.

Chez la levure, la suite des réactions correspondra à :

- la perte de groupements méthyles du lanostérol, d'abord en C₁₄ puis en C₄.
- l'introduction de groupement méthényle en C₂₄ suivi de la réduction de la double liaison,
- la migration et la formation des doubles liaisons Δ_5 , Δ_7 et Δ_{22} .

Ces réactions de fin de chaîne sont représentées fig. 3.

Les enzymes qui les catalysent n'ont pas de spécificité stricte pour le substrat. Elles permettent un système multiple de voies de biosynthèse (Fryberg et al., 1972 et 1973; Barton et al., 1972 et 1973; Osumi et al., 1978).

En plus de la synthèse des stérols (produits majeurs), cette voie de biosynthèse produit, en faible quantité, des molécules importantes sur le plan physiologique. On peut citer :

- Les groupements isopentényls des t RNA sérine et tyrosine.
- La chaîne latérale de l'ubiquinone (coenzyme respiratoire et le dolichol, un polyisoprène impliqué dans la glycosylation des protéines (trans et cis)).

Ces molécules sont synthétisées par une prényltransférase grâce à l'intermédiaire du géranyl-géranyl pyrophosphate. A l'heure actuelle, il reste à montrer si les substrats de l'enzyme sont le farnésyl pyrophosphate et l'IPP ou bien directement l'isopentényl pyrophosphate et le diméthylallylallyl pyrophosphate.

- 1 Squalene
- 2 Squalène 2-3 époxyde
- 3 Lanostérol
- 4 4-4 diméthyl
cholesta-8,14,24- triénol
- 5 14-déméthyllanostérol
- 6 4 α -méthylzymostérol
- 7 Zymostérol
- 8 Fécostérol
- 9 Epistérol
- 10 Ergosta 5 7 24(28) triénol
- 11 24 (28) déhydroergostérol
- 12 Ergostérol
- XIII 4 α -méthylfécostérol
- XIV Cholesta 7 24 diénol
- XV Ergosta 8 22 24(28) triénol
- XVI Ergost 8 énoI
- XVII Ergosta 8 22 diénol
- XVIII Ergosta 7 22 24(28) triénol
- XIX Ergosta 7 en 3 β ol
- XX 5 6 dihydroergostérol
- XXI Ergosta 5 7 dien 3 β ol

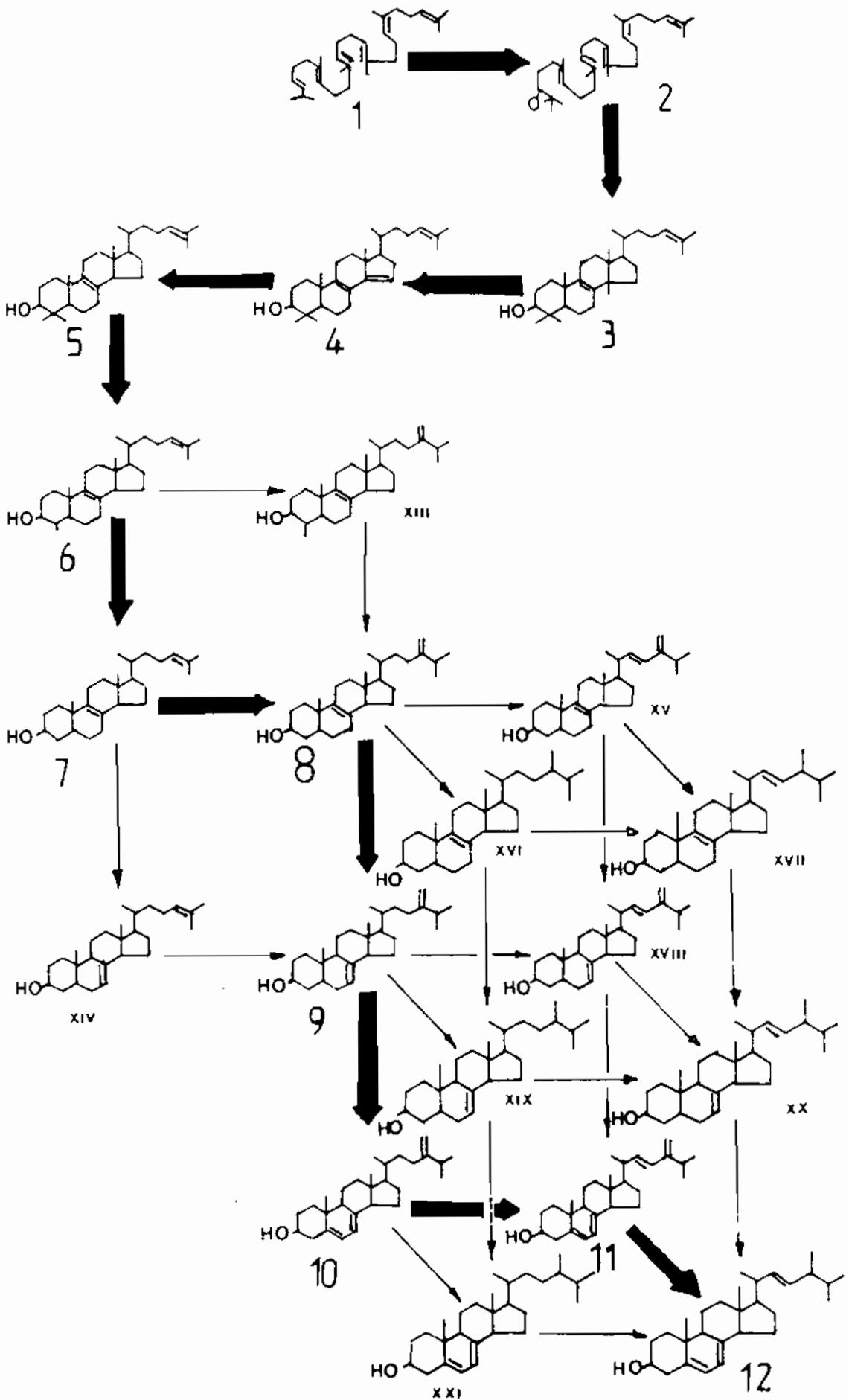


Fig.3 - SYSTEME DE VOIES CONDUISANT A LA BIOSYNTHESE DE L'ERGOSTEROL A PARTIR DU SQUALENE

II - LOCALISATION DES ENZYMES DE LA BIOSYNTHESE DES STEROLS

La répartition intracellulaire des enzymes de la voie de biosynthèse des stéroïdes chez la levure a été étudiée par plusieurs auteurs. Les travaux de Shimizu et al., 1973, Boll et al., 1975, Trocha et al., 1976 ont démontré que les enzymes de début de synthèse sont généralement solubles, exception faite pour l'HMG CoA réductase qui est une enzyme liée aux membranes mitochondriales. Kornblatt et al., 1971 ont également rapporté que l'acétoacétyl CoA thiolase, en fonction de l'état physiologique de cellules, pouvait être localisée soit dans le cytoplasme soit dans les mitochondries.

Les enzymes de la partie médiane de la voie, entre le mévalonate et le farnésyl pyrophosphate, sont également cytoplasmiques (Tchen et al., 1958; Eberhardt et al., 1975).

La distribution des enzymes situées entre le Farnésyl pyrophosphate et le lanostérol est connue avec certitude à ce jour. Elles sont toutes microsomales (Qureshi et al., 1973; Agnew et al., 1978). Cette distribution est en accord avec celle que nous avons observée au laboratoire sur la levure, notamment en ce qui concerne la squalène 2-3 épuxyde-lanostérol cyclase (Mbaya et al., 1987).

Des controverses subsistent cependant sur la localisation des enzymes de la partie terminale de la voie de biosynthèse, après le lanostérol. Certains auteurs les situent dans les mitochondries (Thompson et al., 1974; Neal et al., 1977), tandis que d'autres les ont localisées dans les microsomes (Moore et al., 1969; Jarman et al., 1975; Nishino et al., 1981).

En résumé, les premières étapes enzymatiques ayant des substrats solubles sont localisées dans le cytoplasme des cellules, à part l'HMG CoA réductase. Par contre les enzymes catalysant la conversion des molécules, de fin de chaîne, hydrophobes, sont liées à des systèmes membranaires (Réticulum endoplasmique ou mitochondries).

III - MUTANTS ISOLES

L'isolement des mutants constitue un avantage certain, d'une part pour étudier le rôle physiologique des stérols et des molécules dérivées et d'autre part pour l'étude de la régulation fine de la biosynthèse des stérols.

Les premiers mutants obtenus correspondent aux mutants bloqués dans les dernières étapes de la biosynthèse de l'ergostérol après le zymostérol. Ils ont été sélectionnés par leur résistance à la nystatine (polyène antifongique) (Woods, 1971).

Ces mutants n'exigent pas d'ergostérol pour la croissance car les stérols intermédiaires de biosynthèse, accumulés, suffisent pour assurer la croissance des cellules.

Les premiers mutants auxotrophes pour les stérols isolés correspondent à des mutants bloqués dans la biosynthèse des porphyrines, indispensables, en outre, dans les étapes de déméthylation du lanostérol (Karst, 1973). Ces souches ont une exigence pléiotropique en ergostérol, en acide gras et en méthionine et sont incapables de respirer.

Les mutants bloqués dans les gènes de structure de la biosynthèse des stérols n'ont pu être isolés par la suite que sous forme de mutants conditionnels (thermosensibles) (Karst et al., 1977 et 1984) fig. 2A.

IV - REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES STEROLS ET METHODOLOGIE D'APPROCHE DANS L'ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION

En général, les voies de biosynthèse sont régulées par rétro-inhibition et par répression, de l'activité et de la synthèse d'une des premières enzymes de la chaîne. Dans les voies à plusieurs

branches, la régulation s'exerce généralement, d'une part, au niveau du flux global sur une étape précède, puis chaque produit terminal inhibe sa propre synthèse au niveau de l'embranchement.

Dans les cellules animales, on a (Rodwell et al., 1973 ; Brown et al., 1980) montré que l'HMG CoA réductase fonctionne comme site primaire de la régulation de la biosynthèse du cholestérol. Ainsi, un taux élevé de stérols plasmatiques, sous forme de LDL, réprime la synthèse de l'enzyme et diminue sa demi-vie.

La difficulté majeure pour étudier la régulation de la biosynthèse de l'ergostérol chez la levure est que, dans les conditions standard de culture aérobie, la levure synthétise de grandes quantités d'ergostérol et est imperméable aux stérols exogènes. Ceci rend la voie des stérols particulière dans la mesure où, en général, chez les microorganismes, une voie de biosynthèse est bloquée lorsque le produit final est apporté par le milieu de culture.

En culture anaérobie, les cellules de levure ne peuvent pas synthétiser le noyau stérol et accumulent le squalène (Andreason et al., 1953). Les stérols exogènes seront donc prélevés. Plusieurs groupes ont utilisé les cultures anaérobies de levure pour étudier l'effet de la carence ou de l'excès en stérols exogènes sur la synthèse de l'ergostérol. Cependant, ces travaux n'ont pas permis, pour le moment, de démontrer avec certitude que l'HMG CoA réductase était l'étape régulatrice de la biosynthèse de l'ergostérol. Néanmoins, les travaux de Kawaguchi (1968), "in vitro", ont montré, chez la levure, que l'incorporation d'acétate [^{14}C] ainsi que d'HMG CoA [^{14}C] dans la voie des stérols était très fortement inhibée en présence de lipides acides ; par contre, dans les mêmes conditions, l'incorporation de mévalonate [^{14}C] n'est pas affectée, ce qui montre que l'HMG CoA réductase serait fortement rétroinhibée par les lipides acides. L'ergostérol n'a cependant aucun effet dans ce cas. La nature exacte de ces lipides acides n'a pas été démontrée mais les auteurs ont rapporté qu'ils dérivent de l'ergostérol.

D'autres travaux (Boll et al., 1975) ont fait observer que l'augmentation de la synthèse d'ergostérol, après transfert des cultures, des conditions anaérobies aux conditions aérobies, est liée à une augmentation de l'activité HMG CoA réductase.

Mais Trocha et al., 1976 ont également décrit que les taux d'acétoacétyl CoA thiolase et de HMG CoA synthétase sont diminués par l'ergostérol dans les cultures anaérobies alors que l'HMG CoA réductase n'est que très peu affectée.

Une autre manière pour modifier le taux de stérols dans les cellules est d'utiliser des mutants auxotrophes pour l'ergostérol qui pourraient prélever l'ergostérol du milieu de culture en aérobiose. Ces mutants permettront également de mettre en évidence des effets possibles de régulation dus aux précurseurs de l'ergostérol accumulés sous l'influence des différents blocs enzymatiques. Servouse et al., 1986 ont décrit, en anaérobiose, lorsque l'ergostérol est en excès, une diminution de l'activité spécifique de l'acétoacétyl CoA thiolase et de l'HMG CoA synthétase, d'un facteur 5 à 10 par rapport aux cellules carencées en aérobiose. Par contre, l'activité spécifique HMG CoA réductase n'est pratiquement pas affectée. Ces expériences suggèrent fortement que la régulation s'effectuerait chez la levure par répression-induction de la thiolase et de l'HMG CoA synthétase.

Plus récemment, Pinto et al., 1985 ont montré que l'accumulation de squalène dans les cultures anaérobies est diminuée d'un facteur 4 environ, à forte concentration d'ergostérol (100 mg/l), par rapport à un taux plus faible d'ergostérol (2 mg/l). Ceci confirmerait une régulation avant la synthèse de squalène.

Cependant d'autres facteurs de régulation devraient probablement exister. La voie de biosynthèse de l'ergostérol comprend, en effet, une vingtaine d'étapes environ et l'on peut émettre l'hypothèse que plusieurs étapes doivent être régulées en dehors de l'une

des étapes précoces. Une régulation devrait en particulier exister au niveau de l'embranchement isoprénoïdes-stérols. En effet, le FPP (mevalonate) peut être converti en squalène par la squalène synthétase, soit polymérisé en isoprénoïdes à longue chaîne par les prenyltransférases. Le squalène est, de ce fait, le premier intermédiaire spécifique de la branche stérols de cette voie de biosynthèse. Vu l'importance de la squalène synthétase, nous avons étudié son activité spécifique en fonction de la teneur en stérols des souches.

Par ailleurs, nous avons fait l'hypothèse que la squalène époxydase pouvait être un site de régulation. En effet, le squalène s'accumule en anaérobiose (Andreason et al., 1953 ; Starr et al., 1961 ; Mopurgo et al., 1964) et les stérols sont synthétisés en aérobiose à partir du pool de squalène préexistant.

Le squalène pouvant donc former un pool, la vitesse d'introduction de l'oxygène moléculaire par la squalène époxydase peut donc être un facteur limitant. De plus, nous avons étudié cette activité enzymatique parce que très peu de publications avaient caractérisé cette enzyme chez la levure Saccharomyces cerevisiae.

Enfin, dans les cellules animales, plusieurs travaux tendent à montrer que l'enzyme serait impliquée dans la régulation de la biosynthèse des stérols (Faust et al., 1979 ; Chang et al., 1980 ; Eilenberg et al., 1984).

Les voies d'approche utilisées pour essayer de déterminer ces différents sites de régulation sont :

1 - La mesure du taux d'ergostérol dans les diploïdes hétéroallèles. Cette approche globale doit montrer s'il existe ou non une étape limitante dans la biosynthèse de l'ergostérol chez la levure.

2 - En collaboration avec notre groupe, R. Gibeckler (EPRAU - Centre de Recherches alimentaires BSA) a pu isoler le gène codant pour l'activité acétoacétyl CoA thiolase. Une souche porteuse du gène sur plasmide multicopie présente une augmentation de l'activité spécifique de l'acétoacétyl CoA thiolase d'un facteur 14 par rapport à la souche sauvage. Nous avons mesuré la teneur en stérols de cette souche et étudié également si des intermédiaires de la biosynthèse des stérols pouvaient être accumulés.

3 - La recherche de mutants de régulation.

4 - L'étude des activités squalène synthétase et squalène époxydase.

CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL

1 - Souches utilisées :

Le matériel utilisé pour l'ensemble de ce travail est la levure de boulangerie : Saccharomyces cerevisiae. C'est un eucaryote ; ascomycète hétérothallique, présentant un cycle naturel haplodiplobiontique (fig. 4), la phase diplobiontique étant prépondérante.

Quand les conditions sont défavorables, les cellules diploïdes sporulent et chacune donne un asque à quatre spores haploïdes de signe sexuel α et a . Lorsque des conditions favorables de croissance sont rétablies, ces spores germent et les cellules haploïdes de signe opposé copulent pour redonner des zygotes diploïdes ($2n$, Guillermond 1902). Les diploïdes, ayant un meilleur taux de croissance, envahissent rapidement la population. En laboratoire, chacune de ces étapes est parfaitement maîtrisée : une génération (diploïde - méiose - fusion - diploïde) ne prend que 9 jours, ce qui est un avantage de plus, qui fait de la levure Saccharomyces cerevisiae, un outil de travail intéressant.

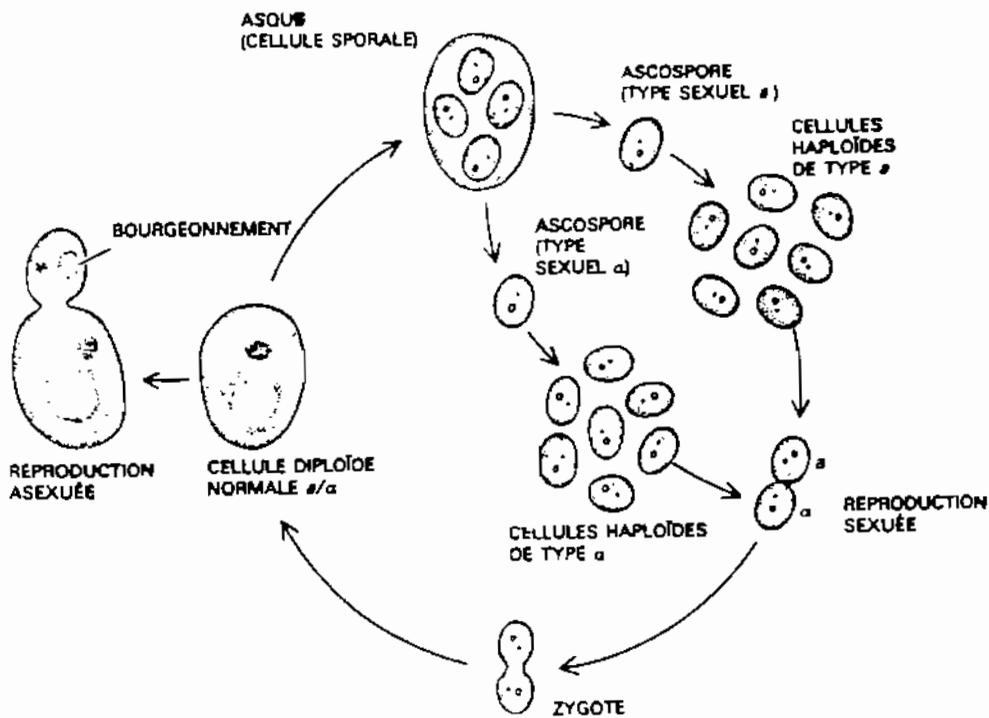


Fig. 4 - CYCLE DE LA LEVURE *Saccharomyces cerevisiae*.

Toutes les souches utilisées dans ce travail dérivent de la souche FL100 (ATCC 28383) de signe sexuel (a) et de la souche isogénique FL200 (ATCC 32119) de signe sexuel (α). Les mutants auxotrophes pour l'ergostérol ont été isolés à partir de ces souches sauvages par F. Karst (1974).

2 - Nomenclature

Les souches haploïdes sont nommées par leur génotype précédé des initiales du parent dont elles sont issues. Comme nous travaillons uniquement en système isogénique, le rappel des parents FL100 et FL200 est inutile.

Les haploïdes obtenus après sporulation d'une souche diploïde reçoivent le nom du parent haploïde suivi du numéro correspondant à la tétrade dont ils sont issus et d'une lettre majuscule désignant la spore de la tétrade : A, B, C, D. Lorsque les tétrades ne sont pas complètes, on obtient des triades et la nomenclature des spores devient alors sp1, sp2, sp3.

II - METHODES

1 - Techniques de culture

1-1. Milieux de culture

Les milieux standard suivants (g/l) ont été utilisés.

| | | |
|----------------------|--------------------------|------|
| | - Bactopeptone (BIOKAR) | 10 g |
| - milieu Complet YPG | - Yeast extract (BIOKAR) | 10 g |
| | - Glucose | 20 g |
| | - Eau QSP | 1 l |

Dans le cas des cultures anaérobies, on ajoute, à ce milieu complet
100 de l'ergostérol (50 mg/l) et de l'acide oléique (50 mg/l)

- | | | |
|-----------------------|--|-------|
| - Milieu minimum YNB, | - Yeast nitrogen base W/G amino acids (DIFCO) | 6,7 g |
| | - glucose | 10 g |
| | - Eau QSP | 1 l |

- Le milieu minimum (YNB sans amino-acides ni sulfate d'ammonium
ni pantothénate de calcium) est préparé comme suit, à partir des solu-
tions concentrées suivantes :

. Vitamines

| | |
|----------------------------|---------|
| Biotine | 20 mg/l |
| acide folique | 20 mg/l |
| acide para amino benzoïque | 2 g/l |
| Riboflavine | 0,2 g/l |
| thiamine | 4 g/l |
| pyridoxal phosphate | 4 g/l |
| inositol | 20 g/l |
| niacine | 4 g/l |

. Pantothénate de calcium 4 mg/ml

. Sels rares

| | |
|----------------------|----------|
| acide borique | 5 mg/l |
| sulfate de cuivre | 0,4 mg/l |
| iodure de potassium | 1 mg/l |
| chlorure ferrique | 2 mg/l |
| sulfate de manganèse | 4 mg/l |
| molybdate de sodium | 2 mg/l |
| sulfate de zinc | 4 mg/l |

. Sels minéraux

| | |
|--|---------|
| KH_2PO_4 | 1 g/l |
| $\text{MgSO}_4 (7 \text{H}_2\text{O})$ | 1 g/l |
| NaCl | 0,1 g/l |
| $\text{CaCl}_2 (2\text{H}_2\text{O})$ | 0,1 g/l |

. Glucose 200 g/l

. Hydrolysate de caséine 100 g/l

à partir de ces solutions-mères concentrées, on prélève, pour 100 ml de milieu de culture :

| | |
|-------------------------|------------------|
| glucose | 5 ml |
| sels rares | 1 ml |
| Hydrolysate de caséine | 5 ml |
| sels minéraux | 4 ml |
| eau stérile | 85 ml |
| riboflavine | 1 ml |
| autres vitamines | 100 µl de chaque |
| Pantothénate de calcium | 30 µl |

L'hydrolysate de caséine est la seule source d'azote et le glucose, la seule source de carbone.

- Milieu de sporulation ACK (/1)

| | |
|----------------------|------|
| acétate de potassium | 1 g |
| gélose | 20 g |
| eau distillée | 1 l |

Le milieu complet (YPG) et le milieu de sporulation ACK sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120°C, tandis que le milieu minimum YNB est stérilisé pendant 15 minutes à 110°C.

Ces milieux sont utilisés liquides ou solidifiés par addition de 2 % d'agar. Les compléments nécessaires à la croissance de certaines souches anaérobies sont ajoutés, après filtration stérilisante, dans le milieu de culture.

1-2. Conditions de culture

2 types de cultures sont couramment utilisés

1-2-1. Cultures en milieu liquide

Elles sont faites dans des erlenmeyers mis à agiter dans un bain-marie ou dans une chambre thermostatée à 28°C.

Dans le cas des anaérobioses, les cultures non agitées sont laissées à la chambre thermostatée à 28°C pendant 72 heures. Une couche d'huile de paraffine assure les conditions de l'anaérobiose.

1-2-2. Cultures en milieu solide

Elles se font dans des boîtes de pétri mises à incuber dans des étuves à 26°C (température permissive) ou à 36°C (température non permissive).

1-3. Conservation des souches

Les souches de levure, en phase exponentielle de croissance, sont conservées, par suspension dans des tubes de milieu complet (YPG) supplémenté avec 20 % de glycérol et congelées à - 30°C. Pour une éventuelle utilisation, le tube est décongelé et son contenu étalé sur un milieu de culture approprié.

Les souches mutantes auxotrophes pour les stérols, comptant de très mauvaise survie après congélation, sont au préalable mélangées avec la souche sauvage pour leur conservation. Elles sont donc stockées à l'état diploïde, hétérozygote.

2 - Mesure de la croissance cellulaire

2-1. Sur milieu solide

La croissance cellulaire est estimée de façon semi-quantitative. Pour cela, on fait le "test en goutte", qui consiste à déposer une goutte de la suspension de levure sur différents milieux test. Au bout de deux à trois jours d'incubation, les résultats sont exprimés suivant l'échelle de croissance : 0, ϵ , +, ++, +++, allant de l'absence totale de croissance, à la croissance optimale observée avec la souche sauvage.

2-2. En milieu liquide

La croissance cellulaire est, dans ce cas, quantifiée par la mesure de la densité optique (DO) à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour une quantification plus fine, un comptage à l'hématimètre (cellule de Malassez : 1 mm³) est effectué. Une unité de DO correspond à environ $2 \cdot 10^7$ cellules/ml.

3 - Détermination du poids sec

Les filtres Millipore sont placés dans une étuve à 120°C en présence de cristaux dessiccateurs, pendant une heure. Ils sont ensuite pesés immédiatement. 1 à 2 ml de culture sont alors filtrés sur le millipore puis les filtres sont remis à sécher dans l'étuve pendant 30 à 60 minutes. Au bout de ce temps, une pesée est effectuée pour avoir le poids sec des cellules.

La relation absorbance-poids sec a été déterminée par référence à une courbe étalon réalisée de la manière suivante : une aliquote d'une suspension, de densité optique connue, est déposée sur un filtre Whatman 2,45 μ , préalablement lavé à l'eau distillée, puis séché pendant 2 heures à 120°C et pesé. Le filtre est de nouveau lavé à l'eau distillée puis reséché et repesé. Dans le cas de la souche sauvage FL100, un millilitre de culture de densité optique 1 correspond à 0,230 mg de poids sec.

4 - Techniques génétiques

4-1. Détermination des phénotypes

Le phénotype d'une souche est déterminé par le test en goutte sur milieux solides YNB ou YPG, seuls ou supplémentés en ergostérol (40 μ g/ml), en tergitol ou autre molécule à tester dans le phénotype.

Les boîtes sont mises à incuber à 26°C et 36°C. L'ergostérol est dissous à l'aide de détergent Tween 80 (polyoxyéthylène sorbitan mono-oléate) ou tergitol NP 40 - alcool à 95° 1:1 (v/v).

4-2. Croisement et détermination du signe sexuel

Les souches, en phase exponentielle de croissance, sont déposées sur boîtes de milieu complet YPG. Elles sont simultanément croisées avec les souches FL100 (de signe a) et FL200 (α). Après 2 heures d'incubation, à 28°C, les mélanges de copulation sont observés au microscope en vue de constater la présence de zygotes, de forme caractéristique, ce qui permet de déduire le signe sexuel de la souche testée.

4-3. Test d'Allélisme phénotypique ou Test de complémentation

Les cellules de signes sexuels opposés, auxotrophes pour les stéroïdes ou résistantes à une drogue donnée sont croisées entre elles. La présence des zygotes est vérifiée au microscope. La détermination du phénotype des diploïdes permet alors de savoir si les mutations affectent le même cistron ou des cistrons différents. Dans le premier cas, le diploïde hérite de l'auxotrophie des parents, dans le 2e cas, il est sauvage.

4-4. Isolement des zygotes

Une petite anse de mélange de copulation est placée sur une plaquette d'agar, 3 à 4 zygotes sont isolés du mélange, à l'aide d'un micromanipulateur de Fonbrune. La plaquette est ensuite déposée dans une boîte de milieu complet et incubée pendant 3 à 4 jours à 26°C. Au bout de ce temps, les colonies sont testées pour leur phénotype ou mises à sporuler sur milieu de sporulation ACK afin d'en étudier la descendance.

4-5. Mutagenèse par irradiation aux rayons ultra-violets

La souche sauvage haploïde est étalée sur milieu gélosé (YPG ou YNB) supplémenté. Les cellules sont irradiées pendant 15 à 20 s sous une lampe PHILIPS TUV 30 W, placée à 45 cm de distance, au dessus des boîtes de culture, exposées ouvertes. Ceci correspond à un seuil de survie de 1 %. Les cellules sont ensuite incubées pendant 48 heures, avant d'être étalées ou testées sur milieu sélectif.

5 - Obtention des fractions membranaires et des enzymes solubles

5-1. Préparation de la fraction enzymatique brute

Les cellules de levure, mises en culture en milieu liquide,

sont récoltées en phase exponentielle de croissance (densité optique comprise entre 5 et 8), ce qui correspond à environ 10^8 à $1.6 \cdot 10^8$ cellules/ml.

Trois lavages sont effectués avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Les cellules sont ensuite broyées avec des billes de verre, dans le même tampon, contenant du dithiothréitol (1mM).

Le broyat est récupéré puis centrifugé une première fois pendant 10 mn à 8000 g à 4°C. Cette première centrifugation permet d'éliminer les débris cellulaires, les cellules entières et quelques billes collectées avec le broyat. Le surnageant est décanté et centrifugé pendant 30 mn à 12000 g à 4°C. Le culot, correspondant aux mitochondries et aux lysosomes, est éliminé, le surnageant seul (S₁₂) est utilisé et servira de source enzymatique dans le dosage des activités enzymatiques.

5-2. Préparation des fractions microsomales et des enzymes solubles

Pour certaines expériences, le surnageant S₁₂ est centrifugé une fois de plus, pendant 60 minutes, à 105 000 g à 0°C. Le culot correspond à la fraction microsomale et est utilisé après 2 lavages avec du tampon de broyage comme source purifiée de l'enzyme. Les microsomes sont resuspendus dans le même tampon. Le surnageant (S₁₀₅) représente la fraction des enzymes solubles.

6 - Préparation des substrats purifiés

6-1. Préparation du squalène 2-3 époxyde

Le squalène 2-3 époxyde est synthétisé à partir du squalène selon une méthode décrite par Van Tamelen et Curphey (1962). Nous avons utilisé les conditions suivantes :

Le squalène (50 mg \approx 125 μ moles) est dissous dans 2,5 ml d'un mélange tertio-butanol - eau 80:20 (v/v) dans lequel nous avons ajouté 50 mg de N - Bromosuccinimide. Le mélange est agité pendant 30 minutes à la lumière, dans un bain-marie à 28°C et chromatographié directement sur couche mince de gel silice. L'éluant utilisé est le mélange cyclohexane-acétate d'éthyle 85:15 (v/v).

Dans ces conditions, trois produits sont séparés et sont, dans l'ordre de polarité croissante :

- Le squalène (qui n'a pas réagi) Rf = 0,98
- La monobromohydrine Rf = 0,53
- La dibromohydrine Rf = 0,26

La bande correspondant à la monobromohydrine (Rf 0,53) est récupérée par grattage de la silice et le produit élué avec du méthanol puis traité, sous agitation, par 44,8 mg de carbonate de potassium, pendant 4 heures à température ambiante.

Le squalène 2-3 époxyde formé est extrait avec de l'éther éthylique ou avec de l'hexane. Le tout est concentré ensuite dans un petit volume puis identifié par chromatographie sur couche mince de gel de silice, dans le système d'éluant : cyclohexane-acétate d'éthyle 85:15 (v/v). Le squalène 2-3 époxyde a un Rf. de 0,80 dans ce système. Il est utilisé, dissous dans du benzène à raison de 15 mg/ml.

6-2. Préparation des solutions de composés entraîneurs

6-2-1. L'ergostérol

Il est purifié à partir d'une source commerciale, par recristallisation dans le mélange alcool éthylique - benzène - eau 6,6 : 3,3 : 0,1 (v/v/v). Les cristaux obtenus au bout de 15h à 4°C sont lavés avec de l'éthanol. Les paillettes purifiées sont ensuite dissoutes dans le mélange chloroforme-méthanol 2:1 (v/v) à raison de 20mg/ml.

6-2-2. Le lanostérol

Il est préparé à partir d'une source commerciale Sigma, par dissolution dans le mélange chloroforme-méthanol 2:1 (v/v), à raison de 20 mg/ml.

6-2-3. Le squalène

Il est préparé comme l'ergostérol dans le mélange chloroforme-méthanol 2:1 (v/v) à raison de 20 mg/ml.

7 - Marquage de la voie de biosynthèse des stérols par des substrats radioactifs

La chaîne de biosynthèse des stérols peut être marquée par l'utilisation de plusieurs techniques qui sont entre autres complémentaires: fig. 5.

- L'utilisation "in vivo" d'acétate de Na [14 C] : tous les intermédiaires situés entre l'acétate et l'ergostérol se trouvent marqués.

- L'utilisation "in vitro" de mévalonate [14 C] : tous les intermédiaires situés entre l'acide mévalonique et l'ergostérol se trouvent marqués.

- L'utilisation "in vitro" d'acide mévalonique [14 C] en présence d'iodoacétamide (5mM) : les intermédiaires situés entre l'acide mévalonique et l'isopentényl pyrophosphate deviennent radioactifs, car l'iodoacétamide bloque l'isopentényl pyrophosphate isomérase.

- l'utilisation "in vitro" de farnésyl pyrophosphate [14 C] ce qui permet le marquage des intermédiaires situés entre le farnésyl pyrophosphate et l'ergostérol.

- l'utilisation de méthionine [14 C] : les intermédiaires situés entre le zymostérol et l'ergostérol deviennent alors radioactifs.

La comparaison des résultats obtenus par toutes ces techniques permet de situer le bloc enzymatique. Dans ce travail nous avons utilisé deux techniques de marquage :

7-1. Incubation de cellules en présence d'acétate de sodium [14 C]

Les cellules sont cultivées pendant une nuit, en milieu liquide, à 28°C. Elles sont récoltées en phase exponentielle de croissance, lavées une fois avec du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,6, 30°C, contenant du tergitol 1^o/100 (v/v), puis deux fois avec du tampon phosphate seul. Les cellules sont remises en suspension dans le même tampon contenant 3 % de glucose (p/v), ou dans du tampon citrate 0,1 M pH 4, contenant 3 % de glucose (p/v). Après un temps de préincubation de 15 minutes, au bain marie à 28°C (Adams et al., 1967), on ajoute de l'acétate [14 C] 5 μ ci/essai (96,8 mci/mM ; 500 μ ci/ml). Les cellules sont ensuite agitées pendant 2 à 4 heures puis recueillies par centrifugation et lavées. Elles seront ensuite traitées comme il est défini dans le paragraphe 8-1-1. Les produits sont identifiés par chromatographie : cf. § 9-1.

7-2. Incubation de cellules perméabilisées en présence de FPP [14 C]

Cette technique est basée sur la perméabilité des cellules, dont les constituants membranaires phospholipidiques ont été attaqués par des solvants organiques. Les conditions optimales de travail sont les suivantes :

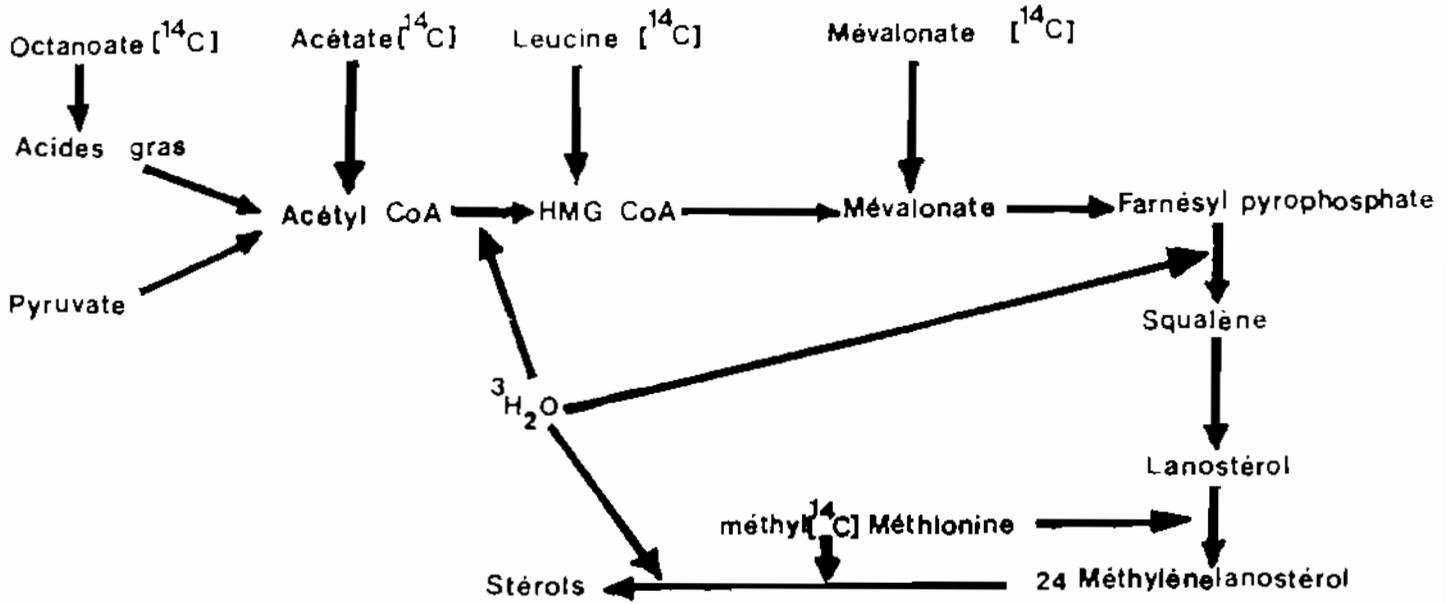


Fig. 5 - SITES D'ENTRÉE DES PRECURSEURS MARQUES, DANS LA BIOSYNTHESE DES STEROLS

Les cellules, récoltées en phase exponentielle de croissance, sont lavées avec du tampon tris-acétate 50 mM, pH 7.5. Elles sont ensuite recueillies dans 1 ml du même tampon, contenant 1ml de dithiothréitol.

Le nombre de cellules est évalué par comptage à l'hématimètre (cellule de Malassez) de façon à avoir 10^8 cellules par ml. Une évaluation par le poids humide peut également être effectuée. 1 ml de cellules représente alors 100 à 200 mg de poids humide.

La perméabilité des cellules est obtenue par agitation vigoureuse de 1 ml de la suspension cellulaire, pendant 2 minutes, en présence d'un mélange toluène-éthanol 10 % (v/v).

Des volumes du mélange de solvants, variant entre 5 et 100 μ l ont été testés, pour déterminer une perméabilité optimale sans dénaturation des protéines enzymatiques. Un volume de 15 à 20 μ l a été retenu.

En fin de perméabilisation, le solvant toxique doit être éliminé par centrifugation et par lavages successifs des cellules avec du tampon.

Le milieu de réaction contient :

HgCl₂ : 10 mM; KF : 4 mM ; Ca²⁺:15 mM; NADPH : 5 mM; FAD : 0.04 mM; G6PDH : 2 unités ; FPP [¹⁴C] : 5 nmoles.

La durée de l'incubation est de 2 heures à 30°C. Elle est arrêtée avec de l'éthanol (1ml). Le tout est porté à 60°C pendant 15 minutes ; les protéines précipitent. Dans le cas du marquage par l'AMV, une centrifugation est nécessaire afin de séparer le culot contenant les composés stéroliques hydrophobes, du surnageant renfermant les dérivés phosphorylés de l'AMV, les composés prenylés et l'AMV restant. Ce surnageant est directement chromatographié sur plaque de gel de silice, dans le système n-propanol / ammoniac / eau EDTA 1 % 6:3:1(v/v/v).

Le culot est saponifié comme décrit au paragraphe 8-1-1. Les produits de la réaction sont extraits avec de l'éther de pétrole et analysés par chromatographie sur couche mince de gel de silice comme mentionné au paragraphe 9-1.

7-5. Cinétique d'incorporation de l'acétate de sodium (^{14}C)

Les souches sont cultivées pendant une nuit à 28°C en milieu liquide YNB ou YPG supplémenté en ergostérol pour les mutants et en vitamines transferrées. Les cultures se font dans du milieu YNB liquide supplémenté en hydrolysât de caséine 5 g/l. Les cellules sont récoltées en début de phase exponentielle de croissance. Les échantillons sont récupérés dans du tampon citrate de sodium 0,1 M pH 5,5, contenant 1% de glucose (p/v).

Dans certaines expériences, de la céruléine (5 mg/l) est ajoutée dans le mélange d'incorporation, pour inhiber la synthèse des acides gras.

Les cellules sont mises en agitation pendant 15 à 30 minutes à 28°C. L'acétate de sodium [^{14}C] 5 μ ci/ml (2,7 nmoles) est ensuite ajouté.

La cinétique d'incorporation est suivie pendant 2 heures. Des prélèvements d'un ml sont effectués toutes les 15 minutes puis filtrés sur Millipore 45 μ m. Des prises de 0,5 ml sont également effectuées toutes les 15 minutes puis traitées par le TCA 10% (1 ml) pendant 30 minutes à 0°C. Une filtration sur filtre Millipore 45 μ m est réalisée puis la radioactivité retenue est comptée en scintillation liquide.

Au bout de 120 minutes, le reste de la culture est recueilli par centrifugation et le culot saponifié (cf. paragraphe 8-1-1). La répartition de la radioactivité dans différentes fractions stéroïdiques est appréciée par chromatographie (cf. paragraphe 9-1).

8 - Dosages biochimiques

8-1. Dosages du squalène et de l'ergostérol

8-1-1. Saponification et extraction

Les stérols sont extraits selon la technique de Brossik et Dwades (1956) décrite par Woods (1971). La levure (environ 7 mg de poids sec) est saponifiée dans le mélange potasse (KOH) - méthanol (40 % p/v), pendant 60 minutes à 95°C. Après adjonction d'un volume d'eau, la fraction insaponifiable est extraite par 3x3 volumes d'un solvant organique (éther de pétrole ou hexane ; heptane pour les dosages de stérols). L'extrait est séché sur sulfate de sodium anhydre.

8-1-2. Dosage photocolorimétrique du squalène

La fraction insaponifiable est filtrée sur colonne d'alumine grade 1 (3 à 6 g), préalablement lavée avec l'hexane (2 x 10 ml). Le squalène et les stérols sont ensuite séparés par éluions successives avec le toluène (3 x 5 ml) puis le méthanol.

Le dosage colorimétrique se fait suivant la méthode de Rothblat et al., (1962). Le toluène contenant le squalène est évaporé à sec sous un courant d'azote. Le squalène est ensuite repris avec de l'éther de pétrole. Le solvant est à nouveau évaporé sous azote. Un volume d'acide sulfurique est ajouté à la fraction squalène. Les tubes sont alors maintenus à 70°C pendant 5 minutes. Une coloration jaune pâle apparaît ; celle-ci sera intensifiée et stabilisée par addition de formaldéhyde (0,5 ml). Les tubes sont ensuite plongés pendant 10 minutes dans un bain marie bouillant, et le volume final est ajusté à 4 ml par adjonction de 2,5 ml d'acide acétique. Après agitation (vortex) l'absorbance est lue à 400 nm. La quantité de squalène dans les souches est évaluée par rapport à une gamme étalon de squalène du commerce, préparée simultanément.

8-1-3. Dosage de l'ergostérol par spectrophotométrie

Les cellules récupérées par centrifugation sont lavées 3 fois avec de l'eau distillée et reprises dans 20 ml d'eau. 1 à 2 ml servent à faire les poids secs et la lecture de l'absorbance à 700 nm, après dilution. Les poids secs sont réalisés comme décrit au paragraphe 3.

Le reste de la culture est saponifié comme décrit au paragraphe 8-1. Les stérols sont extraits à l'heptane (3 x 5 ml) puis la solution est séchée sur sulfate de sodium anhydre. Le filtrat, en fonction de la concentration en stérol, est dilué ou non avec l'heptane. Une lecture de l'absorbance est ensuite faite entre 320 et 220 nm.

Ce spectre est caractéristique des stérols insaturés avec deux doubles liaisons conjuguées en C_5 et C_7 . Les absorptions maximales de l'ergostérol dans l'heptane sont situées à 271, 281,5 et 290 nm (Shaw et al., 1953) (fig. 6).

L'absorbance du dosage est lue à 281,5 nm, le coefficient d'absorption de l'ergostérol, E (1 %, 1 cm), dans l'heptane étant de 290.

La quantification de l'ergostérol est alors effectuée par les équations suivantes :

quantité d'ergostérol en g/mg de poids sec :

$$\frac{OD_{281,5 \text{ nm}} \times F \times \text{Volume d'extraction}}{290 \times 100 \times \text{poids sec (mg)}}$$

F = facteur de dilution

quantité d'ergostérol en g/100 ml

$$\frac{OD_{281,5} \times F}{290}$$

Absorbance

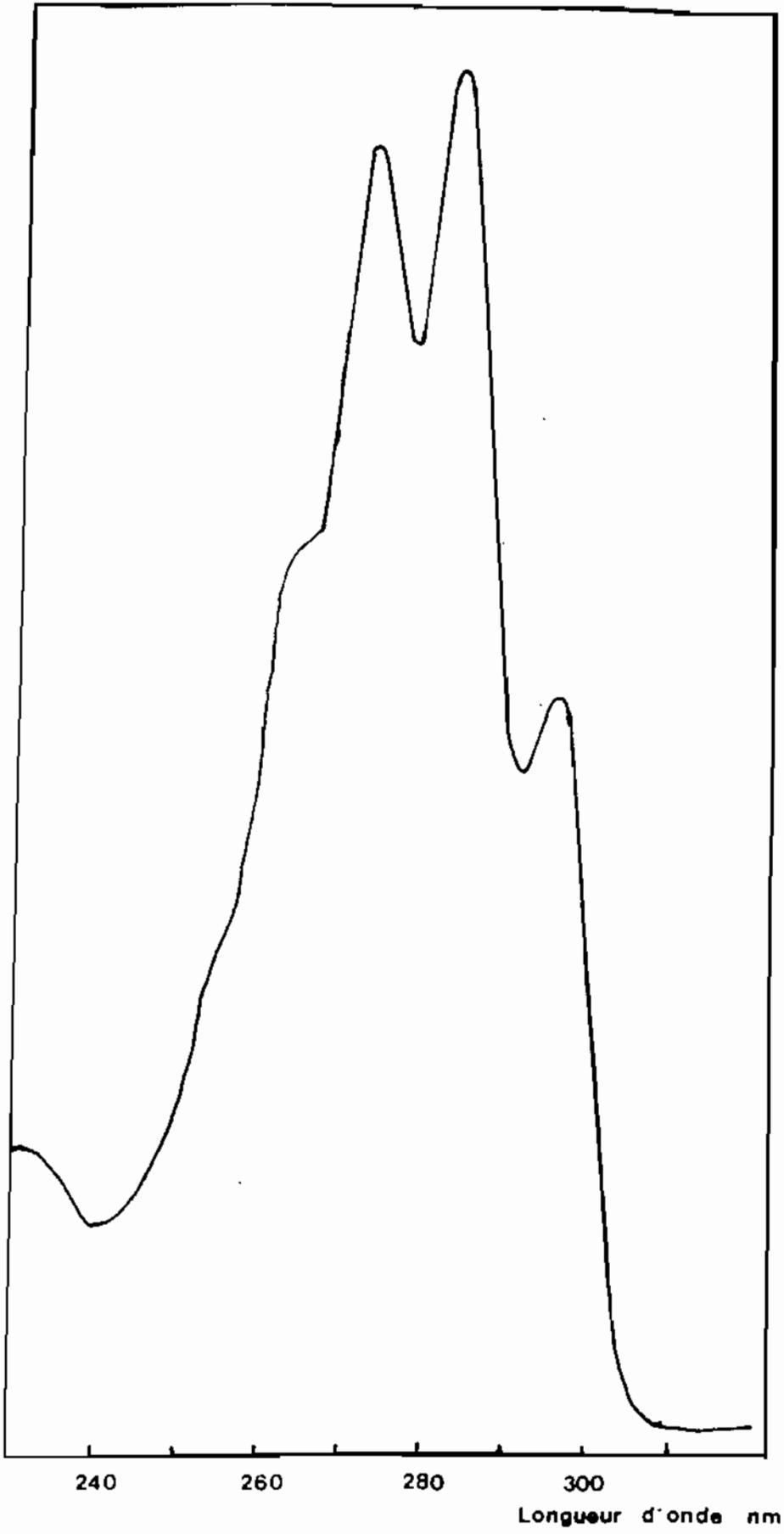


Fig. 6 - SPECTRE DE L'ERGOSTEROL

8-2. Dosage des protéines

8-2-1. Quantification rapide des protéines

- Deux dilutions différentes de l'extrait enzymatique sont réalisées. L'absorbance pour chaque dilution est lue à 228,5 nm et à 234 nm. La quantité de protéines, en mg/ml, est donnée par la relation :

$$OD_{228,5} - OD_{234} \times dilution \times 0,317$$

La moyenne des valeurs obtenues pour les différentes dilutions correspond à la quantité de protéines, en mg/ml.

8-2-2. Dosage par la méthode du biuret

Dans ce dosage, la quantité de protéines, en mg/ml, est évaluée par référence à une courbe étalon réalisée à l'aide d'une solution de sérum albumine (5 mg/ml).

Les protéines à doser sont précipitées au préalable, à l'aide de TCA 10 % afin d'éliminer les agents chélateurs contenus dans le milieu (tampon de broyage de cellules). La gamme étalon et les protéines à doser sont diluées dans un volume final de 4 ml d'eau ; un blanc constitué uniquement d'eau est également réalisé. On ajoute 0,75 ml de NaOH 20 % dans chaque tube ; les tubes sont ensuite placés pendant 5 minutes dans un bain marie à 100°C.

Après refroidissement dans la glace, 0,125 ml de $CuSO_4$ 25 % sont ajoutés à chaque tube. Une centrifugation à 4000 g pendant 5 minutes permet d'isoler un surnageant d'un culot. Le surnageant est prélevé et l'absorbance de surnageant est lue à 560 nm contre le blanc.

9 - Techniques analytiques des produits réactionnels

Tout au long de notre travail, nous avons eu recours aux techniques chromatographiques, notamment la chromatographie sur couche mince de gel de silice, pour fractionner l'insaponifiable. L'identification des produits de réaction se fait par visualisation des stérols entraîneurs en lumière UV (340 nm), après pulvérisation d'une solution éthanolique de chlorhydrate de berbérine (1 % p/v).

9-1. Identification par chromatographie sur plaque de silice (TLC)

L'insaponifiable extrait est asséché sous un courant d'azote puis repris dans un faible volume de solvant. Une aliquote est comptée en scintillation liquide pour un contrôle global. Le reste est chromatographié sur couche mince de gel de silice, en présence de témoins entraîneurs (ergostérol, lanostérol, squalène 2-3 époxyde, squalène), dans le système de solvants : cyclohexane-acétate d'éthyle 9 : 1 (v/v). La séparation des produits de l'insaponifiable est basée sur la nature du cycle A (Clayton et al., 1963).

Les Rf suivants sont obtenus dans l'ordre de polarité croissante :

| | |
|--------------------------|------|
| Le squalène | 0,90 |
| L'époxyde de squalène | 0,85 |
| Les 4.4 diméthyl stérols | 0,45 |
| Les 4méthyl stérols | 0,37 |
| L'ergostérol | 0,26 |

D'autres solvants, comme le dichlorométhane et le benzène, ont également été utilisés pour séparer les produits de l'insaponifiable. Les Rf dans ces solvants sont :

| | Dichlorométhane | Benzène |
|--------------------------------|-----------------|---------|
| squalène | 0,91 | 0,88 |
| époxyde de squalène | 0,80 | 0,80 |
| 1,2-difénil stérols | 0,36 | 0,13 |
| les 4 α -méthyl stérols | 0,26 | 0,09 |
| Fergostérol | 0,16 | 0,06 |

Dans les expériences où l'acide mévalonique a été utilisé comme substrat, les dérivés phosphorylés de l'acide mévalonique, l'isopentényl pyrophosphate, le farnésyl pyrophosphate et le farnésol ont également été identifiés par chromatographie sur couche mince.

A la fin de l'incubation la réaction est arrêtée par la chaleur et les produits de réaction extraits comme décrit au chapitre I, section Méthodes, paragraphe 6-3.

Le surnageant contenant les produits réactionnels est directement chromatographié sur couche mince de gel de silice dans le système de solvants : n propanol - ammoniac - eau (EDIA 1 % 6:3:1 (v/v/v) selon la technique de Plieninger et Immel (1965). Cette technique nous a permis de séparer l'acide mévalonique qui n'a pas réagi, des dérivés phosphate et pyrophosphate.

9-2. Identification par réactions chimiques

9-2-1. Identification du squalène 2-3 époxyde par réaction au perchlorate

L'identification du squalène époxyde, au cours de cette réaction, repose sur la réactivité chimique de la fonction époxyde : ainsi, sous l'action d'un acide fort, le squalène 2-3 époxyde peut être transformé en dihydroxysqualène (Van Tamelen et Curphey, 1962).

Le squalène époxyde formé est conservé dans le benzène ; 100 μ l de cette solution sont repris, évaporés sous un courant d'azote. Le résidu est resuspendu dans 200 μ l de DMEG (diméthylétheréthylène glycol). On y ajoute 20 μ l d'acide perchlorique 3 % (v/v). Le pH devient acide. La réaction se déroule à température ambiante, sous agitation pendant 2 heures.

Au bout de ce temps, le milieu est neutralisé avec de la potasse 0,33 M ; ensuite, le mélange réactionnel est chromatographié directement ou extrait avec de l'éther de pétrole puis chromatographié sur couche mince de gel de silice dans le système de solvant cyclohexane - acétate d'éthyle 85:15 (v/v). Le mélange témoin (non traité) migre à Rf 0,84 dans ce système ; le mélange traité par l'acide perchlorique migre en un pic unique Rf 0,12 correspondant vraisemblablement à du squalène glycol (fig. 7). Après évaporation du solvant, le squalène glycol peut donner un dérivé aldéhyde, par action de tétrahydrofurane (200 μ l) et d'acide périodique (200 μ l). La réaction dure 1 heure à température ambiante, sans agitation. Le mélange est ensuite neutralisé avec du KOH N. Un volume d'eau est ajouté et les produits sont extraits avec de l'éther de pétrole puis chromatographiés dans le dichlorométhane. Le produit de réaction migre à un Rf de 0,7.

9-2-2. Identification du lanostérol et de l'ergostérol par acétylation.

Le lanostérol et l'ergostérol, élués avec de l'éther éthylique, sont récupérés dans des tubes différents. Le solvant est évaporé sous un courant d'azote. Le résidu est dissous dans le benzène (100 à 200 μ l) et traité par le mélange anhydride acétique (500 μ l) et pyridine (100 μ l). La réaction se déroule dans l'obscurité pendant 24 heures. La même expérience est réalisée sur des aliquotes de lanostérol et d'ergostérol entraîneurs (1 mg/ml).

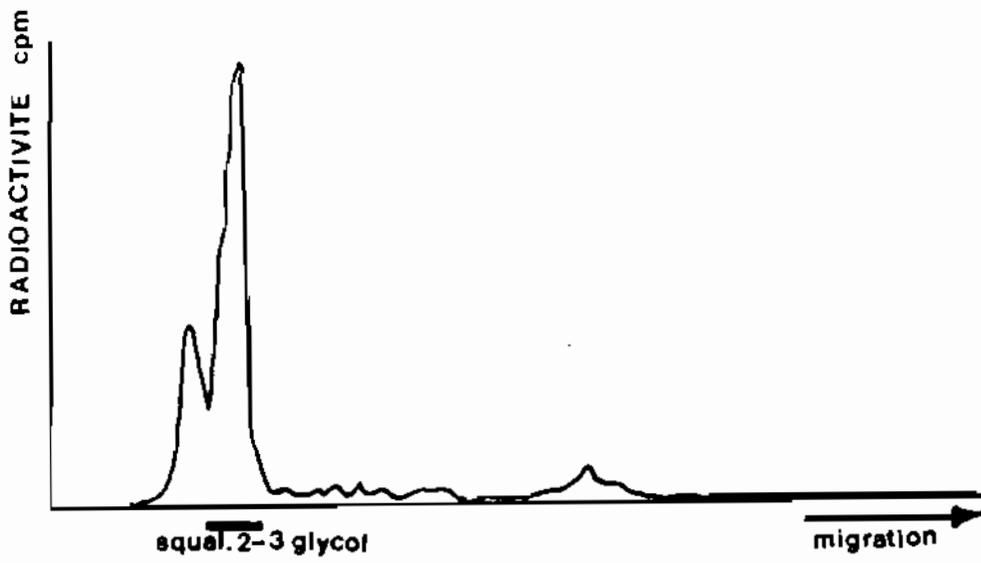


Fig. 7. IDENTIFICATION DU SQUALENE 2-3 EPOXYDE PAR REACTION AU PERCHLORATE

Cette réaction permet l'acétylation des produits, qui, de ce fait, deviennent moins polaires.

Au bout de 24 heures, le contenu des tubes est évaporé, sous vide à 65°C afin de chasser l'excès de pyridine et d'anhydride acétique. Les produits de réaction sont repris avec 100 μ l de benzène puis une chromatographie sur couche mince de gel de silice est réalisée dans le système de solvants cyclohexane-acétate d'éthyle 85:15 (v.v).

Le profil de radioactivité (fig. 8) montre que le lanostérol acétylé migre à un Rf de 0,82 alors que l'ergostérol témoin non radioactif, acétylé, a un Rf de 0,75.

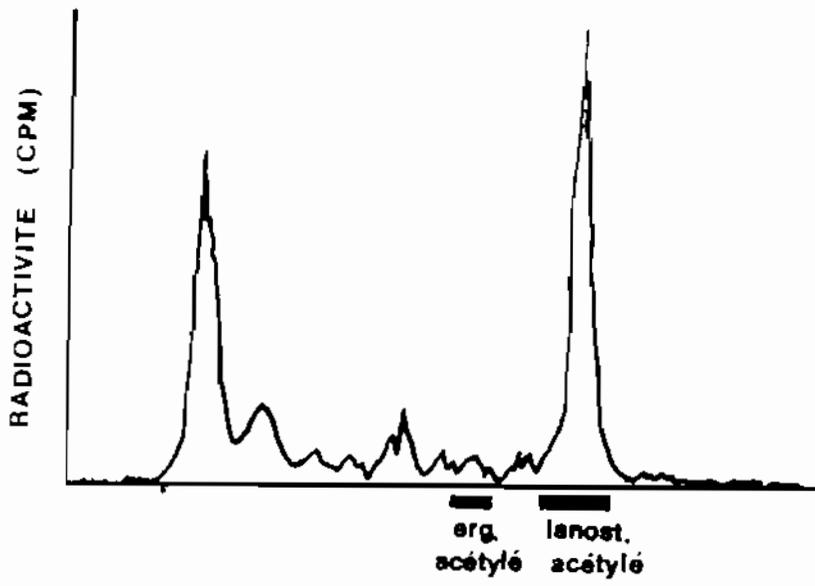


Fig. 8 - PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DES PRODUITS ACÉTYLES:

C H A P I T R E I I

CONSEQUENCES DE L'AMPLIFICATION DU GENE ERG 10
CODANT POUR L'ACTIVITE ACETOACETYL COA THIOLASE :
MARQUAGE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES STEROLS
PAR L'ACETATE [¹⁴C].

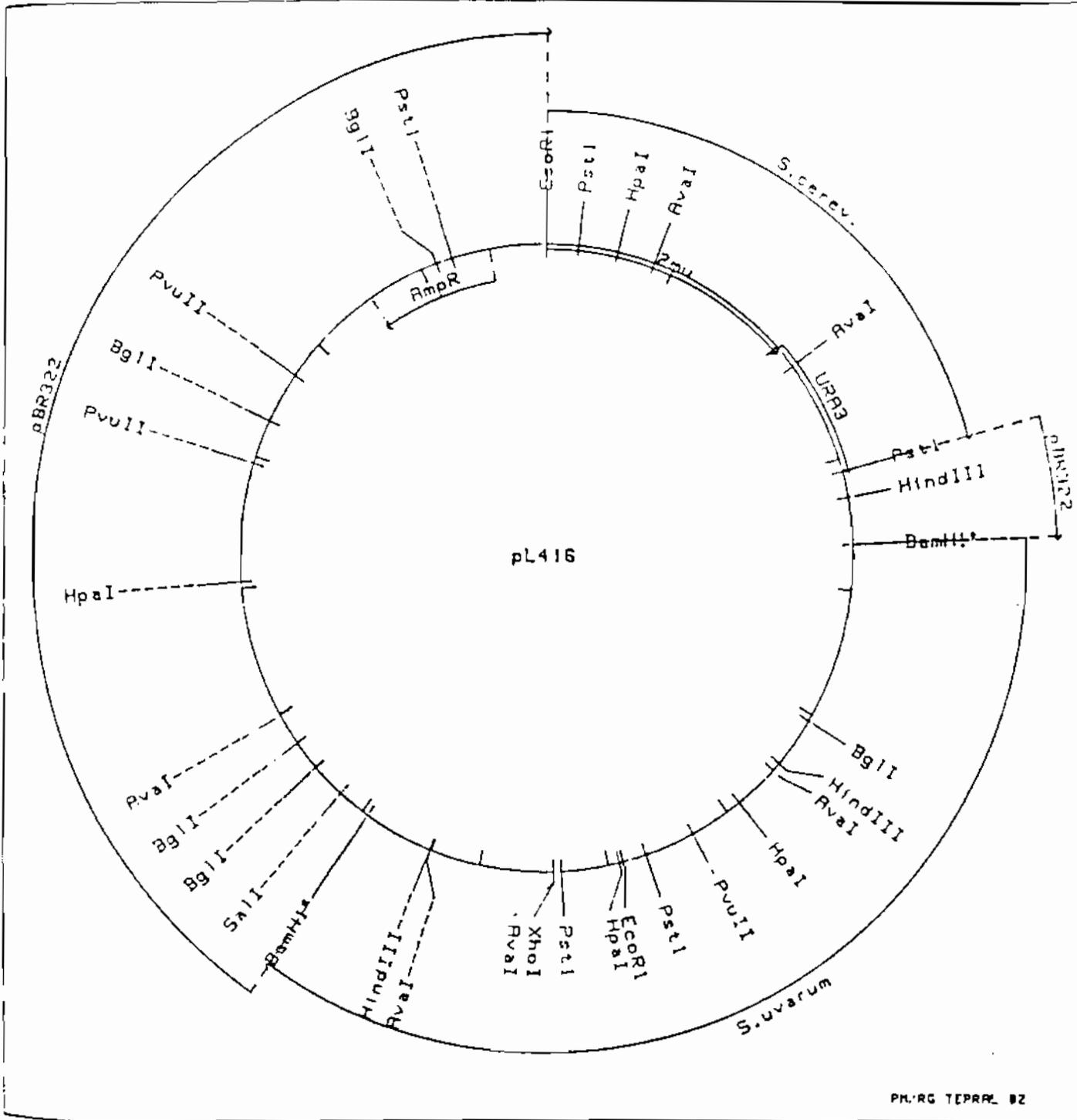
Les travaux de Servouse et al., 1984 et 1986 ayant démontré que l'activité spécifique de l'acétoacétyl CoA thiolase était fortement déreprimée dans les conditions de carence en stérols et inversement réprimée en excès de stérols, R. Gloeckler a isolé le gène de Saccharomyces uvarum, codant pour l'activité acétoacétyl CoA thiolase, par complémentation d'une mutation *erg 10*, en vue de construire une souche de levure de brasserie (S. uvarum) présentant une vitesse accrue de synthèse des stérols.

La souche ainsi obtenue (*erg10 ura 3⁻/p1416*) présente une activité acétoacétyl CoA thiolase augmentée d'un facteur 14 par comparaison à la souche sauvage. A l'aide de cette souche, nous avons essayé d'étudier les conséquences de cette amplification sur la biosynthèse des stérols. Nous avons, pour cela, d'une part dosé les stérols dans cette souche et d'autre part, recherché une éventuelle accumulation d'intermédiaire de biosynthèse, par marquage de la voie de biosynthèse des stérols à l'acétate [¹⁴C].

I - STRUCTURE DU PLASMIDE PL 416

Ce plasmide dont la structure est représentée fig. 9 dérive du plasmide PHCG3 et a été créé par R. Gloeckler (1984). Il comprend un fragment SAU 3A d'ADN génomique de 5,3 Kbases de Saccharomyces uvarum, porteur du gène *ERG 10*, inséré dans le site *BAMH 1* du PHCG3. Le gène de résistance à la tétracycline est donc inactivé dans ce plasmide.

Ce plasmide, isolé au départ sur une souche de génome GRF18, a été ensuite introduit par transformation dans une souche de génome FL100 de génotype *erg 10 A ura 3⁻*.



PH. RG TEPRAE 82

Fig. 9 : Plasmide pl. 416

Le dosage de l'activité acétoacétyl CoA thiolase montre que dans la souche transformée erg 10A ura 3⁻/ P1 416, l'activité spécifique est augmentée d'un facteur 14 par rapport à la souche sauvage (tableau 1).

Tableau 1

Les souches ont été cultivées dans le milieu minimum YNB - Hydrolysat de caséine.

| SOUCHES | ACTIVITES SPECIFIQUES acétoacétyl CoA thiolase (μ moles/mg/min). | VALEUR RELATIVE / SAUVAGE |
|-------------------------------------|---|------------------------------|
| FL100 | 0,060 | 1 |
| Erg 10 ura 3 ⁻ | 0,020 | 0,3 |
| Erg 10 A ura 3 ⁻ / P1416 | 0,80 | 14 |

Nous avons également pu observer que le niveau d'activité acétoacétyl CoA thiolase porté par le plasmide p1 416 était régulé comme dans la souche sauvage. En effet, le tableau 2 montre que dans la souche porteuse du plasmide, l'activité est réprimée en anaérobiose, en excès de stérols, comme dans la souche sauvage.

Tableau 2

Les valeurs correspondent à des activités relatives à celle de la souche sauvage cultivée en aérobiose. Le milieu de culture YPG est supplémenté par 50 mg/l d'ergostérol et 50 mg/l d'acide oléique.

| Conditions de culture | Souche Sauvage | Erg 10 ura 3 ⁻ / p1 416 ⁻ |
|-----------------------|----------------|---|
| Aérobiose | 1 | 10 |
| Anaérobiose | 0,2 | 2,7 |

II - MESURE DU TAUX D'ERGOSTEROL DANS LE CLONE TRANSFORME

Etant donné l'amplification de l'activité acétyl-CoA Synthase dans le clone transformé, nous avons déterminé la teneur en ergostérol dans cette souche, selon le protocole décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes.

Les résultats consignés dans le tableau 3 montrent qu'il n'y a aucune augmentation de la teneur en ergostérol par rapport à la souche sauvage. Néanmoins, l'ergostérol étant dosé spécifiquement par son spectre en lumière ultra violette, ceci n'exclut pas que d'autres stérols, ne présentant pas de système diénique, ou un intermédiaire quelconque, s'accumulent. Pour vérifier cette éventualité, nous avons alors effectué un marquage de la voie de biosynthèse des stérols par l'acétate [^{14}C].

III - MARQUAGE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES STEROLS PAR L'ACETATE [^{14}C]

Les souches FL100 ura 3⁻, FL100 ura 3⁻/pl 416, erg 10 ura 3⁻/pl 416, erg 10 et FL100 ont été marquées par l'acétate [^{14}C] ; les composés de la fraction insaponifiable obtenue sont séparés sur couche mince de gel de silice (cf. Matériel et Méthodes).

Les résultats (tableaux 4 et 5) démontrent clairement qu'il n'y a aucune augmentation de l'incorporation d'acétate [^{14}C] dans les composés de l'insaponifiable dans les souches transformées par rapport à la souche sauvage, ceci, lors d'un marquage de longue durée (2 à 4 heures).

Nous avons, alors, essayé de mesurer si la vitesse d'incorporation d'acétate ne pouvait pas être supérieure dans le clone transformé, même si la quantité maximale incorporée n'était pas plus impor-

| CLONE | Taux d'ergostérol |
|-----------------------------------|-------------------|
| Erg 10 ura 3 ⁻ /p1.416 | 0,68% ± 0,03 (2) |
| FL100 ura 3 ⁻ /p1416 | 0,72% ± 0,01 (2) |
| Erg 10 ura 3 ⁻ | 0,41% ± 0,02 (2) |
| FL100 ura 3 ⁻ | 0,74% ± 0,01 (2) |

Tableau 3 - Teneur en ergostérol dans les clones transformés pour l'activité Acétoacétyl CoA thiolase.

Taux d'ergostérol : % par rapport au poids sec
± écart moyen (nombre d'expériences indépendantes)

| | Radioactivité totale Lipides Insaponifiables (cpm) | Stérols (cpm) | 4,4 diméthyl stérols (lano- sterol) (cpm) | Squalène (cmp) | Produits Ligne de bas (cpm) |
|-------------------------------------|--|------------------|--|-------------------|-----------------------------------|
| FL100 ura 3 ⁻ | 422 102 | 282 808 67% | 31 657 7,5 % | 27 436 6,5% | 80 199 19 % |
| FL100 ura 3 ⁻ pl. 416 | 339 702 | 200 424 59% | 30 573 9 % | 31 184 9,18% | 77 519 22,8% |

Tableau 4 : Marquage de la voie de biosynthèse des stérols par l'acétate[¹⁴C]:
Répartition de la radioactivité dans les dérivés insaponifiables :

Souches FL100 ura 3⁻ : $2 \cdot 10^7$ cellules /ml

FL100 ura 3⁻ /pl 416 : $2,1 \cdot 10^7$ cellules /ml

temps de marquage : 4 heures.

Les pourcentages sont calculés par rapport à la radioactivité totale des lipides insaponifiables

Radioactivité introduite : 1mCi/ml 5.000.000 cpm

| | Erg 10 ura 37pl 416 | Erg 10 | FL100 |
|---|----------------------|--------------------|----------------------|
| Radioactivité incorporée (cpm) et % /* introduite | 2 015 000 cpm 40,5 % | 1 280 000 cpm 30 % | 2 430 000 cpm 48,6 % |
| TCA insoluble (cpm) % /* incorporée | 1 551 550 cpm 77 % | 872 800 cpm 76 % | 1 244 000 cpm 30 % |
| %TCA _I | 124 120 cpm 8 % | 9 728 cpm 1 % | 155 520 cpm 8 % |
| Insaponifiable % incorp. | 147 095 cpm 7,3% | 8 960 cpm 0,7% | 187 100 cpm 7,7% |
| Ergostérol (cpm) %/* insaponifiable | 88 257 cpm 60 % | | 134 712 cpm 72 % |
| Lanostérol (cpm) %/* insaponifiable | 19 122 cpm 13 % | | 28 065 cpm 15 % |
| Squalène 2-3 époxyde (cpm) %/* insaponifiable | 8 825 6 % | | 5 613 cpm 3 % |
| Squalène (cpm) %/* insaponifiable | 26 477 18 % | | 9 355 cpm 5 % |

Tableau 5 : MARQUAGE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES STEROLS

Répartition de la radioactivité dans différentes fractions après incorporation "in vitro", de l'acétate de sodium [¹⁴C] dans les souches FL100, erg 10 ura 37pl 416, erg 10
 Durée de marquage : 2 heures (tampon citrate 0,1 M pH 4,5)
 * radioactivité

fante que dans la souche sauvage. Pour ce faire, nous avons, tout d'abord, dû mettre au point les meilleures conditions d'incorporation d'acétate [^{14}C].

1 - Mesure de la vitesse d'incorporation de l'acétate [^{14}C]

Les mesures d'incorporation sont effectuées en quantifiant la radioactivité cellulaire, après incubation en présence d'acétate [^{14}C] puis lavage des cellules. Cette radioactivité indiquera les produits du métabolisme de l'acétate. On peut, en effet, faire l'hypothèse que les produits majeurs seront les acides gras et les stérols, principaux dérivés de l'acétyl CoA. Cette hypothèse trouve confirmation dans le fait qu'en général la fraction TCA insoluble (macromolécules + lipides) correspond à environ 80 % de l'acétate incorporé.

1-1. Influence du pH

Dans la technique initiale, l'incubation était effectuée dans du tampon phosphate pH 6,6. Afin de déterminer un pH idéal pour une incorporation optimale, des expériences d'incorporation d'acétate ont été réalisées, en fonction du pH, sur la souche sauvage FL 100, selon le protocole décrit dans Matériel et Méthodes.

La durée du marquage est de 120 minutes, en présence de 3 % de glucose (p/v), dans du tampon citrate 0,1 M pour les pH compris entre 1 et 5 et dans du tampon phosphate 0,1 M pour les pH neutres (jusqu'à 7).

Les résultats consignés dans la fig. 10 indiquent que les cellules présentent une incorporation maximale autour de pH 3,5. Cette incorporation meilleure à pH acide qu'à pH neutre pourrait s'expliquer par une meilleure diffusion de la forme acide de l'acétate de sodium [^{14}C].

Toutes les expériences ultérieures ont, dès lors, été réalisées à pH 4 pour une meilleure incorporation.

7-2. Incorporation et fonction du temps

Le protocole d'incorporation est décrit au paragraphe 7-3 de Matériel et Méthodes. Les cellules sont prélevées et filtrées toutes les 15 minutes, 4 souches ont été étudiées : FL100, GRF18 et deux mutants auxotrophes pour les stéroïdes eng. 3 et eng. 7.

L'analyse des courbes des cinétiques d'incorporation (fig. 11) fait apparaître une différence d'incorporation essentiellement entre les souches de génome FL100 et la souche de génome étranger GRF18, dans les mêmes conditions d'expérience (même nombre de cellules, même milieu de culture, même durée d'incubation). L'incorporation est linéaire pendant 60 minutes environ pour chaque souche étudiée; les courbes atteignent ensuite un plateau, même si la radioactivité incorporée n'est pas la même. Les expériences ont ensuite été effectuées avec des temps d'incubation plus longs. La figure 12 montre qu'un plateau d'incorporation est atteint à 150 minutes, puis la radioactivité intracellulaire diminue significativement; ce qui indique qu'une partie des molécules synthétisées est : soit excrétée dans le milieu, soit dégradée et rejetée sous forme de CO_2 . Une aliquote du milieu d'incubation (4 heures) a été chromatographiée en n propanol-ammoniaque-eau 6:3:1 (v/v/v), après avoir éliminé les cellules par centrifugation.

La figure 13 montre la présence de molécules nouvelles, vraisemblablement synthétisées à partir de l'acétate. La nature de ces molécules n'a pas été déterminée; néanmoins, le pic correspondant à un Rf de 0,57 pourrait être un reste d'acétate, par contre, le pic migrant avec le front du solvant présente le même Rf que les alcools du type géraniol et farnésol.

RADIOACTIVITE
INCORPOREE
cpm

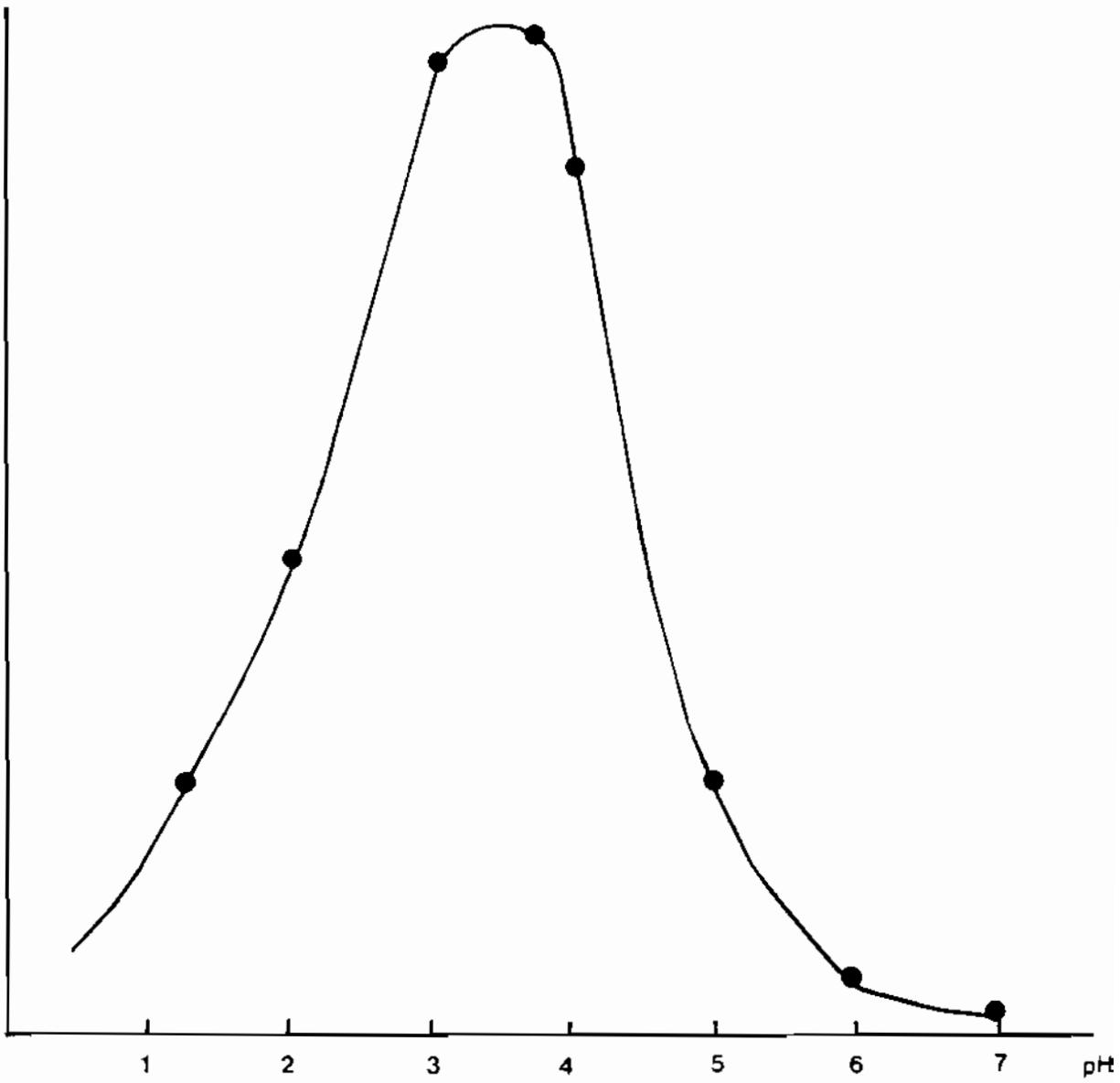


Fig. 10 : Entrée de l'acetate en fonction du pH souche sauvage FL100
Les pH acides sont obtenus avec le tampon citrate HCl, 0.1 M.
Les pH basiques sont obtenus avec le tampon phosphate 0.1 M.
Durée d'incorporation : 2 heures.

RADIOACTIVITE
Cpm

- 55 -

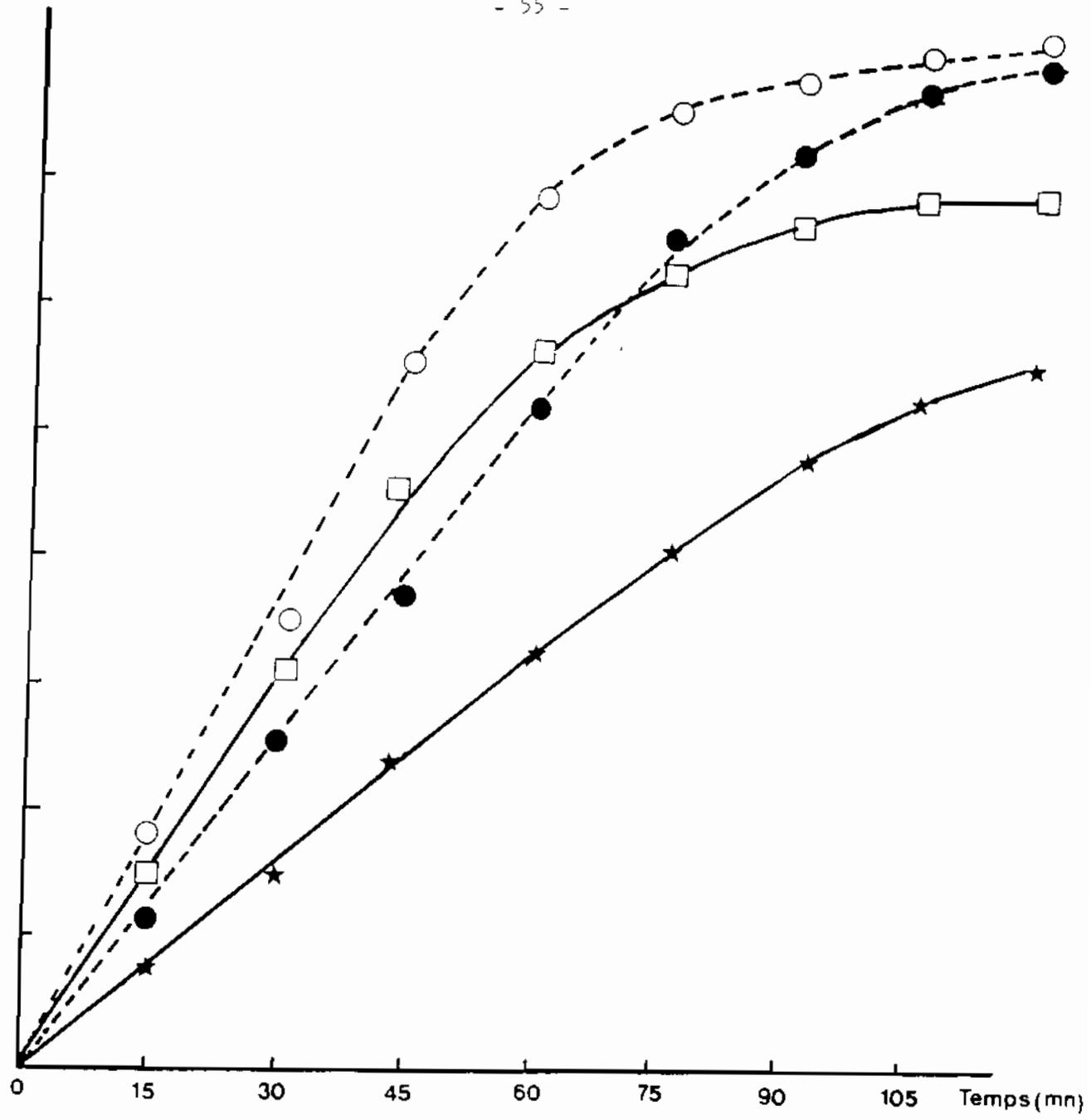


Fig. 11 : Incorporation d'acétate de Sodium [^{14}C] en fonction du temps, dans les cellules de levure. Incorporation à pH 4

- FL 100
- ★-----★ GRF 18
- Erg 7
- Erg 1

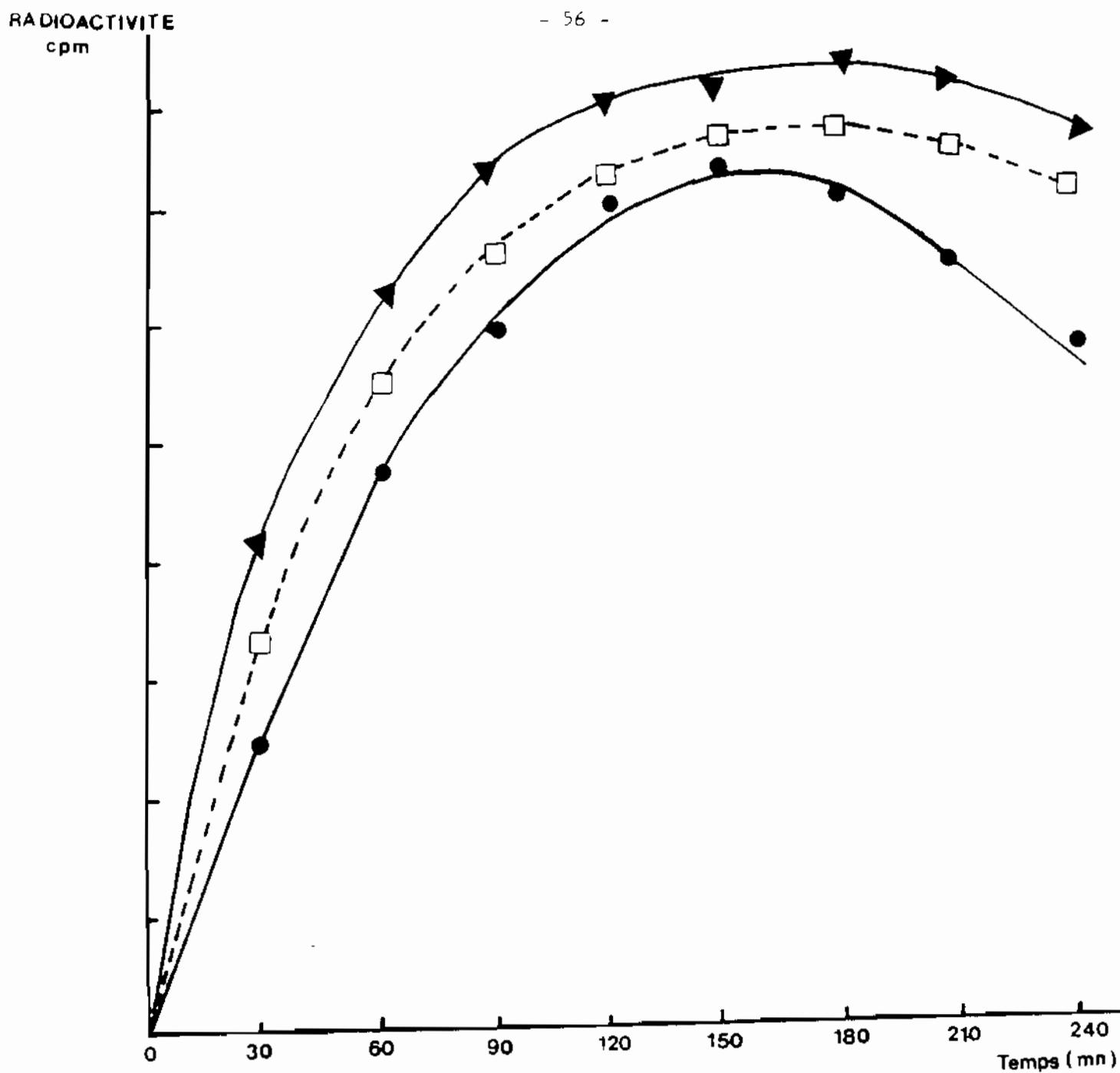


Fig. 12 : Cinétiques d'incorporation d'acétate de sodium dans les cellules, pour des durées d'incubation supérieures à 2 heures à pH 4,5

- — □ erg 7
- — ● erg 1
- ▲ — ▲ FL100

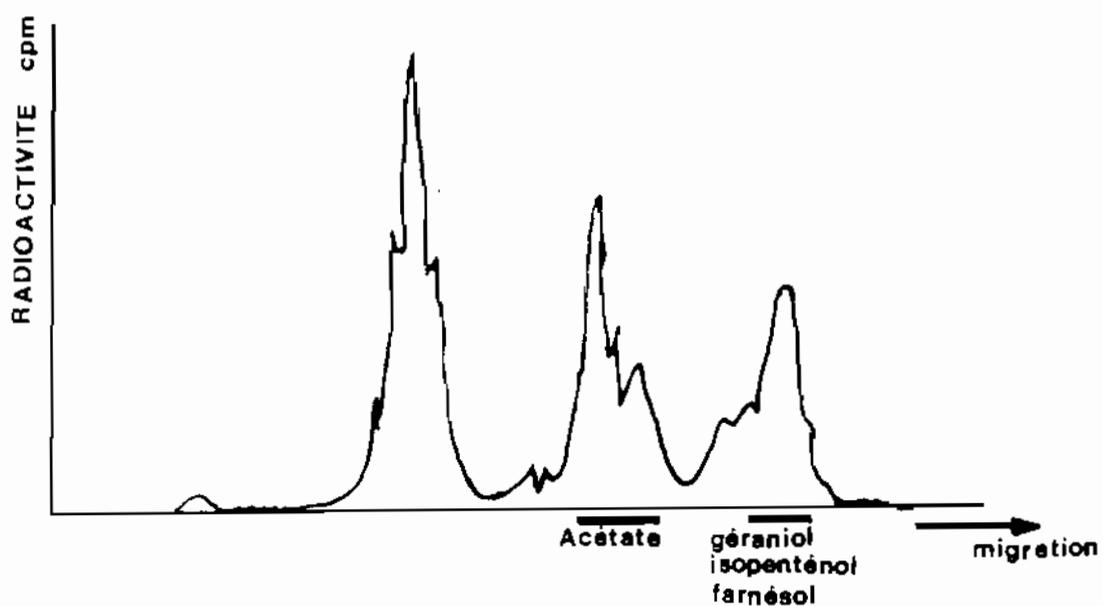


Fig. 13 - INCORPORATION DE L'ACÉTATE [^{14}C] DANS LA SOUCHE SAUVAGE FL100
CHROMATOGRAMME DU MILIEU D'INCORPORATION APRES 4 HEURES
D'INCUBATION

1-3. Effets de la céruléine sur l'incorporation d'acétate de sodium [14 C]

Dans les conditions optimales de marquage des cellules, nous avons déterminées que seulement un faible pourcentage de l'acétate (environ 10%) se retrouvait incorporé sous forme de lipides insaponifiables. Pour augmenter l'incorporation dans cette fraction, nous avons fait l'hypothèse que si la synthèse des acides gras était inhibée, l'acétate serait préférentiellement incorporé dans les stérols. L'inhibiteur que nous paraissait adéquat était la céruléine, décrit comme inhibant spécifiquement la synthèse des acides gras. Le tableau 10 (parties A et B) montre que l'inhibition de croissance due à la céruléine peut être totalement relâchée par une addition d'acide gras saturé (acide myristique). Ceci, que la concentration de céruléine soit faible (5 μ g/ml) ou forte (50 μ g/ml)

Nous avons donc répété les expériences de marquage par l'acétate [14 C] sur des cultures préalablement traitées par la céruléine (5 μ g/ml). La céruléine est ajoutée 30 min avant l'acétate [14 C]. La figure 14 présente les cinétiques d'incorporation des souches FL100, erg 10 et du clone transformé erg 10 A (ara 3⁻ / pl. 416), en fonction du temps.

Les résultats montrent qu'en présence de céruléine, l'incorporation de l'acétate dans la fraction TCA insoluble est très fortement diminuée et le maximum d'incorporation en présence de céruléine pour la souche sauvage FL100 est d'environ 1/10e par rapport au témoin non traité. Ceci indique que malgré le blocage de la biosynthèse des acides gras, il n'y a pas de dérivation supplémentaire de l'acétate vers la voie des stérols.

Par ailleurs, la souche erg 10 ara 3⁻ transformée avec le plasmide porteur du gène de l'acétoacétyl COA thiolase présente une vitesse d'incorporation seulement faiblement augmentée par rapport

| NB 28° | Ergotol | Cérolénine 5µg/ml | Cérolénine 1µg/ml |
|-----------|---------|----------------------|----------------------|
| FL100 | +++ | 0 | 0 |

| NB 28° | Cérolénine 5µg/ml | Cérolénine 50µg/ml | Cérolénine 50µg/ml + ergostérol 40µg/ml |
|----------------------------------|----------------------|-----------------------|--|
| acide myristique 200 µg/ml | +++ | ++ | ++ |

Tableau 6 : Effets de la cerulenine sur la souche sauvage FL100

A : Effet inhibiteur sur la souche sauvage

B : Relèvement de l'inhibition par l'acide myristique

RADIOACTIVITE
(Cpm)

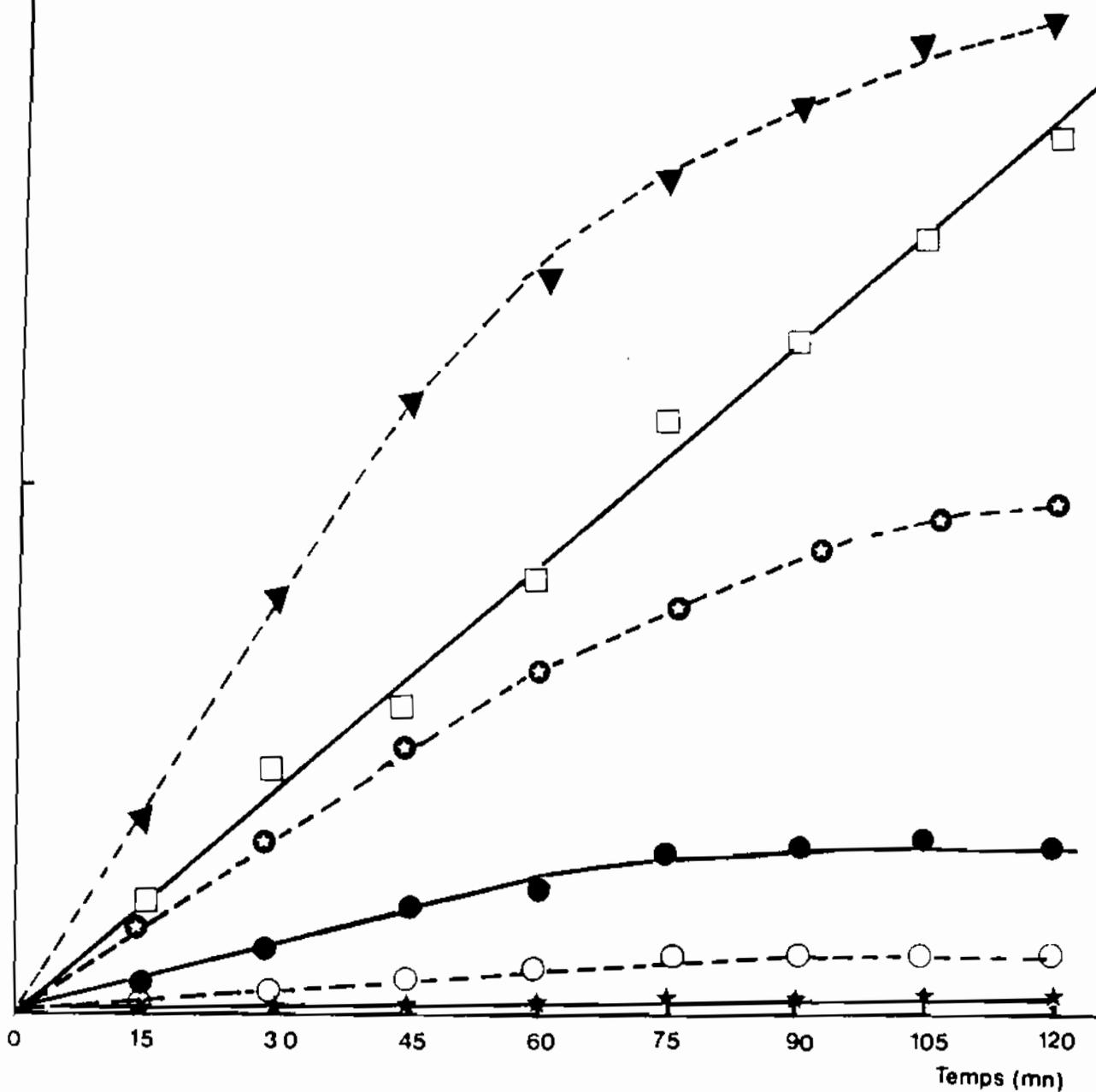


Fig. 14 : Incorporation d'acétate dans la fraction TCA insoluble, après ou sans traitement par la cérolémine

- ▲—▲ : Incorporation dans la fraction TCA insoluble, sans traitement par la cérolémine (souche FL100)
- : Incorporation d'acétate dans la fraction TCA insoluble sans traitement par la cérolémine (erg 10 ura 3⁻/pl 416)
- ⊕—⊕ : Incorporation dans la fraction TCA insoluble sans traitement par la cérolémine (Erg 10)
- : Incorporation après traitement par la cérolémine (FL100)
- : Incorporation après traitement par la cérolémine (erg 10 ura 3⁻/pl 416)
- ★—★ : Incorporation dans la fraction TCA insoluble après traitement par la cérolémine (Erg 10).

à la souche parente erg 10⁻ et néanmoins, plus faible que dans la souche sauvage. Les mêmes résultats sont observés dans les témoins non traités par la céruléine.

La première étape de l'utilisation de l'acétate est sa transformation en acétyl CoA. Nous avons pu mesurer in vitro que l'activité spécifique de l'acétyl CoA synthétase, qui catalyse la réaction acétate \longrightarrow acétyl CoA en présence d'ATP est de 0,015 μ moles d'acétyl CoA formé / mg de protéine/minute, chez la souche sauvage FL100 ; ce qui est inférieur d'un facteur 10 à l'activité acétoacétyl CoA thiolase. Ceci pouvait signifier que l'étape limitante de l'incorporation de l'acétate serait la transformation de l'acétate en acétyl CoA. Toutefois, les résultats obtenus en présence de céruléine montrent que même si le pool d'acétyl CoA est augmenté par inhibition de la synthèse des acides gras, la vitesse de synthèse des stérols ne l'est pas ; ce qui exclut cette hypothèse.

IV - CONCLUSION

Tous ces résultats montrent clairement que la forte amplification de l'activité acétoacétyl CoA thiolase n'entraîne pas une augmentation ni de la vitesse de synthèse des stérols, ni de la quantité des stérols synthétisés.

C H A P I T R E I I I

MESURE DU TAUX D'ERGOSTEROL DANS LES
DIPLOIDES HETEROALLELES

Au laboratoire, ont été isolés, les gènes ERG 9 et ERG 12 codant respectivement pour les activités squalène synthétase et mévalonate kinase.

Les souches porteuses de ces gènes sur plasmides multicopies présentent une augmentation d'activité d'un facteur 2 pour la squalène synthétase (Richard, 1986) et 15 pour la mévalonate kinase (Culminder, communication personnelle). Par ailleurs, Rine et al. (1986) ont isolé le gène codant pour l'HMG CoA réductase. Dans tous ces cas, aucune augmentation du taux final d'ergostérol n'a été observée ou décrite.

Comme l'ergostérol ne semble pas être la molécule régulatrice, il fallait donc avoir une approche plus globale : le dosage du taux d'ergostérol dans les diploïdes hétéroallèles.

Les mutations affectant une étape de biosynthèse sont très généralement récessives ; ceci s'explique par le fait que, même si un des deux allèles est inactivé, la quantité d'enzyme produite par l'allèle fonctionnel sera toujours en excès par rapport aux besoins cellulaires. Tous les mutants auxotrophes pour l'ergostérol portent des mutations récessives.

Dans le cas où une enzyme serait limitante dans la biosynthèse de l'ergostérol, on pouvait attendre que dans le diploïde hétérozygote, l'on observe une diminution du taux d'ergostérol. Toutefois, cette diminution ne va pas avoir une influence sur la croissance des cellules car Servouse et al., 1986 ont pu observer qu'en aérobiose, une teneur en stérols des souches de 0,35 % par rapport au poids sec, au lieu de 0,76 % (taux de la souche sauvage), ne modifie pas la croissance cellulaire.

CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET GENETIQUE DES MUTANTS AUXOTROPHES POUR L'ERGOSTEROL

Au vu de l'instabilité des mutants, nous avons déterminé leurs caractéristiques génétiques et biochimiques, avant la réalisation des diplotes.

1 - Phénotypes des souches

Les tests en gouttes ont été réalisés sur le milieu complet YPG, aux températures permissives (26° et 28°C) et non permissives (36°C), comme décrit dans Matériel et Méthodes paragraphe 2-1. Le tableau ci-après résume l'ensemble des résultats des tests phénotypiques, pour les différentes souches étudiées dans notre travail. On remarque très nettement que le phénomène d'auxotrophie pour les stérols varie en fonction des mutants. Il ne dépend pas de la localisation du bloc enzymatique dans la voie de biosynthèse des stérols. Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus par Mons (1984) et permettent de distinguer, sur le plan des caractéristiques phénotypiques, 3 classes distinctes de mutants parmi les mutants auxotrophes isolés par Karst et al., 1977, Mons 1984.

- Les mutants qui ont un phénotype sauvage à 26°C et qui exigent de l'ergostérol dès 28 °C. A 36°C , ces mutants sont soit incapables de pousser (erg 10, erg 8, erg 1, erg 18, erg 19) ; soit auxotrophes pour l'ergostérol (erg 16).

- Les mutants auxotrophes pour les stérols dès 26°C mais qui ne peuvent pas se multiplier à 36°C malgré la présence d'ergostérol dans le milieu de culture. C'est le cas des mutants erg 11 et erg 12.

- Les mutants auxotrophes pour les stérois et qui ont une croissance normale à toutes les températures permissives et non permissives, lorsque le milieu de culture contient de l'ergostérol. Ces mutants cessent de se diviser dès que l'ergostérol est absent du milieu. C'est le cas du mutant erg 7.

La caractéristique particulière de ces mutants auxotrophes est leur thermo-sensibilité et les mutants n'ont pu être obtenus que sous forme de mutants conditionnels. Ceci indique qu'un bloc enzymatique total dans la biosynthèse des stérois n'est pas compensé par supplémentation de stérois seulement, et que pour des mutants bloqués très tardivement dans la voie de biosynthèse des stérois (erg 16), d'autres molécules produites à partir de la voie de biosynthèse sont exigées. Leur nature n'a pas encore été déterminée.

2 - Blocs enzymatiques

Le bloc enzymatique de chaque souche a été vérifié par marquage à l'acétate de sodium [^{14}C], comme décrit dans Matériel et Méthodes paragraphe 7-1. Le bloc est précisé par comparaison chromatographique des produits marqués de l'insaponifiable, en référence avec les produits de la souche sauvage témoin et les entraîneurs (cf. Matériel et Méthodes, paragraphes 8-11 et 9-1).

Par cette technique les mutants ont pu être classés en 2 groupes :

- Les mutants dont le bloc est situé après le squalène (erg 1, erg 18, erg 7, erg 16). Les chromatogrammes révèlent, pour ces mutants, l'accumulation des produits marqués tels que le squalène, le squalène 2-3 époxyde, le lanostérol, les 4 α méthyls. Les chromatogrammes de quelques mutants sont représentés fig. 15.

| Souches | 26°C | | | 28°C | | | 36°C | | |
|-------------|------|------------|------------|------|------------|------------|------|------------|------------|
| | APG | YPC Erg | YPC Ter | APG | YPC Erg | YPC Ter | YPC | YPC Erg | YPC Ter |
| Fig 10 Aa | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | + | 0 | 0 | 0 |
| Fig 10 A | +++ | +++ | +++ | + | +++ | ε | 0 | 0 | 0 |
| Fig 11 sp2 | + | +++ | ++ | ++ | +++ | + | 0 | ε | 0 |
| Fig 11 sp2a | + | +++ | + | + | +++ | + | 0 | ε | 0 |
| Fig 10 9a | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ε | 0 | 0 | 0 |
| Fig 10 Bα | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | + | 0 | 0 | 0 |
| Fig 19 | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | 0 | ε | 0 |
| Fig 9-1 A | ++ | +++ | 0 | + | +++ | + | ++ | +++ | 0 |
| Fig 16-1a | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | 0 | +++ | + |
| Fig 7-1α | + | +++ | ε | + | +++ | ε | 0 | +++ | ε |
| Fig 7-1a | ++ | +++ | + | ++ | +++ | ε | ε | +++ | ε |
| Fig 8 sp 1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | + | 0 |
| Fig 12-1α | + | ++ | ε | + | ++ | + | 0 | 0 | 0 |
| Fig 1-2a | ++ | +++ | ++ | + | +++ | + | 0 | 0 | 0 |
| Fig 18 | + | +++ | + | + | +++ | + | 0 | 0 | 0 |
| RT 18 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| CC 739 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| L100 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

Tableau 7 : PHENOTYPES DES SOUCHES ETUDIEES.

- Les mutants ne présentant aucune radioactivité dans la fraction insaponifiable, le bloc de ces mutants se situe donc avant la synthèse du squalène : on le localise alors par l'incorporation "in vitro" de mévalonate. Si l'incorporation d'AMV conduit à la synthèse d'une fraction insaponifiable semblable à celle de la souche sauvage, le bloc se situe alors avant l'incorporation de l'AMV (erg 13 et erg 17). Dans le cas contraire, un produit est accumulé et selon l'analyse effectuée (cf. Matériel et Méthodes) (erg 13, 14, 15, 17, 18, 19).

Le tableau 8 présente la relation mutation-bloc enzymatique chez les mutants auxotrophes pour l'ergostérol.

3 - Réalisation des diploïdes et dosages géniques

Les diploïdes ont été réalisés selon le protocole décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes" 4-2, 4-3, 4-4. Les diploïdes sont ensuite cultivés en milieu liquide YPG à 28° en vue du dosage des stéroïdes.

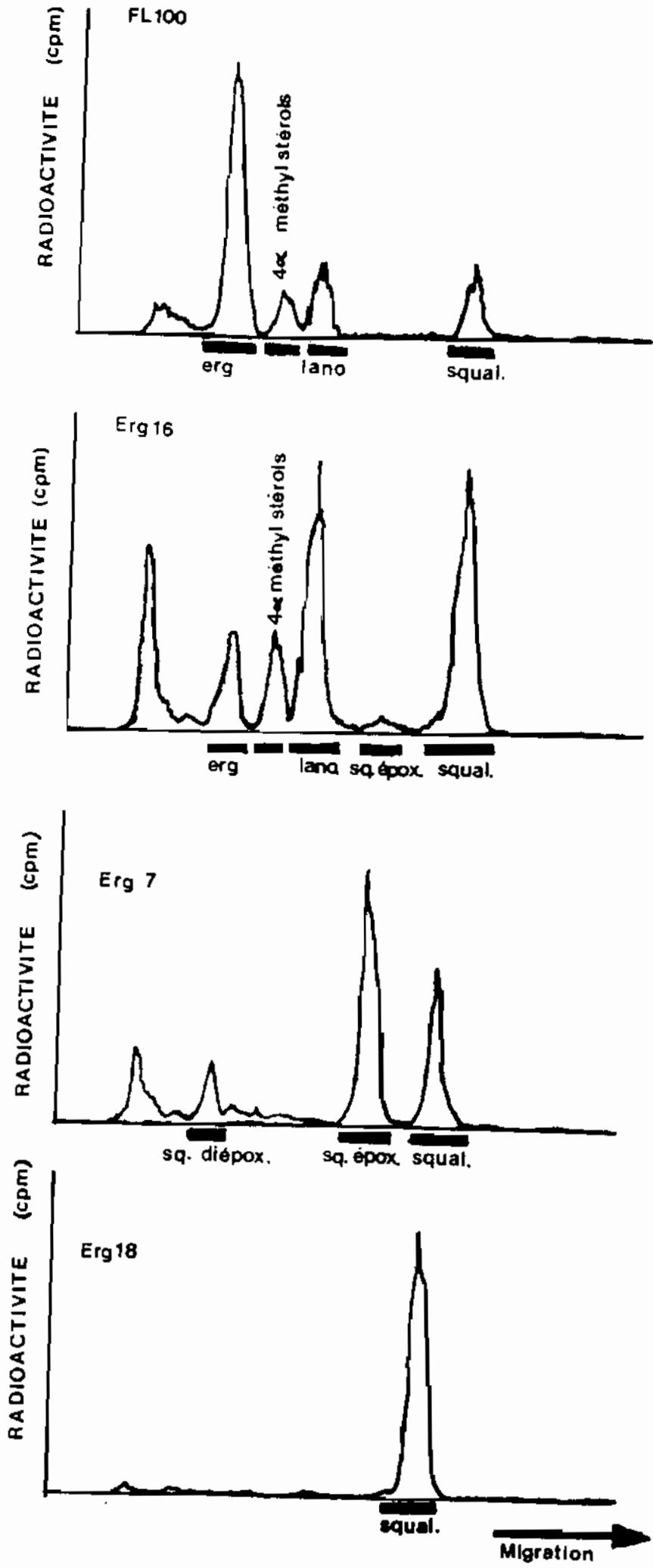
Le tableau 9A montre que les mutants auxotrophes pour l'ergostérol, cultivés en présence de 2 mg/l d'ergostérol, présentent un taux d'ergostérol variant de 0,15 à 0,44 % alors que la souche sauvage cultivée dans les mêmes conditions, renferme un taux d'ergostérol de 0,76 % \pm 0,04.

En ce qui concerne les diploïdes hétérozygotes cultivés en milieu YPG en absence de supplémentation d'ergostérol exogène, on observe (tableau 9B) une teneur en ergostérol, voisine de celle de la souche diploïde sauvage. Cette souche diploïde sauvage présentant d'ailleurs le même taux d'ergostérol que les souches parentales haploïdes FL100 et FL200.

| MUTATIONS | BLOCS ENZYMATIQUES |
|---------------|--|
| Erg 10 A, B | Acétyl-CoA thiolase |
| Erg 11, 13 | MG CoA synthétase |
| Erg 12, 15 | Mévalonate kinase |
| Erg 5 | Phosphomévalonate kinase |
| Erg 12 | Pyrophosphomévalonate décarboxylase |
| Erg 9 | Squalène synthétase |
| Erg 1, 14, 18 | Squalène époxydase |
| Erg 7, 17 | Squalène 2-3 époxyde Lanostérol cyclase |
| Erg 16 | Lanostérol déméthylase |
| Ft 100 | sauvage |

Tableau 8 : Blocs enzymatiques des mutants auxotrophes pour l'ergostérol

Fig. 15 - INCORPORATION DE L'ACETATE DE SODIUM [^{14}C] DANS LES MUTANTS
AUXOTROPHES POUR L'ERGOSTEROL
BLOCS ENZYMATIQUES ET MARQUAGE DE LA FRACTION INSAPONIFIABLE



| SOUCHES | TENEUR EN STEROLS |
|---------|-------------------|
| | 26°C |
| erg 10 | 0,35% ± 0,03 (4) |
| erg 11 | 0,27% ± 0,06 (3) |
| erg 12 | 0,18% ± 0,04 (3) |
| erg 8 | 0,42% ± 0,03 (3) |
| erg 9 | 0,33% ± 0,05 (3) |
| erg 1 | 0,26% ± 0,05 (3) |
| erg 7 | 0,36% ± 0,02 (3) |
| erg 16 | 0,44% ± 0,03 (3) |
| FL100 | 0,76% ± 0,04 (8) |
| FL200 | 0,80% ± 0,02 (3) |

A

| DIPLOÏDE | TENEUR EN STEROLS | |
|--------------------|-------------------|------------------|
| | 26°C | 36°C |
| <u>erg 10</u> ± | 0,55% ± 0,02 (3) | 0,67% ± 0,03 (3) |
| <u>erg 11</u> ± | 0,68% ± 0,03 (3) | 0,72% ± 0,04 (3) |
| <u>erg 12</u> ± | 0,75% ± 0,02 (3) | 0,70% ± 0,03 (3) |
| <u>erg 8</u> ± | 0,77% ± 0,05 (3) | 0,92% ± 0,04 (3) |
| <u>erg 9</u> ± | 0,69% ± 0,03 (3) | 0,80% ± 0,03 (3) |
| <u>erg 1</u> ± | 0,71% ± 0,04 (3) | 0,92% ± 0,05 (3) |
| <u>erg 7</u> ± | 0,75% ± 0,04 (3) | 0,97% ± 0,03 (3) |
| <u>erg 16</u> ± | 0,78% ± 0,03 (3) | 0,95% ± 0,02 (3) |
| <u>±</u> ± | 0,74% ± 0,03 (3) | 0,84% ± 0,04 (3) |

B

Tableau 9 : DOSAGES GENIQUES

A : Teneur en stérols des souches haploïdes

% ergostérol / Poids sec ± écart moyen

B : Teneur en stérols des diploïdes hétéroallèles

% ergostérol / Poids sec ± écart moyen

entre parenthèses : le nombre de mesures indépendantes

La seule exception hautement significative a trait au diploïde $\text{erg } \frac{10}{+}$ dont la teneur est abaissée de l'ordre de 30 % par rapport à la souche sauvage.

Comme les mutants sont TS les mêmes dosages ont été effectués à 36°C et les mêmes résultats ont été observés. Il faut toutefois remarquer que la teneur en stérols est plus élevée de l'ordre de 20 % par rapport à 26°C.

L'ensemble de ces résultats montre d'une part que la teneur en stérols d'une souche de levure est fortement régulée et que la seule activité enzymatique qui paraît limitante et qui ne peut être accélérée dans le diploïde, correspond au gène $\text{ERG } 10$ c'est-à-dire l'acétoacétyl CoA thiolase. Ce résultat est apparemment, en complète contradiction avec les résultats obtenus dans le chapitre précédent qui montraient que l'activité acétoacétyl CoA thiolase était largement en excès.

C H A P I T R E I V

ETUDE D'UNE SOUCHE DE LEVURE PRESENTANT UNE
TENEUR EN STEROLS ELEVEE : NCYC 739.
ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE MUTANTS AMPHOTERICINE B
RESISTANTS

C H A P I T R E I V

ETUDE D'UNE SOUCHE DE LEVURE PRESENTANT UNE
TENEUR EN STEROLS ELEVEE : NCYC 739.
ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE MUTANTS AMPHOTERICINE B
RESISTANTS

La souche NCYC 739 est un diploïde, isolé à partir de l'air par L. Penasse. Elle nous a été fournie par le centre de recherches INRA-L. Elle est décrite dans la littérature comme présentant une teneur élevée en stérols (Mercer et al., 1984).

Nous avons pu déjà utiliser cette souche en vue de déterminer, d'une part, si une souche riche en stérols pouvait avoir un phénotype spécifique (résistance à un antibiotique par exemple) et d'autre part, la cause métabolique de cette teneur élevée en stérols, ce qui pouvait nous renseigner sur la régulation de la biosynthèse des stérols.

I - ANALYSE DU TAUX DE STÉROLS DE LA SOUCHE

Le spectre de la fraction insaponifiable, obtenue à partir d'une culture aérobie de cette souche à 28°C en milieu YPG, montre les pics caractéristiques de l'ergostérol (281,5 nm et 260 nm), mais de plus, une absorption importante à 230 nm, caractéristique des α , 7, 22, 24 (28) tétra énoles (fig. 16).

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (Mercer et al., 1984), montre que les deux stérols majeurs correspondent à l'ergostérol et au 24 (28) déhydroergostérol.

À 281,5 nm, l'ergostérol et le 24 (28) déhydroergostérol présentent à peu près la même absorbance (caractéristique du 5,7 diène). Leur somme, correspondant alors à la teneur globale en stérols, peut être calculée par l'équation :

$$\% \text{ ergostérols} = \frac{\text{absorbance } 281,5}{290} \times F$$

F étant le facteur de dilution.

290 = coefficient d'absorption E (1 % cm) de l'ergostérol

Absorbance

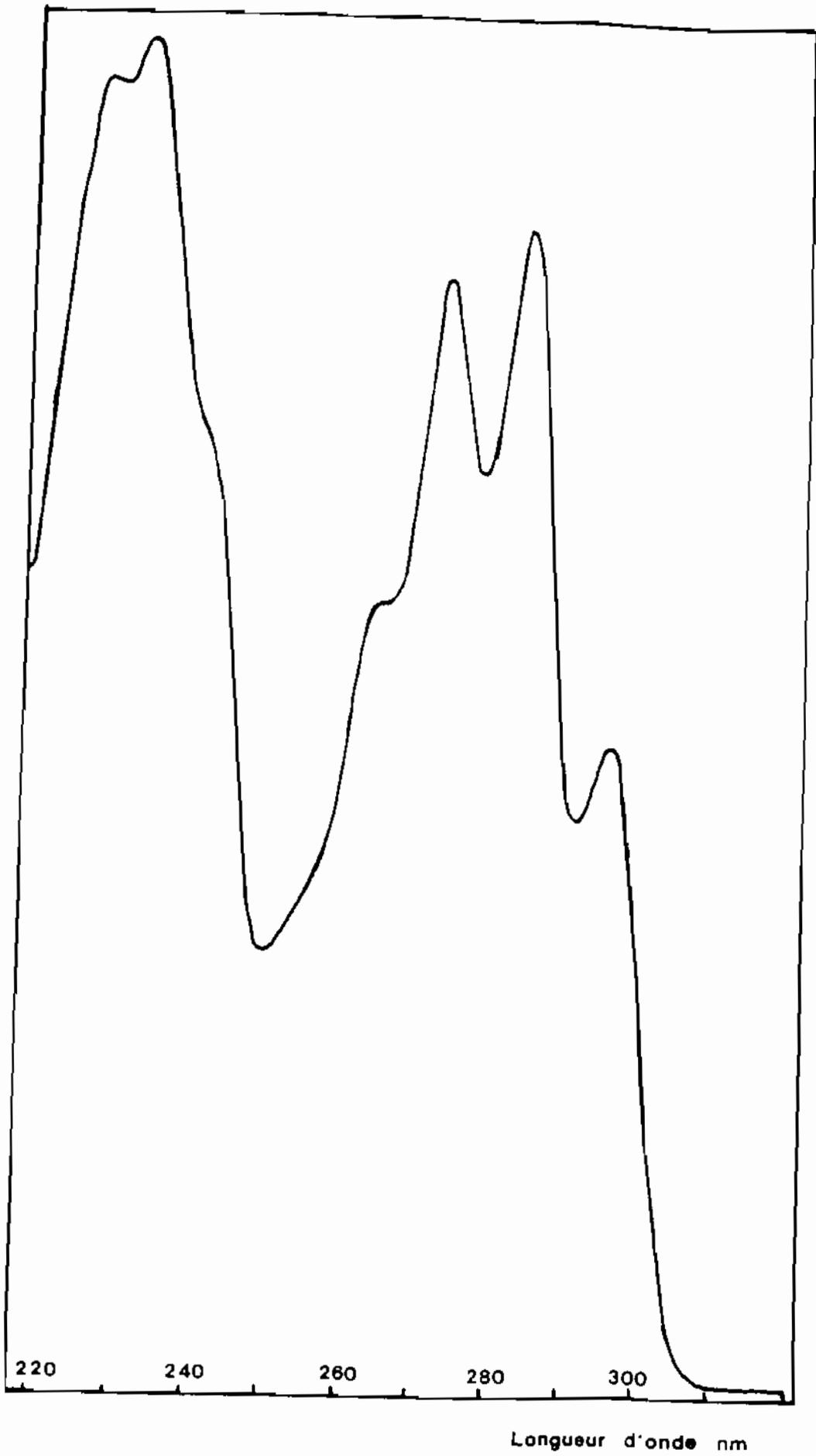


Fig. 16 - SPECTRE DES ERGOSTEROLS DANS LA SOUCHE NCYC 739

Dans ces conditions, la souche NCYC 739 contient 3 % de stérols soit environ 4 fois plus de stérols que la souche sauvage.

La teneur en 24 (28) déhydroergostérol peut être calculée en utilisant le coefficient d'absorption du 24 (28) déhydroergostérol caractéristique du diène 22-24(28), qui est de 518 dans l'heptane à 230 nm.

L'équation devient alors

$$\% \text{ 24 (28) déhydroergostérol} : \frac{\text{absorbance à 230 nm}}{518} \times F$$

F = facteur de dilution.

Le rapport entre les 2 équations donne le pourcentage de 24 (28) déhydroergostérol par rapport aux stérols totaux. La souche NCYC 739 renferme environ 66 % de 24 (28) déhydroergostérol et 34 % d'ergostérol, alors que notre souche sauvage FL100 ne contient pas de 24 (28) déhydroergostérol.

Amphotéricine B en mg/l

| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|----------|-----|-----|-----|-----|----|----|----|
| FL100 | +++ | ++ | + | | 0 | 0 | 0 |
| FL200 | +++ | ++ | ++ | | 0 | 0 | 0 |
| NCYC 739 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |

Tableau 10 : Résistance des souches FL100, FL200 et NCYC 739 à l'amphotéricine B.

II - PHENOTYPE DE LA SOUCHE

La souche a été testée en milieu YNB en présence de drogue Nystatine et Amphotéricine B. Nous avons pu observer que cette souche présentait la même sensibilité à la nystatine que la souche sauvage FL100, mais qu'elle était résistante à l'amphotéricine B, alors que la croissance du sauvage est inhibée avec une concentration d'amphotéricine de 30 µg/ml (tableaux 10, 11, 12).

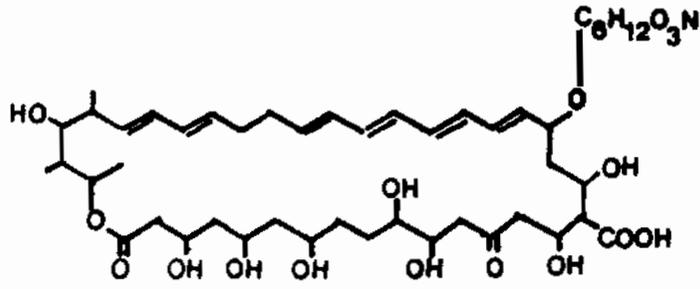
Ces résultats montrent que par le biais de la sélection des mutants résistants à l'amphotéricine B, nous pouvons espérer obtenir des souches présentant une teneur élevée en stérols.

CARACTERISTIQUES DE L'AMPHOTERICINE B

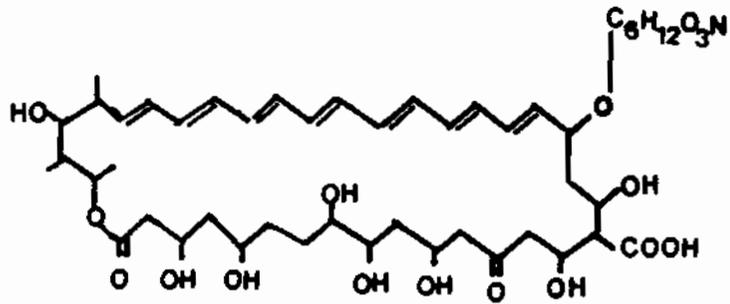
L'amphotéricine B est un antibiotique polyénique, commercialisé sous le nom de fungizone. Elle est sensible à la chaleur et à la lumière. Sa structure chimique est proche de celle de la nystatine (autre polyène antifongique) (fig. 17).

Elle interagit avec les stérols membranaires en s'y fixant, ce qui crée par désorganisation des constituants membranaires, la formation de véritables pores par lesquels le contenu cellulaire s'échappe (De Kruijff et al., 1974 III, Bertut-Croquin et al., 1983) et une altération dans la perméabilité cellulaire (De Kruijff et al., 1983 I, II ; Teerlink et al., 1980).

L'amphotéricine B est inactive contre les bactéries dépourvues de stérols. Elle est plus active contre les levures, les champignons, les dermatophytes et les moisissures (Demel et al., 1980). Elle n'agit pratiquement pas sur les cellules animales. Cette toxicité spécifique est due à sa plus grande affinité pour l'ergostérol que pour le cholestérol (Gale 1974 ; Archer 1976).



Nystatine



Amphotéricine B

Fig. 17 . Structures chimiques de la nystatine et de l'amphotéricine B.

ISOLEMENT DES MUTANTS AMPHO B^R.

Les mutants sont isolés, sur milieu YNB contenant des concentrations croissantes d'amphotéricine B (0 à 50 µg/ml), à partir des 2 souches sauvages FL100 et FL200, par mutagénèse selon le protocole décrit dans Matériel et Méthodes paragraphe 4-5.

5 mutants de chaque signe sont repris. Ils résistent en moyenne jusqu'à 80 µg d'amphotéricine/ml, alors que la souche sauvage est totalement inhibée à partir de 20 µg/ml (tableau 10).

Nous avons pu observer que tous ces mutants présentaient la même sensibilité à la nystatine que la souche sauvage (Tableaux 11 et 12).

Malheureusement, l'étude génétique de ces mutants n'a pu être menée, car lors des transferts sur milieu complet YPG pour la réalisation des diploïdes, les mutations révertaient très rapidement dans le phénotype sauvage.

Nous avons été obligés de les conserver en permanence sur le milieu YNB contenant de l'amphotéricine B.

Toutefois, nous avons analysé la teneur en stérols d'un certain nombre de ces mutants. Les résultats sont consignés dans le tableau 13 et montrent que les mutants ampo B^R 8 et ampo B^R 12 présentaient une augmentation de la quantité d'ergostérol de l'ordre de 20 % par rapport à la souche sauvage.

Vu la faible augmentation du taux de stérols, nous n'avons pas poursuivi l'étude de ces mutants.

Amphotéricine B en $\mu\text{g/ml}$

| SOUCHES | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 60 |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ampho B ^R 1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | - | ε | ε |
| Ampho B ^R 2 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | + | ε | ε | 0 |
| Ampho B ^R 3 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | -- |
| Ampho B ^R 4 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Ampho B ^R 5 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| Ampho B ^R 11 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Ampho B ^R 12 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ε |
| Ampho B ^R 13 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | + | ε |
| Ampho B ^R 14 | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Ampho B ^R 15 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | + |
| FL100 | +++ | +++ | ++ | ε | ε | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tableau 11 : Résistance des mutants isolés par irradiation aux ultra-violets, en présence d'amphotéricine B. Milieu YNB
La concentration en amphotéricine B est exprimée en mg/l.

Concentration de Nystatine ($\mu\text{g/ml}$)

| SOUCHES | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ampho BR1 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampho BR2 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampho BR3 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampho BR4 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampho BR5 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampho BR11 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampho BR12 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampho BR13 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampho BR14 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampho BR15 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Nyst. R | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| FL100 | +++ | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tableau 12 : Effet de la Nystatine sur les mutants résistants à l'amphotéricine B, en milieu complet YPG.

| SOUCHES | P.S. (g/ml culture) | % stérols |
|-------------------------|---------------------|-----------|
| Ampho B ^R 1 | 0,0103 | 0,70 % |
| Ampho B ^R 5 | 0,0119 | 0,76 % |
| Ampho B ^R 8 | 0,0097 | 1,07 % |
| Ampho B ^R 12 | 0,0109 | 0,92 % |
| NCYC 739 | 0,0093 | 3,3 % |

Tableau 13 : Dosage de l'ergostérol dans des mutants résistants à l'amphotéricine B.

PS : poids sec

% d'ergostérol / Poids sec.

Récemment au laboratoire, des mutants dépourvus d'alcool deshydrogénase ADH₁ ont été isolés (Maudet 1987). Ces mutants présentent une teneur en stérols augmentée de l'ordre de 25 % par rapport à la souche sauvage. Ces mutants ont été testés sur différents antifongiques, agissant sur les stérols et, il a été montré qu'ils sont également résistants à l'amphotéricine B ainsi que faiblement résistants à la nystatine.

Ces résultats confirment donc que la résistance à l'amphotéricine B pourrait être un phénotype spécifique pour des mutants présentant une teneur élevée en stérols.

C H A P I T R E V

REGULATION DE L'ACTIVITE SQUALENE SYNTHETASE

La squalène synthétase est la première enzyme spécifique de la branche stéroïde de la voie de biosynthèse des stéroïdes et des isoprénoides. En effet le farnésyl pyrophosphate (FPP) synthétisé à partir du mévalonate est polymérisé (fig. 18), d'une part en cis polyprényl pyrophosphate (dolichols) par une cis-prényltransférase, et d'autre part, en trans-polyprényl pyrophosphate (chaîne latérale de l'cholestérol) par une trans-prényltransférase. Ces polymérisations correspondent à des additions tête-queue d'isopentényl pyrophosphate sur la molécule de FPP. L'activité squalène synthétase permet, quant à elle, la condensation de 2 molécules de FPP, tête-tête, pour conduire au squalène.

I - CARACTERISTIQUES DE LA SQUALÈNE SYNTHÉTASE

La squalène synthétase est associée aux fractions microsomales dans le foie de rat et chez la levure. A partir de ces fractions particulières de levure, on a pu démontrer que la synthèse du squalène nécessitait un réducteur (NADPH ou NADH) (Qureshi et al., 1973 III). L'activité optimale est obtenue à pH 7,4 et exige des ions divalents comme les ions magnésium Mg^{++} .

De nombreux auteurs ont étudié la structure et les mécanismes de conversion du FPP en squalène. Popjak et al., 1966, Rilling et al., 1970, Agnew et al., 1978 ont émis l'hypothèse que la réaction se déroule en deux étapes consécutives (fig. 19).

La première, correspondant à la condensation de 2 FPP, conduit au présqualène pyrophosphate, avec libération d'un proton et d'un groupement pyrophosphate (Epstein et al., 1970, Betya et al., 1973, Agnew et al. 78 a).

Dans la seconde étape, le présqualène pyrophosphate est réduit par le NADPH avec perte d'un groupement pyrophosphate. Cette étape conduit au squalène.

Ainsi, en absence de NADPH ou de NADH, il y a accumulation de présqualène pyrophosphate.

Plusieurs travaux ont démontré que le présqualène pyrophosphate n'est pas un artefact ne s'observant que quand le milieu réactionnel est privé de réducteur (NADPH ou NADH) ; mais que ce présqualène pyrophosphate était toujours formé, en présence comme en absence de NADPH et NADH et que dans les conditions physiologiques, il ne pouvait s'accumuler (Corey et al., 1976).

Dans la synthèse du phytène (précurseur du carotène), la mise en évidence du préphytène pyrophosphate a montré que la condensation, tête à tête, de 2 molécules de géranyl-géranyl pyrophosphate se déroulait selon un mécanisme très voisin de celui catalysé par la squalène synthétase.

Le présqualène pyrophosphate est donc un intermédiaire obligatoire dans la biosynthèse du squalène. La synthèse du squalène va donc exiger soit l'existence de 2 sites actifs sur une même protéine (Schechter et al. 1971), soit l'existence de 2 enzymes (Qureshi et al., 1973).

La solubilisation, rendue possible avec le désoxycholate, a montré que les deux activités sont sur la même protéine enzymatique de masse moléculaire 54500 (Agnew et al., 1978). Les activités, dans cet état soluble, sont inhibées et peuvent être restaurées partiellement après élimination du détergent. Lorsque l'enzyme ainsi solubilisée est séparée des lipides, il est nécessaire d'ajouter des phospholipides (phosphatidylcholine), pour qu'elle recouvre une activité appréciable.

Dans ces conditions, aussi bien la libération du proton que la synthèse totale du squalène sont retrouvées.

Ceci indique que s'il y a 2 protéines enzymatiques distinctes, de même masse moléculaire (54500), elles pourraient se réassocier,

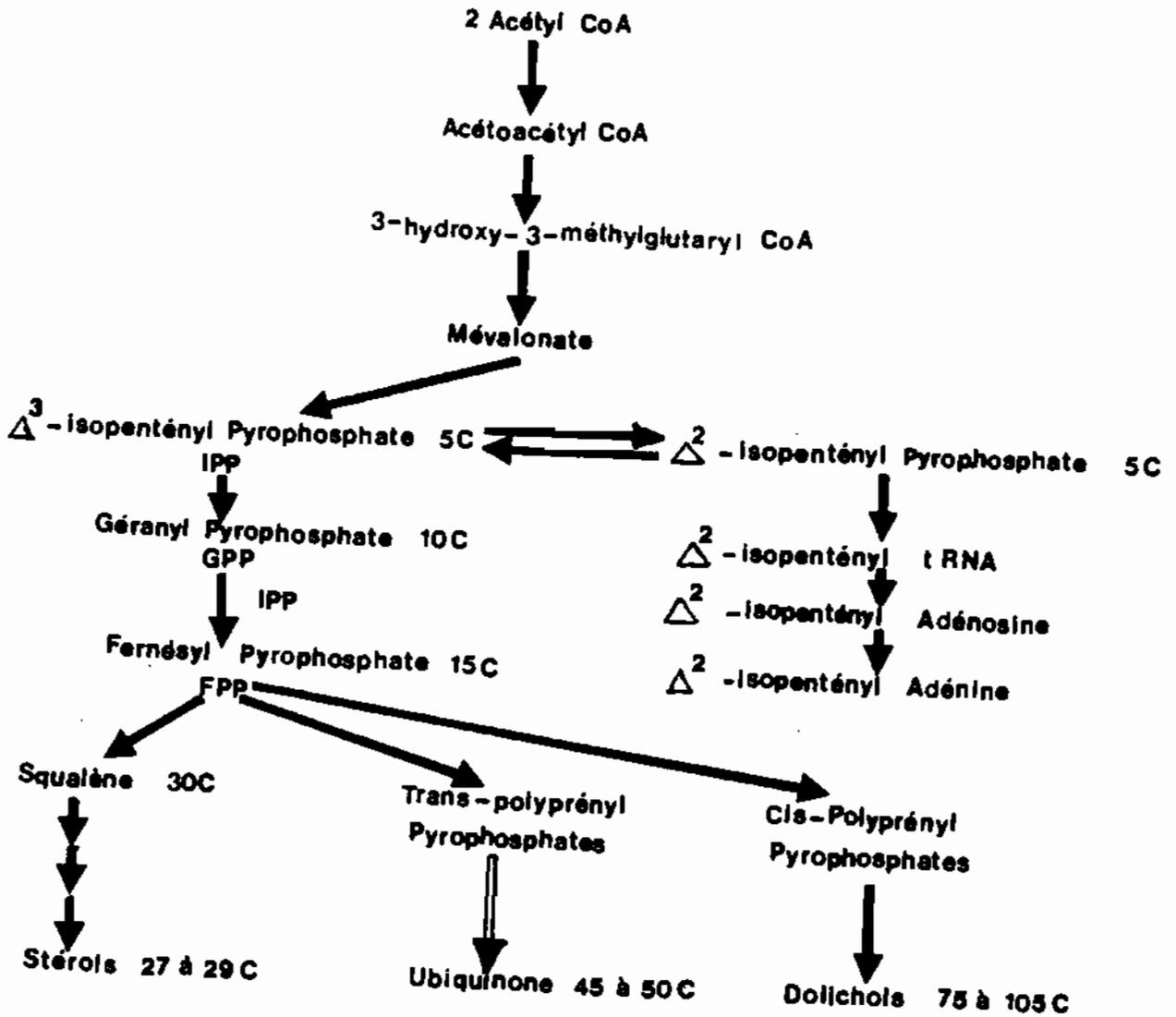


Fig. 18 - VOIE DE BIOSYNTHESE DES STEROLS ET DES ISOPRENOIDES

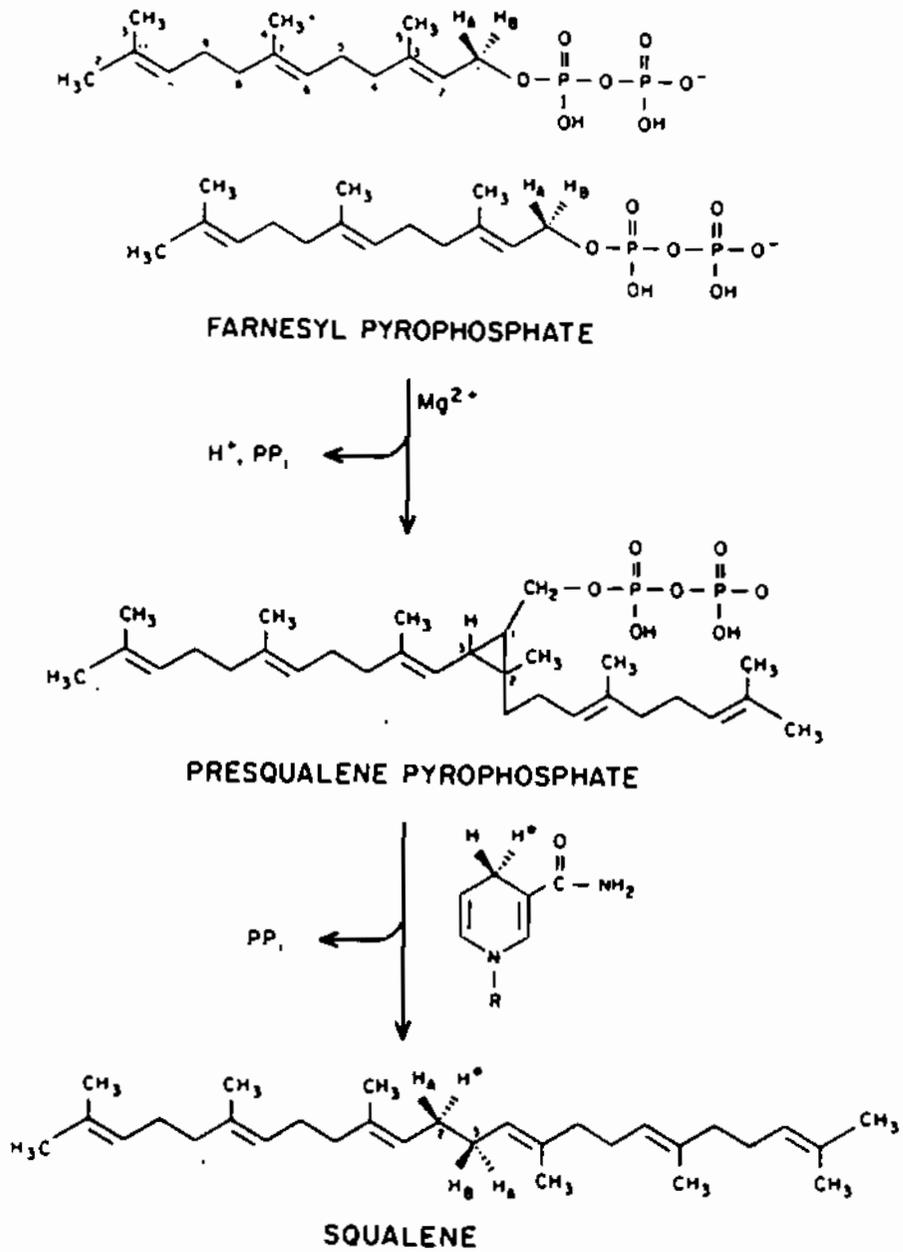


Fig. 19. Mécanisme de Biosynthèse du Squalène selon Rilling (1966)

sous l'influence des phospholipides, pour redonner un complexe actif ; mais ceci n'exclut pas également la possibilité d'une seule protéine avec 2 sites actifs (Kuswik-Rabiega et al., 1987).

II - REGULATION DE LA SQUALENE SYNTHETASE

L'activité squalène synthétase a été essentiellement étudiée dans les cellules animales où l'on a pu montrer que les LDL répriment à 90 % la synthèse de la squalène synthétase (Faust et al., 1979).

Donc un excès de cholestérol dans les cellules diminuerait la condensation du FPP en stérols, le FPP pouvant dès lors être utilisé vers la voie du dolichol et de l'ubiquinone.

Un autre organisme a été étudié (Tetrahymena pyriformis), protiste qui synthétise du tétrahymanol en absence de stérols exogènes. Si le cholestérol est ajouté au milieu d'incubation, la synthèse du tétrahymanol est inhibée et le cholestérol est incorporé dans les membranes (Warburg 1982). On a pu montrer que l'arrêt de la synthèse du tétrahymanol était due à un mécanisme de répression de la synthèse de la squalène synthétase par le cholestérol.

Ces travaux, effectués sur ces 2 organismes, montrent donc que le niveau d'activité squalène synthétase pourrait déterminer le flux des unités en C₅ vers les stérols ou vers les isoprénoides.

1. Synthèse du farnésyl pyrophosphate [¹⁴C]

Le FPP [¹⁴C] n'est pas disponible commercialement, aussi, nous avons été dans l'obligation de le synthétiser à partir de la méthode de Popjak (1969).

Dans cette méthode reposant sur une synthèse biologique, l'acide mévalonique [^{14}C] ou l'IPP [^{14}C], d'activité connue, est incubé en présence d'un surnageant 105 000 g qui contient toutes les activités enzymatiques permettant la synthèse du FPP, l'activité squalène synthétase étant liée au culot. L'extrait enzymatique est obtenu selon le protocole décrit dans le paragraphe 5-2 de Matériel et Méthodes.

Le tampon utilisé (tampon tris-HCl 0,1 M) est à pH 9 et contient du dithiothréitol 0,5 mM final.

Milieu réactionnel : MgCl_2 : 5 mM ; 5 MnCl_2 : 2 mM ; ATP : 7 mM ; PEP : 5 mM ; PK : 5 U. ; AMV^{14}C marqué en C_2 ou C_4 : 2 mM ; extrait enzymatique 10 à 15 mg/ml.

La réaction se déroule au bain-marie à 35°C pendant 2 heures. Elle est arrêtée avec 7 ml d'alcool absolu ammoniacal. Le mélange est ensuite porté à 60°C pendant 5 à 10 minutes, ce qui provoque la précipitation des protéines. Une centrifugation permet la récupération de la phase liquide renfermant les produits de la réaction et éventuellement le mévalonate restant.

Le culot de protéines est lavé 3 fois avec de l'alcool ammoniacal 80°, afin de récupérer le maximum de produits réactionnels. Toutes les fractions liquides sont collectées et recueillies dans un ballon. Le volume est ramené à 3 ml environ, par évaporation à l'évaporateur rotatif. Le mélange devient alors trouble ; quelques gouttes d'eau ammoniacale 0,01 N contenant de l'EDTA 0,25 M pH 7,4 sont ajoutées.

Un contrôle est alors effectué en chromatographiant, sur couche mince, une aliquote (20 μl), dans le système de solvant n-propanol-ammoniacal-eau (EDTA 1 %) 6:3:1 (v/v/v).

Par cette méthode, les rendements de synthèse obtenus étaient faibles. Nous n'avons jamais transformé plus de 20 % d'AMV en FPP [^{14}C]. Dans un premier temps, nous avons essayé d'améliorer notre système en utilisant une souche porteuse du plasmide pA01 (ERG 12). Mais dans ce cas, bien que tout le mévalonate ait été transformé, nos rendements n'ont pratiquement pas augmenté, l'AMV étant essentiellement converti en AMVP et IPP. Nous avons alors recherché les facteurs limitants, en testant les différents constituants du milieu réactionnel.

1-1. Influence du Fluorure de potassium

Les expériences réalisées antérieurement, en vue de synthétiser le FPP [^{14}C], avaient montré qu'en plus du rendement faible de synthèse du FPP, il y avait une perte considérable de radioactivité (20 %), vraisemblablement due à la formation de produits volatils (isopenténol, $\gamma\gamma$ diméthylallyl alcool). Ceci pouvait être lié à une activité phosphatasique importante dans nos extraits acellulaires.

Nous avons donc essayé, dans un premier temps, d'augmenter les concentrations de fluorure de potassium (KF): un inhibiteur des phosphatases.

Concentrations de KF utilisées : 3,3 mM; 6,6 mM; 10 mM.

Le milieu réactionnel comprend :

MgCl₂ 6,7 mM

MnCl₂ 2,7 mM

ATP 10 mM

KF

AMV [^{14}C] 2,4 mM

extrait enzymatique 12 mg/ml d'essai.

Les résultats sont représentés dans le tableau 14.

Ils montrent que la quantité de FPP [^{14}C] synthétisée n'est absolument pas augmentée. De plus, il apparaît que 50 % de la radioactivité se trouvent liés à la fraction protéique. Toutefois, à 10 mM de fluorure de potassium, les pertes de radioactivité sont diminuées d'un facteur 10.

INFLUENCE DU FLUORURE DE POTASSIUM (KF)

| [KF] (mM) | Radioactivité introduite AMV [¹⁴ C] cpm | Phase alcool : total produits réactionnels | FPP [¹⁴ C] cpm | Radioactivité culot-protéi- nes | Radioactivité perdue |
|--------------|--|--|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| 3,3 | 73 536 | 29 176 (40%) | 12 600 (18%) | 37 240 (50,6%) | 9,4 % |
| 6,6 | 72 832 | 32 396 (44,5%) | 13 500 (18,5%) | 34 380 (47,2%) | 8,3 % |
| 10 | 71 456 | 40 516 (56,7%) | 15400 (21%) | 30 300 (42,4%) | 0,9 % |

Tableau 14 : Influence du fluorure de potassium (KF).

Pourcentage FPP [¹⁴C] exprimé par rapport au cpm phase alcool
Les autres pourcentages étant calculés par rapport à l'AMV [¹⁴C]
introduit.

1-2. Influence de l'ATP

La transformation d'une molécule d'AMV en FPP exige 9 molécules d'ATP ; ce facteur pouvait donc être limitant. Nous avons réalisé d'une part, une gamme croissante de concentrations d'ATP (10, 20, 30 mM) et dans une autre expérience, nous avons inclus un système générateur d'ATP : le phosphoénol pyruvate + la pyruvate kinase.

Les résultats, consignés dans les tableaux 15 et 16 montrent qu'il y a une augmentation de la quantité de FPP synthétisé si la concentration d'ATP augmente. A 30 mM d'ATP on obtient un rendement de 58% d'AMV converti en FPP. L'adjonction du système générateur d'ATP n'apporte aucune amélioration au rendement maximum obtenu. Un excès d'ATP est donc exigé pour obtenir ce rendement maximum.

Nous n'avons pas cherché à optimiser davantage ce rendement et nous avons donc retenu ces conditions pour la préparation du FPP à grande échelle, à partir du mévalonate.

La méthode de préparation est décrite au début de ce chapitre, section 2. La préparation de l'extrait acellulaire S 105.000 g est mentionné au paragraphe 5-1 et 5-2 du chapitre Matériel et Méthodes.

Le substrat de départ consiste en un mélange d'AMV froid désactonisé R-S et d'acide mévalonique R [2-C¹⁴], d'activité spécifique 1,656 $\mu\text{ci}/\mu\text{mole}$.

Le milieu réactionnel est composé de :

| | |
|-------------------|---|
| MgCl ₂ | 6,7 mM |
| MnCl ₂ | 2,7 mM |
| ATP | 30 mM |
| KF | 3,3 mM |
| AMV | 4,65 μmole R (7,7 μci) |

Surnageant 105 000 g : 12 mg de protéines /ml d'essai

Volume final de l'essai : 3,5 ml.

INFLUENCE DE L'ATP

| [ATP] mM | Radioactivité introduite AMV [¹⁴ C]cpm | Phase alcool : total produits réactionnels | FPP [¹⁴ C] cpm | Radioacti- vité culot- protéines | Radioacti- vité perdue |
|-------------|--|--|-------------------------------|--|---------------------------|
| 10 | 124 320 | 63 825 (51,3%) | 29 180 (23,4%) | 55 850 (45%) | 3,7 % |
| 20 | 103 840 | 73 945 (71,2%) | 33 600 (32,3%) | 20 050 (19,3%) | 9,5 % |
| 30 | 113 520 | 95 220 (83,8%) | 57 845 (52,1%) | 7 500 (6,6%) | 9,6 % |

INFLUENCE DU PHOSPHOENOL PYRUVATE

| ATP mM | Radioactivité introduite AMV [¹⁴ C]cpm | Phase alcool : total produits réactionnels | FPP [¹⁴ C] cpm | Radioactivité culot-protéines | Radioactivité perdue |
|--|--|--|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| 10 | 383 516 | 184 087 (48%) | 79 503 (20,73%) | 180 252 (47%) | 5 % |
| 30 | 376 440 | 335 740 (89,2%) | 218 780 (58,1%) | 17 650 (4,68%) | 6,12% |
| 10 + PEP (4mM) + PK (10 μ l) | 378 350 | 190 120 (50,2%) | 79 453 (21%) | 174 041 (46%) | 3,8 % |
| 30 + PEP (4mM) + PK (10 μ l) | 389 640 | 355 740 (91,3%) | 153 483 (40,4%) | 23 900 (6,13%) | 2,57 % |

Tableau 15 Amélioration du rendement de synthèse du FPP [¹⁴C]

Influence de l'ATP et du phosphoénol pyruvate.

Les pourcentages du FPP sont exprimés par rapport à la radioactivité de la phase alcool. Les autres pourcentages ont été calculés par rapport à la radioactivité introduite.

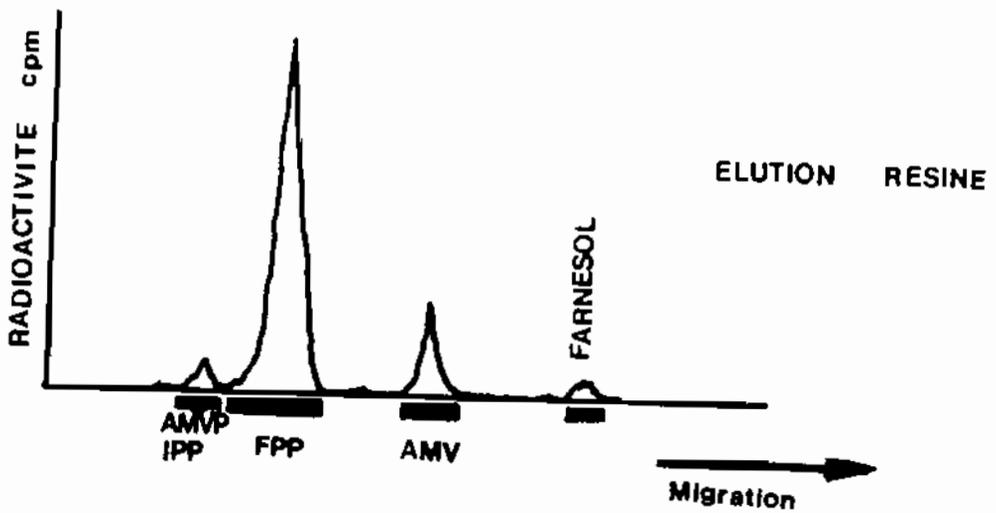
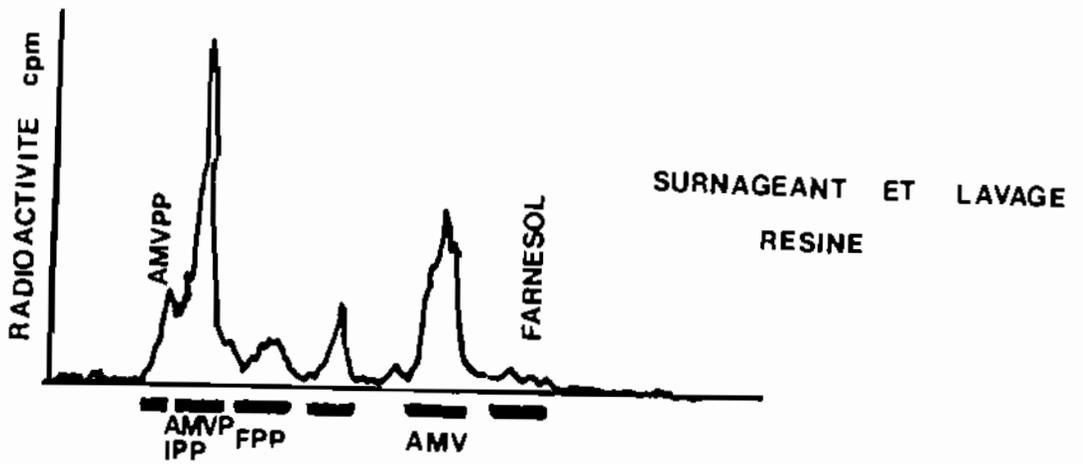
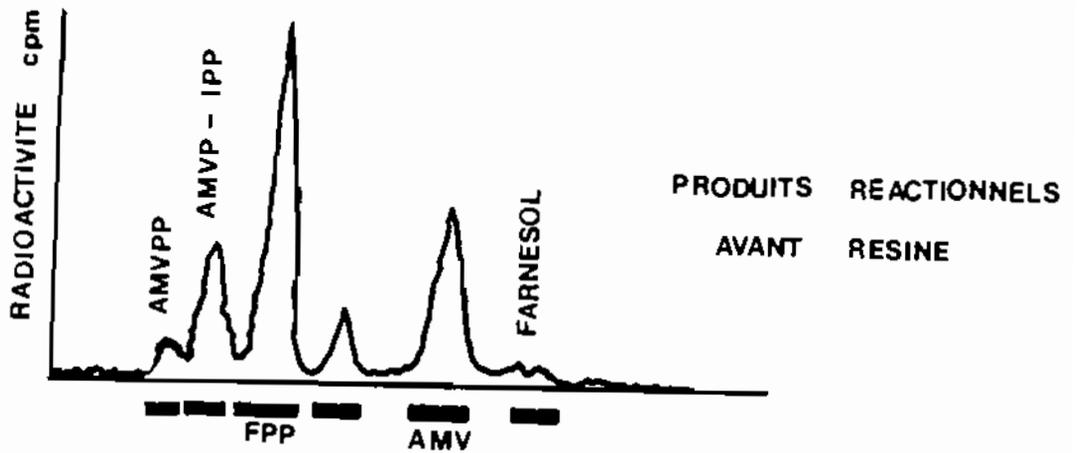
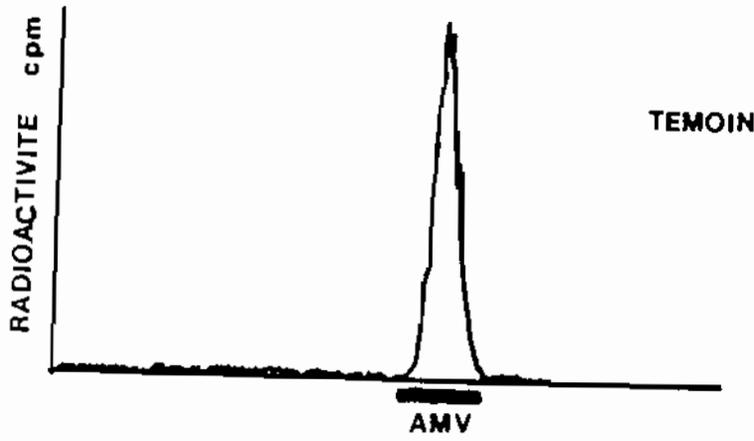
Les résultats, résumés dans le tableau 16, montrent que la phase alcool, contenant les produits réactionnels et l'AMV qui n'a pas réagi, représente 98 % de la radioactivité totale. La chromatographie d'une aliquote sur gel de silice G montre que le FPP [^{14}C] synthétisé représente 60 % des produits réactionnels. La technique est donc fiable puisque ces résultats sont très proches de ceux obtenus pour la même concentration d'ATP dans les expériences de mise au point.

Le FPP [^{14}C] obtenu a été purifié sur résine : Amberlite XAD 2. Cette résine est conditionnée de la manière suivante :

2 g de résine sont lavés 6 fois par agitation dans du méthanol ammoniacal (0,01N) et de l'eau ammoniacale en alternance ; le dernier lavage doit être aqueux. La durée de chaque lavage est d'au moins 15 minutes. Quand la résine est prête et débarrassée du liquide de lavage, la solution de produits réactionnels est déversée sur la résine et agitée modérément à température ambiante pendant une nuit.

Le lendemain, le surnageant est recueilli ; la résine est alors lavée 2 fois avec 5 ml d'ammoniaque aqueuse 0,01 N pour éliminer le mévalonate qui n'a pas réagi et ses dérivés phosphorylés. Le farnésyl pyrophosphate retenu par la résine est élué, par agitation modérée, avec du méthanol ammoniacal (5 x 5 ml). Chaque élution dure 15 à 30 minutes. Un chromatogramme de contrôle a été réalisé sur couche mince de gel de silice, après élution de la résine fig. 20. Il reste des traces de produits réactionnels, en plus du FPP [^{14}C] dans l'éluat. Chaque produit a alors été évalué en pourcentage par rapport à l'ensemble des pics.

Fig. 20 - SYNTHÈSE DU FARNESYL PYROPHOSPHATE [^{14}C]
DIFFÉRENTES PHASES DE LA PURIFICATION DU FPP



| ATP | Radioactivité introduite AMV [^{14}C]cpm | Phase alcool Total produits réactionnels | FPP [^{14}C] cpm | Radioactivité protéines | Pertes |
|------|---|--|--------------------------------|----------------------------|------------------|
| 30mM | 13 520 588 | 13 265 280 98,1% | 8 125 000 60,1% | 40 500 0,3% | 214 808 1,58% |

Tableau 16 : Synthèse du FPP [^{14}C] à partir de l'AMV
Rendement et Bilan de la réaction

1-3. Calcul de l'activité spécifique du FPP[¹⁴C] produit

La radioactivité de l'AMV introduit représente 13 520 588 cpm pour 4,65 μ moles [R] ; soit 2 907 653 cpm/ μ mole[R]

Le FPP [¹⁴C] récupéré après élution de la résine représente 8 125 000 cpm et a été repris après évaporation à sec dans 4,8 ml d'eau ammoniacale

$$\text{soit } \frac{8\ 125\ 000}{2\ 907\ 653} = 2,794 \mu\text{moles d'AMV pour } 4,8 \text{ ml.}$$
$$= 0,582 \mu\text{mole/ml}$$
$$= 0,582 \text{ nmole}/\mu\text{l}$$

Comme il faut 3 AMV pour 1 FPP, nous avons donc synthétisé

$$\frac{0,582}{3} = 0,194 \text{ nmole de FPP}/\mu\text{l}$$

20 μ l de FPP[¹⁴C] ont été comptés en scintillation liquide ; ils correspondent à 44 965 cpm soit 48 317 DPM soit 21,7 nci.

Ceci correspond à 1085 μ ci/ml soit 1,085 μ ci/ml

L'activité spécifique est donc de 5,60 μ ci/ mole
1,085 μ ci/ml.

2. Mesure de l'activité squalène synthétase

En vue de mesurer cette activité enzymatique, nous avons utilisé la technique mise au point et testée par plusieurs équipes simultanément : Epstein et al., 1970, Beytia et al., 1973, Agnew et al., 1978 a. Le farnésyl pyrophosphate marqué au [¹⁴C] sert de substrat. Le

squalène formé est identifié et quantifié par chromatographie sur couche mince de gel de silice. L'activité enzymatique est exprimée en nmole de FPP[¹⁴C] transformé en squalène / minute / mg de protéine ou en nmoles de squalène formé (nmole / minute / mg de protéine), sachant qu'une molécule de squalène est issue de la condensation de 2 molécules de FPP.

La suspension enzymatique (12 000 g) est préparée, dans le tampon phosphate 0,1 M PH 7,4 contenant 1 mM finale de dithiothréitol, selon le protocole décrit au paragraphe 5 du chapitre Matériel et Méthodes.

Le milieu réactionnel standard contient :

| | |
|-------------------|----------|
| MgCl ₂ | 10 mM |
| KF | 4 mM |
| NADPH | 1 mM |
| G6P | 12 mM |
| G6PDH | 2 unités |

Protéines enzymatiques: 20 à 80 µg pour la souche sauvage
: 10 à 40 µg pour les souches mutantes
FPP[¹⁴C] 1,085 µci/ml ; 5,60 uci/µmole: 5nmoles/essai

Le volume final de chaque essai est ajusté à 0,25 ml avec du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 contenant 1 mM de DTI.

2-1. Protocole expérimental pour la mesure de l'activité Squalène Synthétase

Le milieu réactionnel est préincubé pendant 10 minutes au bain-marie à 30°C, avant l'adjonction de l'extrait enzymatique. La réaction se déroule pendant 25 à 30 minutes puis elle est arrêtée avec 1 ml de KOH méthanolique (15 % p/v). Les entraîneurs (ergostérol, lanostérol, squalène 2-3 époxyde et squalène) sont ajoutés dans chaque essai à raison de 1 à 2 mg/ml. Les tubes à essai sont ensuite portés à 60°C pendant 1 heure.

2-1-1. Isolement et fractionnement des produits de la réaction

Les produits réactionnels sont dans la phase insaponifiable. Après adjonction d'1 ml d'eau à chaque tube, ils sont extraits avec de l'hexane (3 x 3 ml).

Les extraits hexaniques sont évaporés à sec sous un courant d'azote ; le résidu sec est repris avec 200 μ l d'hexane, 20 μ l sont placés dans une fiole de comptage contenant 2 ml d'un mélange scintillateur (optiphase MP LKB) ; la radioactivité de l'échantillon est déterminée en scintillation liquide grâce à un compteur à scintillation LKB Wallac 1214 Rackbeta.

Le reste de la suspension est chromatographié sur gel de silice G, dans le mélange de solvants : cyclohexane - acétate d'éthyle (9/1:v.v) ; la durée moyenne de migration est de 2h30. Un profil chromatographique caractérisant chaque produit réactionnel est obtenu grâce à un scanner de radioactivité Berthold LB 2832 Automatic TLC-Linear analyzer.

2-1-2. Calculs et expression des résultats

La radioactivité réelle de chaque pic est évaluée grâce au rendement de comptage du scanner de plaque, calculé pour chaque essai. Il représente le rapport entre la radioactivité totale donnée par le scanner Berthold LB 2832 et la radioactivité totale donnée par la scintillation liquide.

Ainsi pour chaque essai, l'insaponifiable étant repris dans 200 μ l d'hexane, si X est la radioactivité obtenue en scintillation liquide pour 20 μ l de la phase hexanique insaponifiable, la radioactivité totale de l'insaponifiable sera

$$\frac{X \times 200}{20} = K \text{ (cpm)}$$

si Y est la radioactivité totale, correspondante à chaque dépôt, donnée par le scanner Berthold pendant un temps de comptage t. Y exprimé par l'appareil en coups totaux, sera ramené en cpm. Le rendement de comptage du scanner Berthold sera donc, en pourcentage :

$$\frac{Y \text{ (cpm)} \times 100}{K \text{ (cpm)}} = Z \%$$

Pour chaque pic, la radioactivité déterminée par le scanner pour le temps t sera également ramenée en cpm puis multipliée par l'inverse du rendement de comptage pour avoir le cpm réels. L'activité spécifique sera calculée à partir de ces cpm réels.

Cette activité spécifique est exprimée en nanomoles de FPP transformées par minute et par mg de protéines enzymatiques.

2-2. Détermination de l'activité spécifique de la squalène synthétase dans la souche sauvage et les mutants auxotrophes pour l'ergostérol

Toutes les cultures sont effectuées en milieu complet YPG liquide. Pour les mutants auxotrophes, le milieu de culture est supplémenté en ergostérol (2 à 4 mg/l). Les cellules sont récupérées en phase exponentielle de croissance (absorbance comprise entre 5 et 8 soit 10^8 à $1,6 \cdot 10^8$ cellules/ml).

2-2-1. Mesure de l'activité squalène synthétase dans la souche sauvage FL100

a) Activité en fonction du temps

L'activité squalène synthétase a été mesurée pour une concentration de protéines fixe de 60 μg /essai avec des incubations de 10, 20, 30 et 40 minutes.

Les résultats obtenus montrent (tableau 17 A et fig. 21A) une activité de 0,47 nmole de FPP/mg/min. Une proportionnalité de la synthèse du squalène est observée en fonction du temps ; cette activité peut donc être considérée comme une activité spécifique.

b) Activité en fonction de la concentration en protéines enzymatiques

La gamme de protéines suivante a été utilisée, pour un volume d'incubation final de 0,25 ml : 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg par essai. La durée de l'incubation a été de 40 minutes dans un bain marie de 30°C.

Les chromatogrammes reproduits fig. 22, montrent que pour des faibles concentrations en protéine (20 à 60 µg), seul le squalène apparaît comme produit de la réaction. Par contre, pour des concentrations supérieures à 60 µg (60 à 100 µg), on observe la synthèse de faibles quantités de squalène 2-3 époxyde et de lanostérol en plus du squalène.

Pour le calcul de l'activité squalène synthétase nous avons ajouté ces composés au squalène.

L'activité spécifique squalène synthétase observée est de 0,47 nanomoles / mg / min. Une proportionnalité est également observée ici, en fonction de la concentration en protéines ; ce qui indique que nous sommes vraisemblablement en vitesse initiale (tableau 17 B et fig. 21B).

c) Influence de la température d'incubation

L'étude de l'activité enzymatique "in vitro", à différentes températures, pourrait nous donner une idée sur la sensibilité et la thermolabilité de la protéine enzymatique. Les températures de 25, 30, 37 et 45°C ont été retenues pour cette étude.

| Durée d'incubation (min) | SQUALÈNE (cpm) | FPP CONVERTI (nmoles) | ACTIVITE SPECIFIQUE (nmole FPP/min/mg) |
|-----------------------------|-------------------|--------------------------|---|
| 10 min | 3072 | 0,27 | 0,47 ± 0,04 (5) |
| 20 min | 6090 | 0,53 | |
| 30 min | 8983 | 0,79 | |
| 40 min | 12270 | 1,08 | |

| Protéines enzymatiques (µg/essai) | SQUALÈNE (cpm) | FPP CONVERTI (nmoles) | ACTIVITE SPECIFIQUE (nmole FPP/min/mg) |
|---|-------------------|--------------------------|---|
| 20 µg | 4178 | 0,37 | 0,47 ± 0,02 (6) |
| 40 µg | 7264 | 0,65 | |
| 60 µg | 12470 | 1,11 | |
| 80 µg | 16396 | 1,46 | |
| 100 µg | 21651 | 1,93 | |

Tableau 17 : Activité squalène synthétase

A. en fonction du temps (avec 60 µg de protéines)

B. en fonction des protéines enzymatiques

(durée d'incubation : 40 minutes).

L'activité est exprimée en nmoles de FPP transformées par minute et par mg de protéines ± écart moyen (nombre d'expériences indépendantes).

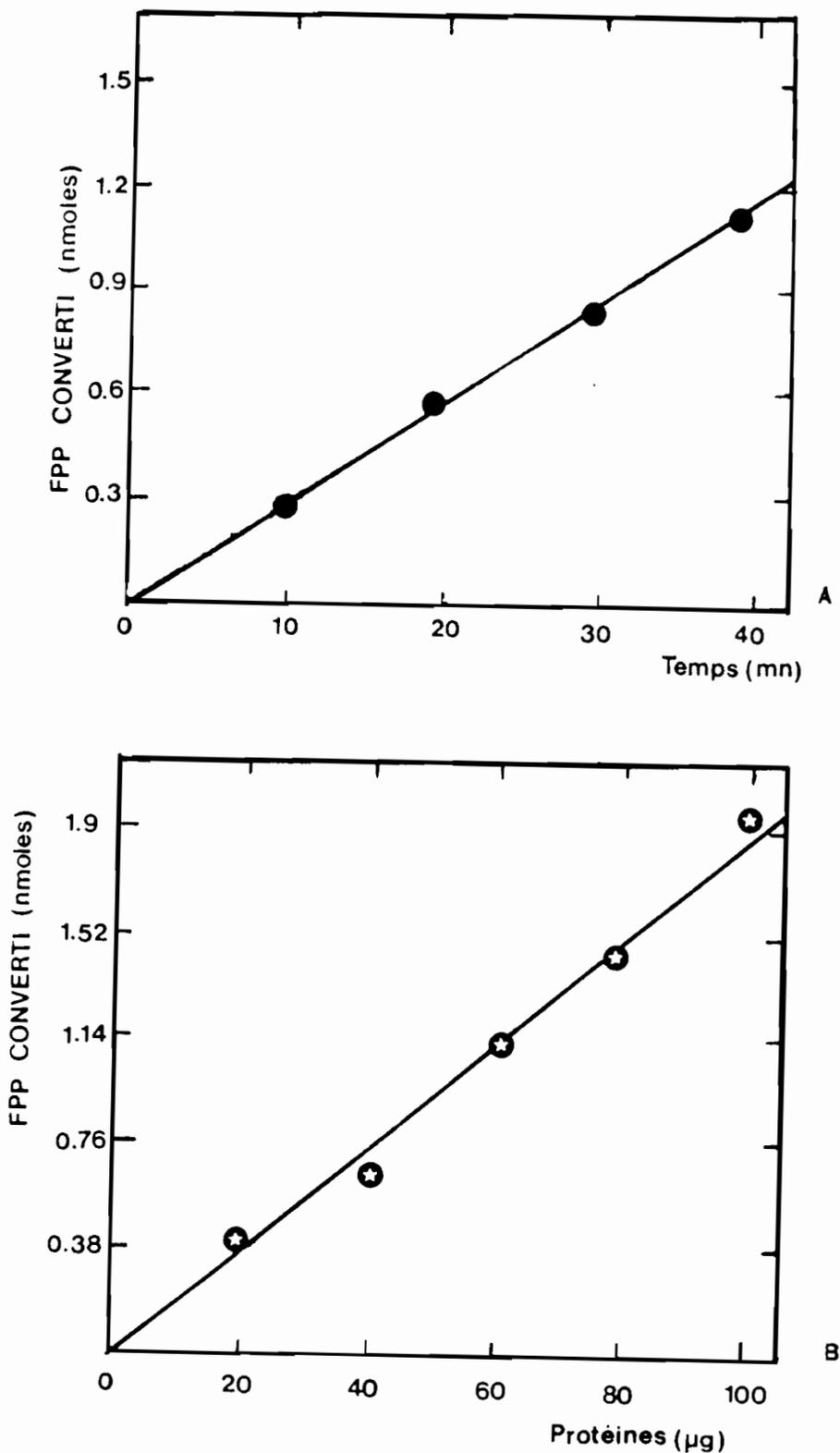


Fig. 21 - ACTIVITES SPECIFIQUES SQUALENE SYNTHETASE

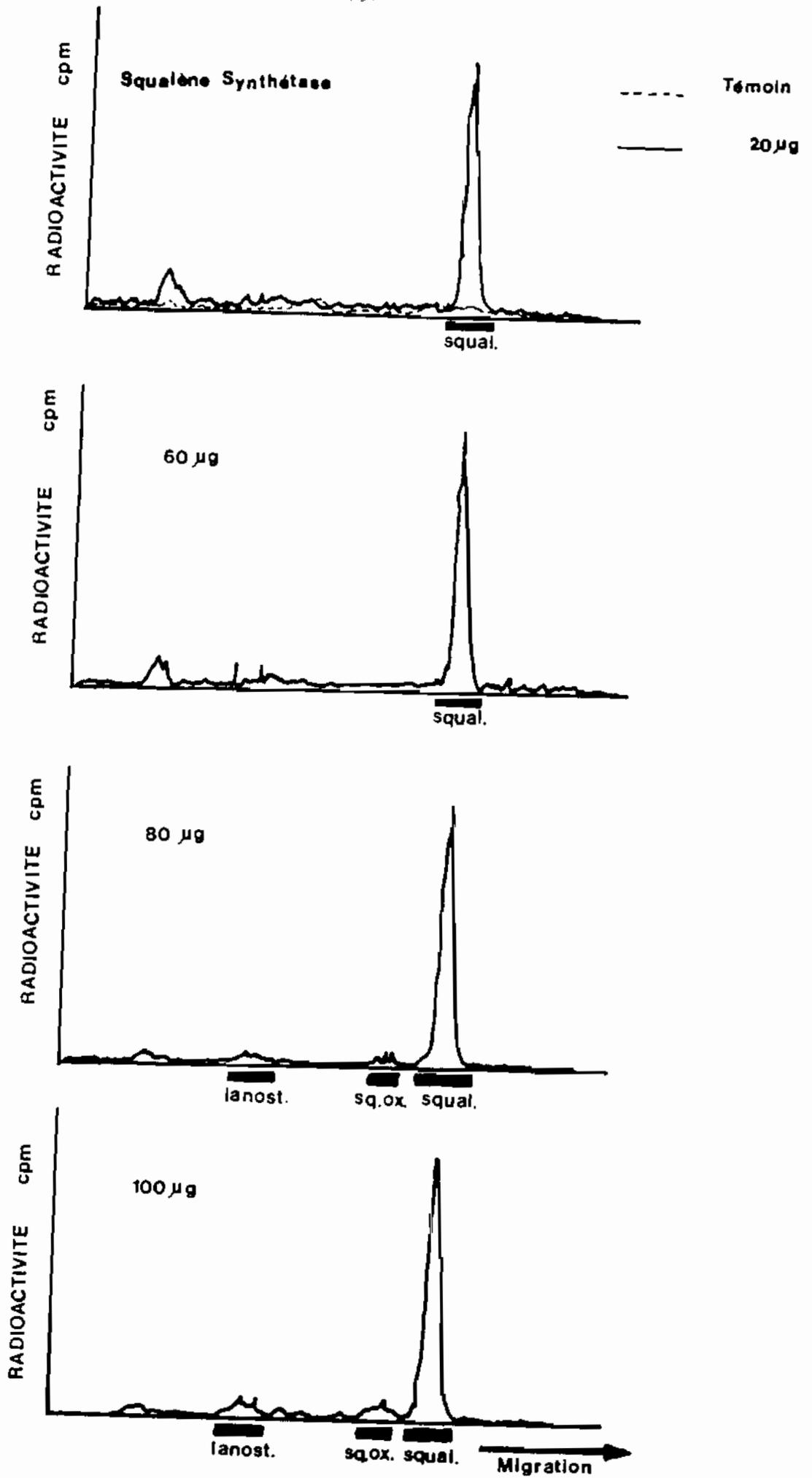
(Conversion du FPP en squalène et dérivés)

●—● A : en fonction du temps pour 60 µg de protéines.

★—★ B : en fonction de la concentration en protéines (durée d'incubation : 40 minutes)

Fig. 22 - ACTIVITE SQUALENE SYNTHETASE

Evolution des produits de la réaction (squalène et dérivés)
en fonction de la concentration en protéines
(durée d'incubation : 40 minutes)



L'extrait enzymatique a été préincubé 15 minutes à la température choisie. La suite de l'expérience a été menée selon le protocole de la squalène synthétase décrit au paragraphe 2-1 de ce chapitre.

Les résultats, reportés dans le tableau 18 montrent que l'activité squalène synthétase est stable jusqu'à 45°C. A cette température, une baisse seulement de 10 % est obtenue.

d) Exigences en cofacteurs et localisation de l'enzyme

Dans cette partie de notre travail, toutes les expériences ont été réalisées soit avec des extraits acellulaires 12 000 g, soit avec des microsomes purifiés (lavés 2 fois avec le tampon de broyage), + surnageant 105. 000 g.

Nous avons étudié les exigences en cofacteurs NADPH, NADH afin de déterminer les conditions optimales pour une activité maximale. Enfin, nous avons localisé l'enzyme dans les extraits acellulaires en y mesurant l'activité enzymatique.

Les résultats (tableau 19) montrent que quel que soit le pyridine nucléotide utilisé, l'activité enzymatique est toujours observée. Le NADPH donne cependant une activité optimale, tandis que le NADH est inhibiteur ; en effet, en présence de NADH, l'activité est abaissée de 50 %.

Le tableau 19 montre également que l'activité est entièrement associée à la fraction microsomale ; elle est pratiquement absente du surnageant S 105 000 g. Nous montrons d'autre part que l'addition de surnageant acellulaire S 105 000 g n'augmente pas l'activité spécifique liée aux microsomes.

Ces résultats indiqueraient qu'aucun facteur soluble du type "sterol carrier protein" (SCP) ni "supernatant protein factor" (SPF) n'est requis pour stimuler la squalène synthétase. Ils sont

| TEMPERATURES | ACTIVITE SQUALENE SYNTHETASE |
|--------------|---------------------------------|
| 25°C | 0,42 |
| 30°C | 0,46 |
| 37°C | 0,44 |
| 45°C | 0,42 |

Tableau 18 : Influence de la température sur l'activité squalène synthétase
Les activités sont exprimées en nmoles FPP/min/mg protéines.

| FRACTIONS | COFACTEURS | ACTIVITE SPECIFIQUE SQUALENE SYNTHETASE |
|---|---------------------|--|
| M I C R O S O M E S L A V E S | 0 | 0 |
| | NADPH | 0,50 |
| | NADH | 0,29 |
| | NADH + NADPH | 0,28 |
| | NADPH + S 10500g | 0,45 |
| S 105 000g | NADPH | 0,005 |

Tableau 19 : ACTIVITES SQUALENE SYNTHETASE

Exigences en cofacteurs et localisation de l'enzyme.

Les activités sont exprimées en nmoles FPP/min/mg protéines

en accord avec les travaux de Gavey et al., 1978 ; d'autres auteurs (Rilling et al. 1972) avaient suggéré la participation d'une "sterol carrier protein" dans la conversion du farnésyl pyrophosphate en squalène par le foie de rat.

2-2-2. Activités Squalène synthétase dans les mutants auxotrophes pour l'ergostérol

Les mesures de l'activité squalène synthétase ont été effectuées sur des extraits acellulaires 12 000 g, suivant le même protocole que pour la souche sauvage FL100. Une première série d'expériences a été réalisée en vue de déterminer les concentrations optimales d'enzyme à utiliser, ce qui nous a permis de retenir, pour l'ensemble des mutants, des concentrations de 10, 20, 30 et 40 µg de protéines enzymatiques par essai, à l'exception du mutant erg 16 pour lequel nous avons utilisé 50, 75 et 100 µg de protéines par essai.

Toutes les expériences ont été répétées deux ou trois fois en présence d'un témoin : la souche sauvage FL100.

Le tableau 20 montre qu'en général, les mutants étudiés présentent une activité squalène synthétase plus élevée que celle de la souche sauvage FL100, exception faite pour les mutants erg 18 et erg 12.

Pour les mutants bloqués avant la synthèse du mévalonate, la plus forte augmentation est observée (un facteur 5 par rapport à la souche sauvage). Les autres mutants présentent une activité augmentée d'un facteur 1,5 à 3.

Le mutant erg 18, par contre, bloqué dans l'activité squalène époxydase, a la même activité que la souche sauvage FL100.

Enfin, l'activité du mutant erg 12 (bloqué dans la mévalonate Kinase), est diminuée d'environ 25 % par rapport à la souche sauvage.

L'ensemble de ces résultats indique qu'une carence en stéroïdes ou un niveau faible de stéroïdes pourrait déréguler l'activité squalène synthétase.

La dérégulation la plus forte est observée dans les mutants erg 10 et erg 11, bloqués avant la synthèse du mévalonate ; par contre, une diminution de l'activité est observée dans le mutant erg 12, bloqué dans la mévalonate Kinase et qui donc, vraisemblablement, accumule du mévalonate.

Ces observations suggèrent que le mévalonate serait impliqué dans la synthèse de l'enzyme en plus des stéroïdes.

Le mutant erg 18 présente une activité squalène synthétase similaire à celle de la souche sauvage FL100. On peut expliquer la faible activité dans ce mutant par le fait que le squalène y est accumulé. Le squalène lié aux microsomes pourrait dans ces conditions inhiber l'enzyme et de ce fait, l'activité observée serait alors la résultante d'une dérégulation de l'enzyme par carence en stéroïdes endogènes et de l'inactivation par excès de squalène. Dans le même ordre d'idées les mutants bloqués respectivement dans la squalène 2-3 époxyde-lanostérol cyclase et la 14 déméthylase présentent également un niveau faiblement induit, ce qui permet de faire l'hypothèse que toutes les molécules hydrophobes associées aux microsomes vont être inhibitrices, car non métabolisées.

En vue de vérifier ces hypothèses, une autre méthode consiste à obtenir soit l'accumulation de squalène en réalisant des cultures anaérobies, soit la carence en stéroïdes par limitation en pantothenate.

| SOUCHES | BLCCS ENZYMATIQUES | ACTIVITES SPECIFIQUES SQUALENE SYNTHETASE (nmoles FPP/min/mg) |
|---------|--|---|
| Erg 10 | Acéto acétyl CoA thiolase | 2,25 ± 0,067 (3) |
| Erg 11 | HMG CoA synthétase | 1,97 ± 0,07 (3) |
| Erg 12 | Mévalonate kinase | 0,36 ± 0,04 (2) |
| Erg 8 | Phosphomévalonate kinase | 1,11 ± 0,18 (3) |
| Erg 19 | Pyrophosphomévalonate décarboxylase | 0,44 ± 0,09 (3) |
| Erg 9 | Squalène synthétase | 0 |
| Erg 18 | Squalène époxydase | 0,44 ± 0,05 (3) |
| Erg 7 | Squalène 2-3 époxyde Lanostérol cyclase | 0,60 ± 0,01 (2) |
| Erg 16 | Lanostérol 14 déméthylase | 0,76 ± 0,02 (3) |
| FL100 | Sauvage | 0,47 ± 0,02 (6) |

Tableau 20 : Activités squalène synthétase dans les mutants auxotrophes pour l'ergostérol.

2-3. Mesure de l'activité Squalène Synthétase en Anaérobiose

En anaérobiose les cellules de levure exigent de l'ergostérol et un acide gras désaturé (acide oléique) pour la croissance car plusieurs étapes de la biosynthèse des stérols ainsi que les étapes de désaturation des acides gras nécessitent de l'oxygène moléculaire.

La première étape de la voie de biosynthèse des stérols impliquant de l'oxygène moléculaire correspond à la squalène époxydase et donc, des cellules cultivées en anaérobiose accumulent du squalène.

La souche sauvage, imperméable aux stérols exogènes en aérobie, devient perméable dans ces conditions anaérobies. Son taux d'ergostérol: 0,8 % en présence de faible quantité d'ergostérol exogène (2 mg/l) et 1,1 % en présence de fortes concentrations d'ergostérol exogènes (50 mg/l), passe alors à 0,2 et 0,5 % dans les conditions anaérobies, pour les mêmes concentrations, respectives d'ergostérol exogène.

La souche sauvage FL100 est cultivée en anaérobiose à 28° C pendant 72 heures, en présence d'une faible concentration d'ergostérol (2 mg/l) et en présence d'une forte concentration d'ergostérol (50 mg/l).

Dans les deux cas, l'acide gras désaturé (acide oléique) a été fourni à raison de 50 mg/l.

absorbance de l'inoculum : 0,075 pour la culture à faible concentration d'ergostérol exogène (2 mg/l)
(700 nm)
0,05 pour la culture à forte concentration d'ergostérol exogène (50 mg/l).

A la fin des cultures, l'absorbance est lue et les cellules sont comptées à l'hématimètre (cellule de Malassez) (Tableau 21).

| Milieux de culture | absorbance | nombre de cellules/ml |
|--|------------|-----------------------|
| YPG + ergostérol (2mg/l) + ac oléique (50 mg/l) | 1,58 | $3,2 \cdot 10^7$ |
| YPG + ergostérol (50 mg/l) + ac oléique (50 mg/l) | 4,05 | $7,6 \cdot 10^7$ |

Tableau 21

4 lavages sont ensuite effectués ; le premier lavage avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 additionné de tergitol 1 % (v/v) ; les lavages suivants sont faits avec le tampon phosphate sans tergitol.

Les extraits acellulaires sont préparés selon le protocole décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes.

Les mesures de l'activité squalène synthétase ont été réalisées pour les concentrations d'enzymes suivantes : 0, 25, 50, 75 $\mu\text{g/ml}$ final.

Le tableau 22 montre que dans les cultures supplémentées par une quantité limitante d'ergostérol, l'activité squalène synthétase observée est similaire à celle observée en aérobiose.

Par contre, pour les cellules cultivées en présence d'un excès d'ergostérol, l'activité squalène synthétase est diminuée d'un facteur 2 environ.

Ces résultats indiquent qu'une dérépression de la squalène synthétase ne peut pas être obtenue en anaérobiose. Ceci peut être corrélé à l'accumulation de squalène observée dans les cellules anaérobies, par contre un excès d'ergostérol pourrait réprimer l'activité squalène synthétase.

Cependant, les cultures anaérobies impliquent des conditions tout à fait particulières sur le plan du métabolisme cellulaire (absence d'oxygène). Nous avons alors recherché des conditions de cultures aérobies pouvant permettre de carencer la levure en stérols.

Les travaux de Servouse et Karst (1986) ont montré qu'il est pratiquement impossible d'abaisser significativement le taux de stérols des mutants auxotrophes pour les stérols. En effet, lorsqu'ils sont cultivés en présence d'une concentration optimale d'ergostérol exogène (2 mg/l), leur teneur en stérols est de 0,3 %. La carence en stérols endogènes augmente considérablement le temps de génération et la croissance s'arrête avant que la teneur en stérols ne diminue à l'extrême.

On peut alors affirmer que dans les conditions aérobies, les mutants auxotrophes pour l'ergostérol sont en situation de carence en stérols endogènes. Seule la souche sauvage pourrait alors être utilisée pour carencer de façon significative les cellules, sans que ceci ne nuise dramatiquement au métabolisme cellulaire. Les travaux de Hosono et al. (1974) ont d'ailleurs démontré que des souches de levure carencées en pantothénate présentaient une diminution de 75 % de leur teneur en stérols.

2-4. Effets de la carence en pantothénate sur la teneur en ergostérol et l'activité spécifique squalène synthétase.

Le pantothénate est une vitamine du groupe B, indispensable à la croissance des cellules de levure. Cette molécule intervient

dans la synthèse de l'acétyl COA. Ce dernier est une plaque tournante entre différentes voies métaboliques, il intervient en particulier dans la synthèse des acides gras et des lipides.

Nous avons reconstitué le milieu YNB, sans amino-acide, ni sulfate d'ammonium, l'hydrolysate de caséine représentant la seule source d'azote. La composition du milieu est décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes.

Une gamme de concentrations croissantes en pantothénate (0 à 80 $\mu\text{g/l}$) est réalisée pour étudier l'effet de la vitamine sur la croissance et la biosynthèse des stérols.

Les résultats reportés dans la figure 23 montrent une linéarité de la croissance entre 30 et 45 $\mu\text{g/l}$; la courbe atteint ensuite un plateau à partir de 45 $\mu\text{g/l}$ correspondant vraisemblablement à un seuil de saturation. La croissance cellulaire est extrêmement ralentie entre 0 et 30 $\mu\text{g/l}$. Parallèlement l'évolution de la teneur en stérols a été étudiée pour des concentrations en pantothénate de 15, 30 et 45 $\mu\text{g/l}$. Les résultats (tableau 23) montrent que la teneur en stérols augmente avec la concentration en pantothénate pour atteindre le taux normal de la souche sauvage à partir de 45 $\mu\text{g/l}$.

Avec une concentration très limitante en pantothénate (15 $\mu\text{g/l}$) la teneur en stérols observée est très faible (0,3 %), valeur également obtenue dans les mutants auxotrophes pour les stérols et qui ne peut être abaissée davantage.

Nous avons donc là, un système permettant de carencer la souche sauvage en stérols.

Est-ce que cette carence en stérols va directement bloquer la croissance cellulaire ? La réponse est vraisemblablement non car l'adjonction d'ergostérol dans le milieu de culture, n'augmente pas la masse cellulaire en phase stationnaire.

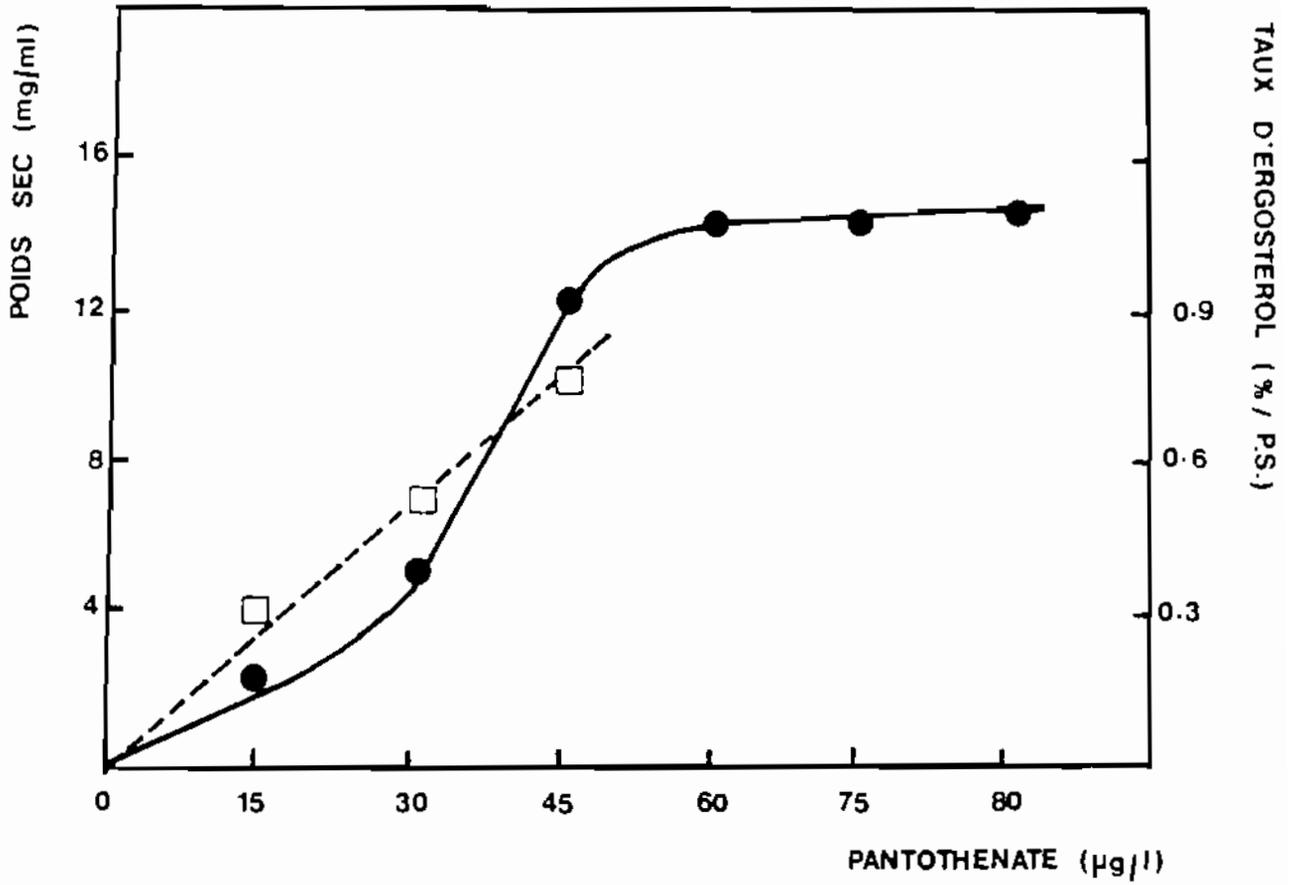


Fig. 23 - ACTION DU PANTOTHENATE SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE ET LA TENEUR EN STEROLS DES CELLULES

- Croissance cellulaire en fonction de la concentration en pantothénate
- - -□ évolution de la teneur en stérols

| Conditions | Milieux | Activités spécifiques Squalène synthétase (nmole FPP/min/mg) | |
|---|--|--|------------|
| A N A E R O B I O S E | Ergostérol 50 mg/l + Acide oléique 50 mg/l | 0,23 ± 0,03 (2) | A |
| | Ergostérol 2 mg/l Acide oléique 50 mg/l | 0,42 ± 0,04 (3) | |
| A E R O B I O S E | Pantothénate 15 µg/l | 0,42 ± 0,02 (2) | B C |
| | Pantothénate 45 µg/l | 0,44 (1) | |
| | Contrôle FL100 | 0,47 (1) | |

Tableau 22 : Activité squalène synthétase en fonction des conditions de culture (souche sauvage FL100)

A - Anaérobiose en présence d'un excès d'ergostérol et d'une quantité limitante d'ergostérol

B. Aérobiose en fonction de la concentration en pantothénate

C - Témoin de contrôle.

| Pantothénate ($\mu\text{g/l}$) | Poids sec mg/ml culture | % stérols |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------|
| 15 $\mu\text{g/l}$ | 2,3 mg | 0,3 % |
| 30 $\mu\text{g/l}$ | 5 mg | 0,52 % |
| 45 $\mu\text{g/l}$ | 12,1 mg | 0,71 % |

Tableau 23: Evolution du taux d'ergostérol en fonction de
la concentration en pantothénate
taux d'ergostérol : pourcentage par rapport au poids sec

Néanmoins, dans ces conditions de carence en pantothénate, Servouse et Karst (1986), ont pu montrer une dérèpression de l'acéto-acétyl CoA thiolase et de l'HMG CoA synthétase, respectivement, d'un facteur 2,5 et 2, l'activité HMG CoA réductase restant pratiquement inchangée.

L'activité squalène synthétase a été mesurée dans la souche sauvage cultivée en milieu minimum, supplémenté (45 $\mu\text{g/l}$) ou carencé en pantothénate (15 $\mu\text{g/l}$).

Les résultats (tableau 22) montrent que dans les 2 conditions de cultures, la même activité squalène synthétase (0,42 nmoles FPP/mg/min) est observée ; ceci indique de plus que, par une carence en pantothénate qui diminue fortement la teneur en stérols, il n'est pas possible d'obtenir la dérèpression de la squalène synthétase.

2-5. Mesure de l'activité squalène synthétase dans des souches porteuses de plasmides multicopies

Les gènes codant pour les activités mévalonate kinase ERG 12 et squalène synthétase ERG 9, ont été isolés au laboratoire (Oulmouden, Fegueur, résultats non publiés ; Richard 1986).

Conditions de cultures

Dans cette partie du travail, les cultures ont été réalisées en milieu YPG liquide, à 28°C pendant 15 heures. La perte de plasmides est, dans ces conditions, très faible.

Les extraits acellulaires (12 000 g) sont préparés comme décrit dans la section 5, paragraphe 5-1 de Matériel et Méthodes.

Nous avons étudié l'activité squalène synthétase dans le clone transformé par le plasmide p MF 13 porteur du gène ERG 9 , codant pour la squalène synthétase. Ce plasmide, porteur de l'origine de répllication de l'ADN 2 μ de levure, correspond à un vecteur multicopies présent dans les cellules de levures à environ 50 copies. Les activités obtenues dans des souches transformées par ce vecteur sont augmentées en moyenne de 10 à 25 fois selon les gènes clonés.

L'activité spécifique obtenue dans le clone erg 9 pl MF 13 est de 0,65 nmole FPP/mg/min, c'est-à-dire une activité augmentée d'un facteur 1,5 par rapport à la souche sauvage (tableau 24).

Cette augmentation faible d'activité obtenue, peut être soit la conséquence d'une mauvaise expression du gène cloné, soit due à une mauvaise intégration de l'enzyme, synthétisé à partir du plasmide, dans le réticulum endoplasmique.

Par ailleurs, nous avons étudié l'activité spécifique squalène synthétase dans une souche erg 12 , transformée par le plasmide p A01, porteur du gène ERG 12 . Cette mesure a été effectuée car le mutant erg 12 est l'un des seuls mutants auxotrophes pour les stérols qui ne présentait pas une dérèpression de l'activité squalène synthétase mais une diminution de l'activité par rapport à la souche sauvage.

L'activité spécifique mévalonate kinase dans la souche transformée erg 12 ura 3⁻ est augmentée d'un facteur 25 par rapport à la souche sauvage.

Il était donc intéressant de savoir si la restauration de l'activité mévalonate kinase ou éventuellement son augmentation par le biais du gène cloné sur plasmide multicopies, allait rétablir une activité spécifique pour la squalène synthétase, comparable à celle de la souche sauvage FL100.

| SOUCHES | ACTIVITE SPECIFIQUE SQUALENE SYNTHETASE (nmole FPP/min/mg |
|---------------------------|---|
| Erg 12 p1 A0 ₁ | 0,89 ± 0,04 (3) |
| Erg 9 p1 MF 13 | 0,65 ± 0,05 (3) |
| Erg 12 | 0,36 ± 0,04 (2) |
| Erg 9 | 0 |
| FL100 | 0,47 ± 0,02 (6) |
| FL100 ura 3 ⁻ | 0,42 ± 0,04 (2) |

Tableau 24: Activités squalène synthétase dans des souches porteuses de plasmides multicopies

Témoins : erg 12
erg 9
FL100
FL100 ura 3⁻

La mesure de l'activité spécifique squalène synthétase sur un extrait acellulaire de la souche transformée montre une augmentation d'un facteur environ 2 par rapport à la souche sauvage (tableau 2^o)

III - CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus montre que l'activité spécifique squalène synthétase de levure pourrait être régulée par les besoins en stérols de la cellule. En condition de carence en stérols endogènes, l'enzyme pourrait être induite (mutants auxotrophes pour les stérols) et réprimée en présence d'un excès de stérols (anaérobiose).

Toutefois, plusieurs autres observations tendraient à montrer que l'ergostérol ne serait pas la seule molécule régulatrice :
- d'une part, parce que dans les conditions de carence en anaérobiose, on n'observe pas une plus forte induction de la squalène synthétase,
- d'autre part, parce que la carence en stérols obtenue par carence en pantothénate ne conduit pas à une dérépression de l'enzyme.

Si l'on se réfère au tableau 20 présentant les activités squalène synthétase dans les différents mutants auxotrophes on observe que l'induction la plus forte (facteur 5), est obtenue dans les mutants bloqués avant la synthèse du mévalonate. Pour les autres mutants (auxotrophes) bloqués après la synthèse du mévalonate, l'augmentation n'est que d'un facteur 1,5 à 2.

Une exception : le mutant erg 12, bloqué dans l'activité mévalonate kinase et qui logiquement devrait accumuler du mévalonate. L'activité spécifique squalène synthétase est diminuée de 25 % environ par rapport à la souche sauvage.

Ces résultats suggèrent que la synthèse de la squalène synthétase pourrait également être régulée par la concentration intracellulaire d'acide mévalonique. En effet, une forte induction de l'enzyme est obtenue lorsque le mévalonate n'est pas synthétisé (mutants erg 10 et erg 11) ; une répression est observée lorsque le mévalonate s'accumule (erg 12).

L'activité spécifique observée dans la souche erg 12 transformée par le plasmide p A01, porteur du gène ERG 12 fonctionnel (activité mévalonate kinase x 25) est augmentée d'un facteur 2 par rapport à la souche sauvage, ce qui conforte notre hypothèse, dans la mesure où dans cette souche (sauvage phénotypiquement), l'induction serait obtenue par un faible taux de mévalonate intracellulaire conséquence de la surexpression de l'activité mévalonate kinase.

La synthèse de la squalène synthétase pourrait donc être régulée et par la teneur en stérols et par la teneur en acide mévalonique.

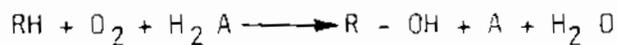
C H A P I T R E VI
REGULATION DE LA SQUALENE EPOXYDASE

La squalène époxydase est l'enzyme de la voie de biosynthèse des stérols qui permet l'introduction d'un atome d'oxygène moléculaire dans le squalène. Cette étape conduit par la suite à la cyclisation du squalène époxyde formé, soit en lanostérol dans les cellules animales et le phylum non photosynthétique, soit en cycloarténoï dans le phylum photosynthétique.

L'enzyme appartient au groupe des monooxygénases ou oxydases à fonctions mixtes (OFM).

Les enzymes de cette catégorie interviennent au niveau de nombreux métabolismes : biosynthèse des stérols et transformation en stéroïdes (Sih, 1969), désaturation des acides gras ; au niveau des hépatocytes, elles interviennent dans les réactions de détoxification où elles hydrolysent les drogues, favorisant ainsi leur dégradation et leur élimination (Estabrook et al., 1971).

Les monooxygénases incorporent un atome d'oxygène moléculaire dans le substrat, tout en réduisant l'autre atome sous forme d'eau. Elles peuvent être classées en 2 groupes, et la stoechiométrie des réactions qu'elles catalysent peut être représentée de la manière suivante :



RH est le substrat

- Dans l'un des groupes, le donneur d'électrons lors de la catalyse correspondrait au noyau Fe tétrapyrrol : cytochrome P450 (isoenzyme (lanostérol 14 α déméthylase, stéroïde 11 β hydroxylase) ou cytochrome B5 (fatty acid desaturase)).

- L'autre groupe fonctionnerait avec des coenzymes flaviniques de type FAD et FMN (xanthine oxydase).

Les travaux de Andreason et Stier (1953) ont montré que les cellules de levures cultivées en anaérobiose sont incapables de synthétiser de l'ergostérol, le squalène s'accumulant d'une manière importante. Ceci leur a permis d'émettre l'hypothèse que la transformation du squalène en stérols exigeait de l'oxygène moléculaire.

L'isolement des mutants bloqués dans la synthèse des porphyrines chez la levure a permis de préciser les étapes métaboliques où interviennent les enzymes porphyriniques :

- respiration
- désaturation des acides gras
- réduction du sulfate en soufre réduit, assimilable dans les acides aminés.

Dans ces mutants, on observe une accumulation de lanostérol ainsi que de squalène. Ceci suggérerait donc que la squalène époxydase de levure n'était pas une enzyme à porphyrine mais plutôt, une enzyme flavinique, contrairement à la lanostérol 14 α déméthylase qui serait une enzyme porphyrinique.

I - CARACTERISTIQUES DE LA SQUALÈNE EPOXYDASE

La squalène époxydase a été abondamment étudiée dans le foie de rat (Tchen et al., 1957, Yamamoto et al., 1970, Tai et al 1972, Ono et al., 1975, Ferguson et al., 1977, Friedlander et al., 1980). L'enzyme est stimulée par des protéines solubles appelées "supernatant Protein Factor" (SPF) et "Sterol carrier protein" (SCP) (Srikantaiah et al., 1976, Chin et al., 1984). L'activité enzymatique est également stimulée par le triton X 100 ; elle est par contre, complètement détruite par le désoxycholate, et ne semble pas affectée par les inhibiteurs des monooxygénases à cytochrome P450 (Yamamoto et al., 1970).

L'enzyme est associée aux fractions microsomales et se compose, après solubilisation, d'une NADPH-cytochrome P450 réductase et d'une oxydase terminale. La masse moléculaire serait de 47000 (Ono et al., 1977 et 1980). L'activité optimale est obtenue à pH 7,5.

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'enzyme de levure. Jahnke et Klein (1983), ont étudié les exigences de l'enzyme, en oxygène chez Saccharomyces cerevisiae ; mais les travaux les plus approfondis ont été réalisés sur les levures pathogènes de type Candida albicans (Ryder et al. 1984 et 1986) et Candida parapsilosis (Paltauf et al., 1985).

La squalène époxydase de Candida exige un réducteur du type NADPH ou NADH, et du FAD. La stimulation de l'enzyme, par une protéine soluble du surnageant (SCP ou SPF) n'a pas pu être confirmée chez Candida albicans. Le triton X100 et le désoxycholate ont des effets inhibiteurs sur l'enzyme.

Nous avons étudié l'activité squalène époxydase de levure ; d'une part, parce que l'enzyme n'a pratiquement jamais été étudiée chez la levure, et d'autre part, parce que l'enzyme pouvait correspondre à une étape régulée ou limitante dans la biosynthèse de l'ergostérol.

II - MESURE DE L'ACTIVITE SQUALENE EPOXYDASE

La mesure de l'activité squalène époxydase supposait la mise au point d'un test fiable.

Pour solubiliser le squalène substrat, les techniques, couramment rapportées dans la littérature, utilisaient des solvants organiques comme les mélanges dioxane-propylène-glycol 2:1 (v/v),

l'hexane, ou des détergents : tween 80-acétone (20 mg/ml). Cette solubilisation était nécessaire pour faciliter la dispersion du substrat hydrophobe dans le milieu réactionnel et permettre son transfert sur les sites catalytiques. Ces procédés ont été utilisés avec succès pour étudier la squalène époxydase dans le foie de rat (Gavey et al., 1978), chez Candida albicans (Ryder et al., 1984), chez Candida parapsilosis (Paltauf et al., 1984) ou encore des extraits végétaux (Benveniste et al., 1970).

Nous nous sommes inspirés de ces travaux pour essayer de mettre au point une méthode de mesure de l'activité spécifique squalène époxydase de levure, "in vitro".

1 - Utilisation du squalène [¹⁴ C] exogène comme substrat

Le squalène [¹⁴ C] est solubilisé dans les mélanges : tween 80-acétone (20 mg/ml), tween 80-hexane (1 mg/ml), propylène glycol-dioxane 2:1 (v/v). La source enzymatique est un extrait acellulaire (12000 g) ou des microsomes, préparés comme décrit au paragraphe 5 de Matériel et Méthodes.

Le milieu réactionnel contient :

MgCl₂ 9,6 mM

NADPH 0,84 mM

G6P 12 mM

FAD 0,04 mM

G6PDH 2 unités

KF 4 mM

Squalène [¹⁴ C] 5 à 50 nmoles

enzyme : extrait acellulaire 12 000 g : 500 à 1 000 µg/essai

Microsomes : 80 à 120 µg.

La réaction se déroule au bain-marie à 30° pendant 30 à 60 minutes : elle est ensuite arrêtée par addition de KOH méthanolique 15 % (p/v), puis portée à 90°C pendant 60 minutes. Les produits de la fraction insaponifiable sont extraits avec de l'hexane ou de l'éther de pétrole, après adjonction d'un volume d'eau. Le solvant est ensuite évaporé sous azote afin de concentrer les produits de réaction dans un plus petit volume. Une chromatographie sur gel de silice est effectuée dans le système de solvant cyclohexane - acétate d'éthyle 9:1 (v/v) pour le fractionnement et l'analyse des produits de l'insaponifiable.

L'incubation de 5 à 55 nmoles de squalène [¹⁴ C] pendant 1 heure, en présence de 80 à 1000 µg de protéines enzymatiques (extrait acellulaire 12 000 g ou microsomes), ne révèle qu'une très faible activité squalène époxydase (tableau 25). Environ 10 % seulement du squalène est converti en squalène époxyde, lanostérol et ergostérol, dans le meilleur des cas (tween 80-acétone).

Ces résultats pouvaient signifier que le squalène exogène ne peut être utilisé comme substrat par l'enzyme. L'hypothèse la plus immédiate pour expliquer la très faible activité squalène époxydase observée pourrait être que :

- l'enzyme soit inactivée lors de la préparation ou très sensible aux détergents et aux solvants.

Cette hypothèse a pu être exclue car l'incubation d'acide mévalonique ou d'IPP en présence d'un même surnageant acellulaire, contenant les mêmes cofacteurs, conduisait à une synthèse appréciable de squalène, de squalène époxyde et de lanostérol.

Jahnke et Klein (1983), ont pu mesurer une activité squalène époxydase, en incubant du squalène lié à des microsomes inactivés

| Produits réactionnels | Surnageant acellulaire 12 000 g | | Microsomes FL100 | |
|---|------------------------------------|--------|------------------|--------|
| squalène (cpm) | 9 379 | 62,5 % | 10 559 | 70,4 % |
| Squalène 2-3 époxyde (cpm) | 795 | 5,3 % | 857 | 5,7 % |
| Lanostérol (cpm) | 685 | 4,56 % | 1 097 | 7,3 % |
| Ergostérol (cpm) | 154 | 1,02 % | 193 | 1,28 % |
| Activité sq. époxydase nmole/min/mg | 0,034 | | 0,045 | |

Tableau 25 : Activité squalène 2-3 époxydase :
utilisation de squalène [¹⁴C] exogène comme substrat.

55 nmoles de squalène libre, d'origine exogène, sont incubés en présence de microsomes ou d'un extrait acellulaire 12 000 g d'une souche sauvage FL100, pendant 60 minutes.

Les pourcentages exprimés ont été calculés par rapport à la radioactivité du substrat introduit dans chaque essai.

avec des microsomes fraîchement préparés. Le squalène lié aux microsomes a été préparé à partir de culture anaérobie.

Nous avons décidé d'utiliser la même technique ; cependant, à la place des cultures anaérobies, l'utilisation du mutant *erg¹*, bloqué dans l'activité squalène époxydase, nous a paru plus simple pour obtenir du squalène lié aux microsomes.

2 - Utilisation du squalène [¹⁴C] endogène lié aux microsomes

La souche mutante *erg¹*, bloquée dans la squalène synthétase, a été marquée à l'acétate [¹⁴C], en vue d'obtenir du squalène lié aux membranes. La source enzymatique et les microsomes ont été préparés comme décrit dans Matériel et Méthodes. Le taux de squalène radioactif dans les microsomes a été dosé selon la technique de Rothblat et al., 1962, reporté dans Matériel et Méthodes (paragraphe 8).

Le milieu réactionnel contient

| | |
|-------------------|----------|
| MgCl ₂ | 9,6 mM |
| NADPH | 0,84 mM |
| G6P | 12 mM |
| FAD | 0,04 mM |
| KF | 4 mM |
| G6PDH | 2 unités |

Substrat (Microsomes *erg¹*) 10 nmoles de squalène [¹⁴C]
Enzyme : Microsomes 80 à 120 µg/essai
 extrait acellulaire 12 000 g : 500 à 1 000 µg/essai.

L'incubation de 10 nmoles de squalène [¹⁴C] lié aux microsomes, en présence de concentrations variables de protéines enzymatiques de la souche sauvage, ne révèle qu'une très faible activité squalène époxydase : 2 à 4 % seulement du squalène radioactif est transformé en squalène époxyde, lanostérol et ergostérol en 60 minutes (tableau 26 et fig. 24).

| Produits réactionnels | Microsomes FL100 | | Surnageant 12 000 g FL100 | |
|---|------------------|-------|---------------------------|--------|
| squalène (cpm) | 12 297 | 82 % | 12 307 | 82 % |
| Squalène 2-3 époxyde (cpm) | 504 | 3,4 % | 113 | 0,75 % |
| Lanostérol (cpm) | 102 | 0,7 % | 67 | 0,45 % |
| Ergostérol (cpm) | 42 | 0,3 % | 54 | 0,35 % |
| Activités squalène époxydase nmole/min/mg | 0,048 | | 0,017 | |

Tableau 26 : Activité Squalène époxydase :

utilisation de squalène [¹⁴C] lié aux microsomes, comme substrat

10 nmoles (15 000 cpm) de squalène lié aux microsomes de la souche Erg 1 ont été incubés en présence de microsomes de FL100 ou d'un extrait acellulaire 12 000 g pendant 60 min.

Les pourcentages reportés dans le tableau ont été calculés par rapport à la radioactivité du substrat dans chaque essai.

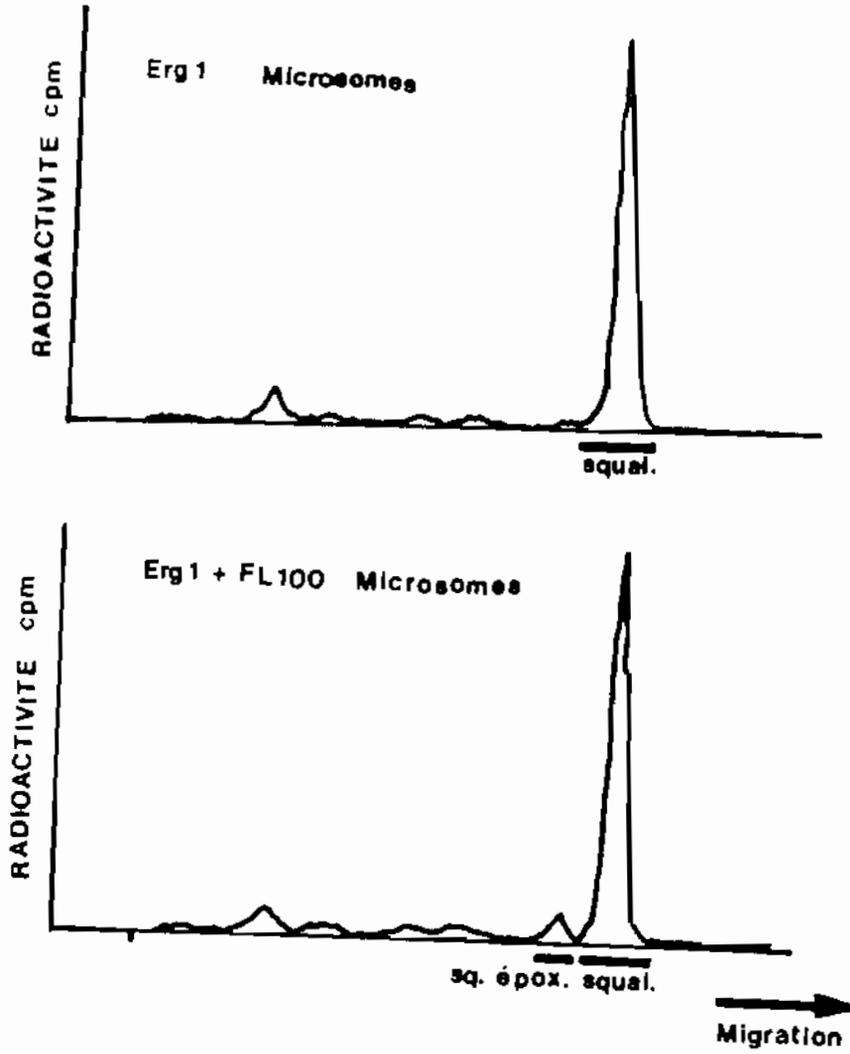


Fig. 24 - ACTIVITE SQUALENE EPOXYDASE

Utilisation du squalène [^{14}C] lié aux microsomes
en présence de microsomes actifs d'une souche étrangère

Ces résultats n'ont pas pu être améliorés, même en faisant varier la quantité de substrat (microsomes radioactifs).

Ces résultats suggèrent que le squalène lié aux microsomes inactifs (erg 1) ne peut s'échanger avec les microsomes étrangers actifs (F0.100).

Ces observations semblent indiquer que la squalène synthétase et la squalène époxydase peuvent être associées dans un même complexe enzymatique et que, seul le squalène, exclusivement synthétisé dans le complexe, peut être le substrat de la squalène époxydase.

Dans ce cas, l'activité enzymatique ne peut être mesurée qu'en présence de squalène synthétase ; le Farnésyl pyrophosphate est alors le substrat de la réaction globale.

3 - Utilisation du FPP [¹⁴C] comme substrat

Le farnésyl pyrophosphate [¹⁴C] a été synthétisé selon le protocole de Popjak, décrit dans le chapitre Régulation de la Squalène Synthétase.

3-1. Incubation avec des cellules perméabilisées

Dans un premier temps, nous avons incubé le FPP [¹⁴C] non pas avec un surnageant acellulaire, mais avec des cellules perméabilisées, ceci afin de détruire le moins possible les structures membranaires et montrer que l'enzyme pouvait fonctionner dans ces conditions.

Le protocole utilisé est décrit au paragraphe 7-2 de Matériel et Méthodes.

L'incubation de 5 nmoles de FPP [14 C] pendant 2 heures, conduit dans ces conditions, à la synthèse de squalène, squalène 2-3 époxyde, lanostérol et ergostérol, les produits majeurs étant le squalène et le lanostérol (fig. 25).

L'utilisation de ce type de système "in vitro", n'est fiable pour la mesure de l'activité spécifique squalène époxydase, que si c'est cette dernière qui limite la réaction globale de conversion de FPP en squalène époxyde.

Les expériences de marquage à l'acétate [14 C] ainsi que l'incubation de FPP [14 C] en présence de cellules perméabilisées, ont révélé que le squalène 2-3 époxyde ne s'accumulait pratiquement pas dans les cellules mais qu'il était prioritairement converti en lanostérol et que le pool de squalène ne se résorbait que lentement.

Ceci nous a permis de faire l'hypothèse que la squalène époxydase pourrait être une enzyme à faible activité spécifique par rapport à la squalène synthétase et la squalène 2-3 époxyde-lanostérol cyclase.

Dans ces conditions, il était alors possible de rechercher les conditions où la squalène synthétase serait en excès et la squalène époxydase en vitesse initiale afin de mesurer son activité spécifique.

Un essai de contrôle, réalisé sur un extrait acellulaire pendant 30 min à 30°C a révélé une bonne activité squalène époxydase. Nous avons alors préféré l'utilisation d'un extrait acellulaire aux cellules perméabilisées pour obtenir une activité spécifique plus fiable, et éviter une éventuelle inactivation de l'enzyme par les solvants de perméabilisation (figure 26).

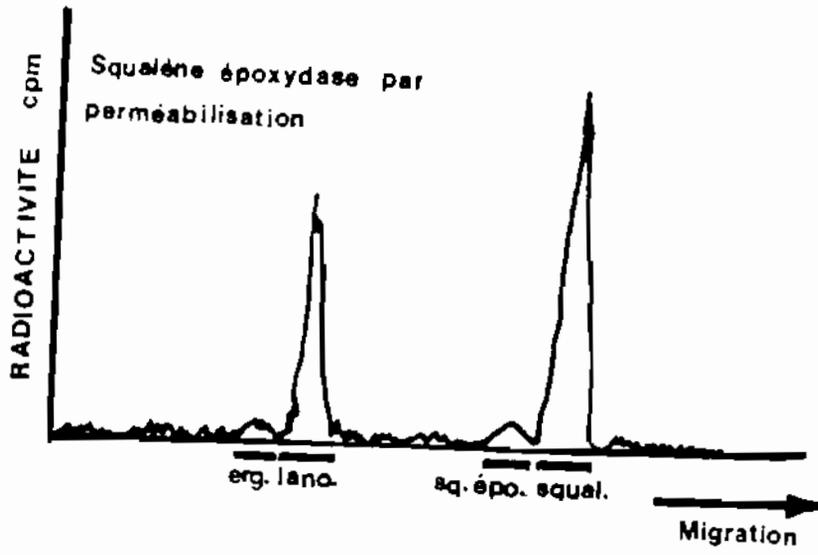


Fig. 25 : Activité squalène 2-3 époxydase
(Technique de Perméabilisation des cellules).
Substrat FPP

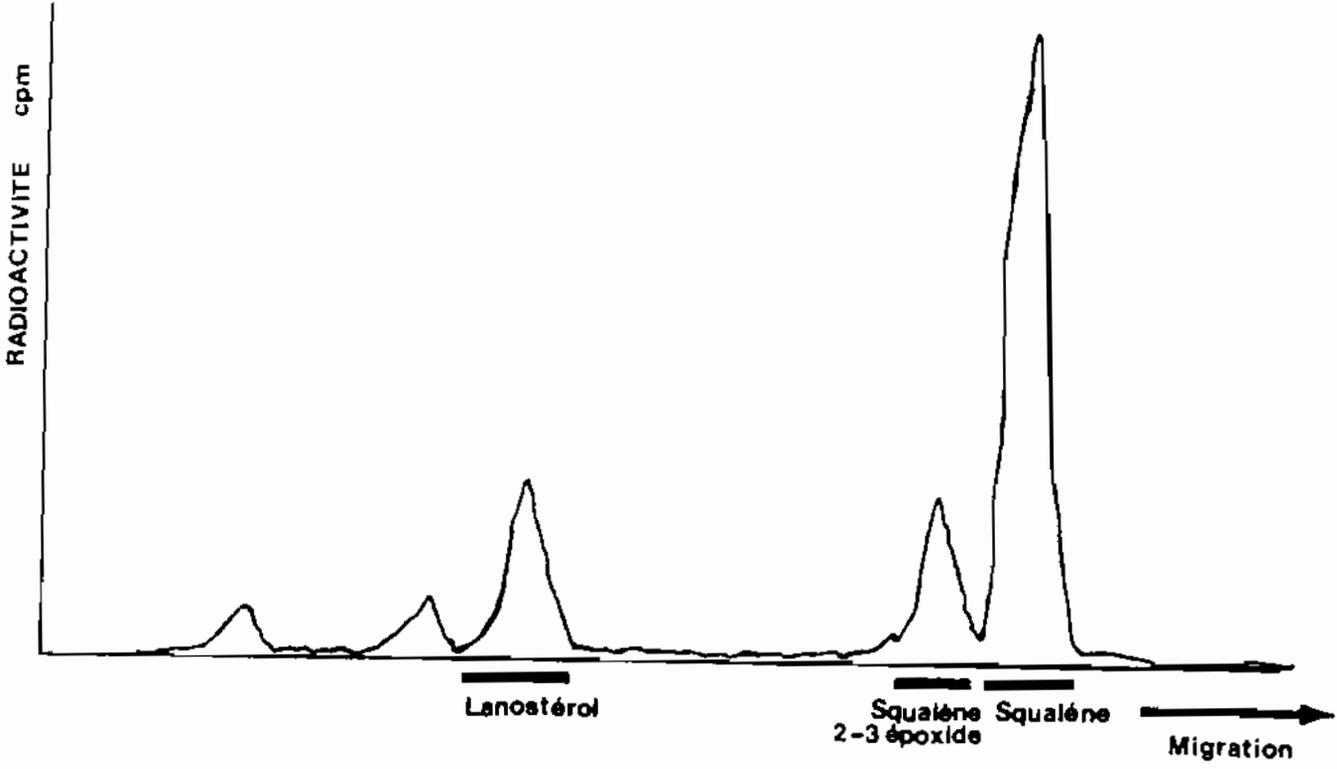


Fig. 26 - Distribution des produits réactionnels de la squalène synthétase et de la squalène époxydase
incubation de 5 nmoles de FPP [^{14}C] pendant 30 minutes
avec 600 μg de protéines enzymatiques 12000 g

3-2. Incubation du FPP [^{14}C] avec un extrait
acellulaire 12 000 g ou avec des microsomes

Les extraits enzymatiques ont été préparés comme décrit
paragraphe 5 de Matériel et Méthodes.

Le milieu réactionnel contient :

| | |
|------------------------|----------|
| MgCl ₂ | 10 mM |
| G6P | 25 mM |
| NADPH | 5 mM |
| KF | 4 mM |
| FAD | 0,04 mM |
| G6PDH | 2 unités |
| FPP[^{14}C] | 5 nmoles |

Extrait enzymatique 12 000 g : 250 à 1 000 μg /essai (FL100)

65 à 125 μg /essai (Mutant)

Microsomes : 80 à 350 μg /essai.

Le milieu réactionnel est préincubé au préalable, 10 à
15 minutes dans un bain-marie à 30°C, avant adjonction de l'extrait
enzymatique.

La réaction se déroule pendant 30 minutes. Elle est arrêtée
au bout de ce temps par addition de potasse méthanolique (KOH) 15 %
(p/v). Les essais sont ensuite portés à 60°C pendant 30 minutes,
après adjonction de stérois entraîneurs. Les produits de la fraction
insaponifiable sont extraits avec de l'hexane ou de l'éther de pétrole
(3 x 3 ml). Le solvant d'extraction est évaporé sous azote et les
produits réactionnels sont repris dans un faible volume de solvant
(hexane ou ether de pétrole). Une chromatographie sur gel de silice
est ensuite réalisée dans le système de solvants cyclohexane-acétate
d'éthyle pour le fractionnement et l'analyse des produits réaction-
nels.

3-2-1. Mesure de l'activité squalène époxydase dans la souche sauvage FL100

a) Activité squalène époxydase en fonction de la concentration en protéines et en fonction du temps

Pour des concentrations croissantes de protéines enzymatiques (250 à 1 000 μg), l'excès de squalène synthétase est obtenu à partir de 600 μg , en incubant 5 nmoles de FPP [^{14}C] pendant 30 minutes. Dans ces conditions, 95 à 100 % de farnésyl pyrophosphate sont convertis en squalène, squalène 2-3 époxyde, lanostérol, avec un résidu plus polaire, correspondant vraisemblablement à des produits de dégradation du FPP (fig. 27 et 28).

Pour des concentrations en protéines de 600 μg , 750 μg et 1000 μg , la somme des produits réactionnels correspondant à la squalène synthétase, reste constante, ce qui indique que la squalène synthétase est bien au plateau.

Dans ces conditions, la squalène époxydase correspondant à la somme squalène 2-3 époxyde et lanostérol formés, est linéaire en fonction des protéines jusqu'à 750 μg (tableau 27A).

L'expérience a été répétée en fonction du temps avec 600 μg de protéines. La fig. 27 confirme que la squalène synthétase est au plateau au bout de 30 minutes, alors que l'activité squalène époxydase est linéaire pendant 60 minutes. L'activité spécifique Squalène époxydase observée est, dans ces conditions, de 0,10 nmoles de FPP transformé \pm 0,02 (tableau 27B).

Dans cette réaction le FPP est converti à 100 % en squalène, par contre ce dernier n'est consommé qu'à 30 % dans le même temps (30 minutes).

A

| Durée d'incubation (min) | Squalène 2-3 époxyde (cpm) | FPP converti (nmoles) | Activité spécifique (nmole FPP/mg/min) |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------|--|
| 15 min | 1 732 | 0,57 | 0,083 |
| 30 min | 3 807 | 1,5 | |
| 45 min | 5 100 | 2,1 | |
| 60 min | 6 802 | 2,83 | |
| 75 min | 6 785 | 2,82 | |
| 90 min | 6 702 | 2,79 | |

B

| Protéines enzymatiques (ug/essai) | Squalène 2-3 époxyde (cpm) | FPP converti (nmoles) | Activité spécifique (nmole FPP/min/mg) |
|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------|--|
| 250 µg | 1 511 | 0,50 | 0,106 |
| 500 µg | 3 560 | 1,20 | |
| 750 µg | 7 058 | 2,35 | |
| 1000 µg | 6 470 | 2,15 | |

Tableau 27 : Activité squalène époxydase (souche sauvage FL100)

A - En fonction du temps, pour 600 µg de protéines enzymatiques

B - En fonction de la concentration en protéines enzymatiques ;
durée d'incubation : 30 minutes

Fig. 27 - ACTIVITES SPECIFIQUES SQUALENE EPOXYDASE

A - Activité squalène synthétase et squalène époxydase en
fonction du temps : incubation de 600 µg de protéines 12000 g

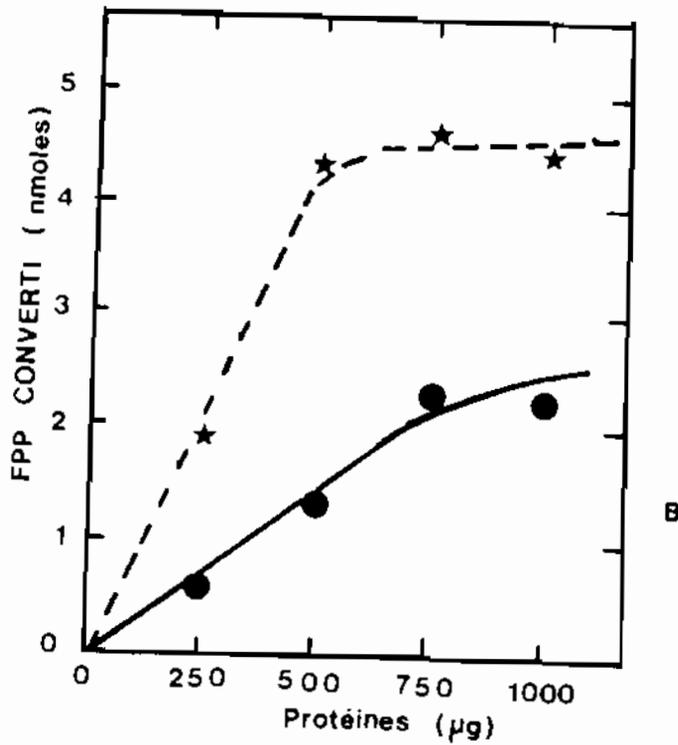
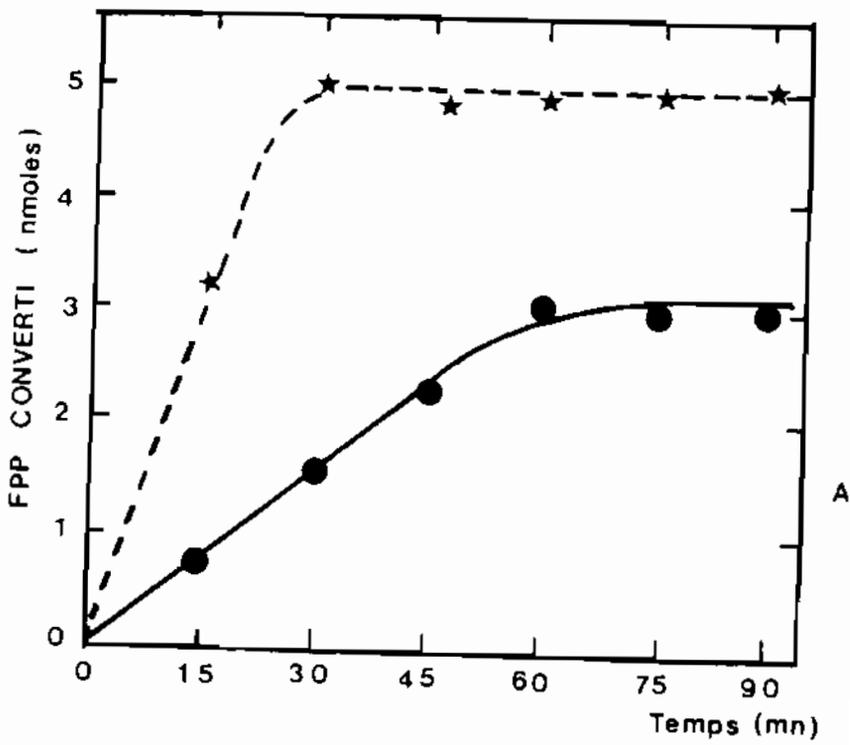
★-----★ conversion du FPP en squalène et dérivés

●————● conversion du FPP en squalène 2-3 époxyde et dérivés

B - Activité squalène synthétase et squalène époxydase
en fonction de la concentration en protéines
incubation pendant 30 minutes avec un surnageant 12000 g

★-----★ conversion du FPP en squalène et dérivés

●————● conversion du FPP en squalène 2-3 époxyde et dérivés.



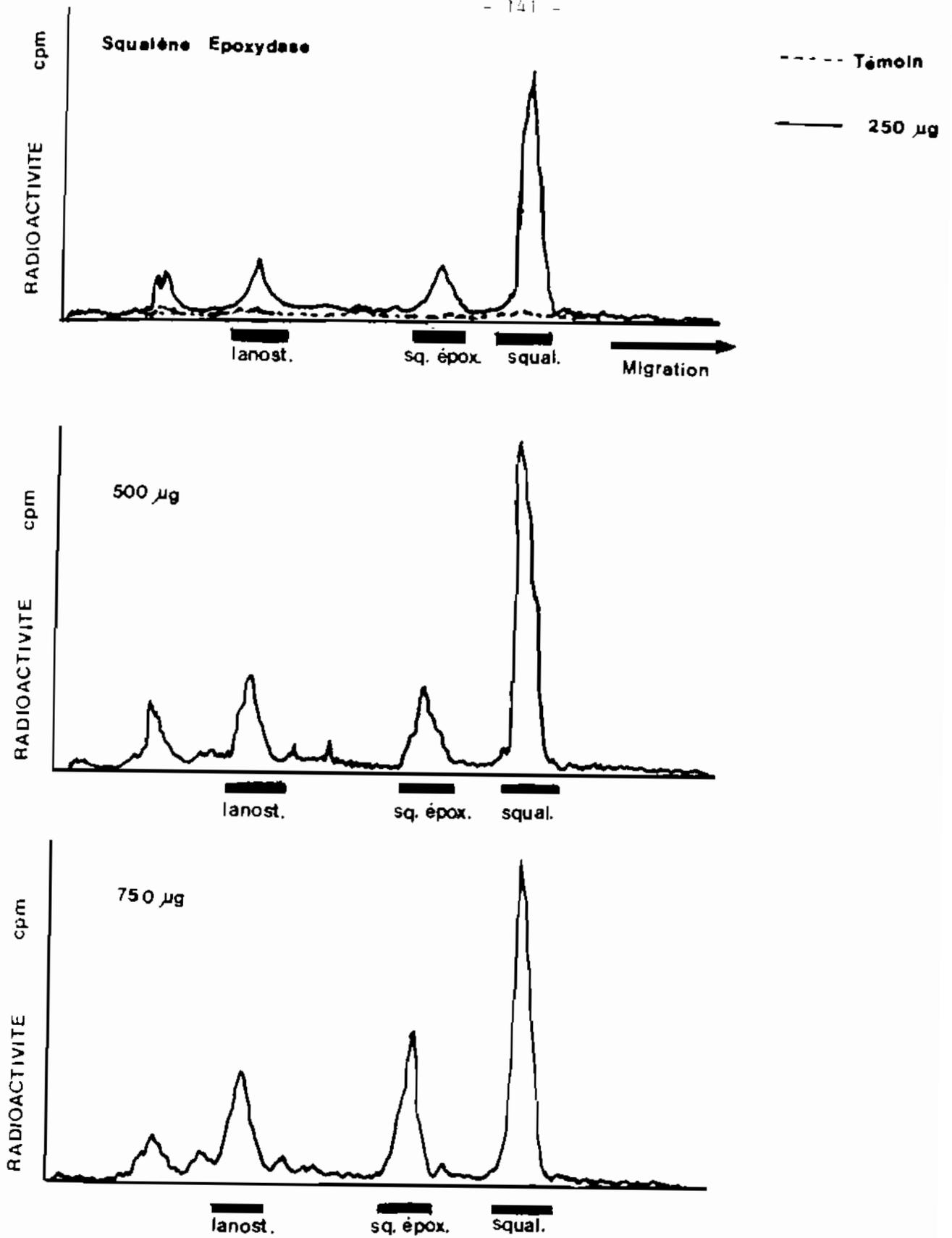


Fig. 28 - Activité squalène époxydase

Evolution des produits réactionnels : squalène 2-3 époxyde et dérivés en fonction de la concentration en protéines (durée d'incubation 30 minutes)

b) Exigences en cofacteurs

L'étude des exigences en cofacteurs, permet une meilleure connaissance des caractéristiques d'une enzyme. De nombreux travaux ont été réalisés à ce sujet, sur la squalène époxydase de foie de rat (Tchen et al., 1957) et chez Candida albicans (Ryder et Dupont 1984).

Aucune recherche n'avait pratiquement été menée sur les exigences de l'enzyme de levure, Saccharomyces cerevisiae.

Nous avons utilisé des microsomes lavés par centrifugations successives, comme décrit dans Matériel et Méthodes paragraphe 5-2. Ces lavages étaient nécessaires afin d'éliminer toute activité provenant de facteurs solubles du surnageant acellulaire .

L'incubation pendant 60 minutes à 30°C, en présence de 350 µg de protéines microsomales ainsi préparées, révèle une activité squalène époxydase normale. L'adjonction de 350 µg de protéines du surnageant 105 000 g ne conduit à aucune amélioration de l'activité enzymatique (tableau 28). Ceci prouve bien qu'aucun facteur protéique soluble n'est requis pour l'activité squalène epoxydase de levure. Aucune activité n'est décelée dans le surnageant 105 000 g, ce qui prouve que l'enzyme est totalement associée aux microsomes.

De plus, la synthèse du lanostérol est observée dans les microsomes ainsi lavés, ce qui prouve nettement que la squalène époxyde-lanostérol cyclase est également associée aux microsomes et non soluble comme cela a été décrit par Dean et al., 1967 puis Schechter et Bloch 1970.

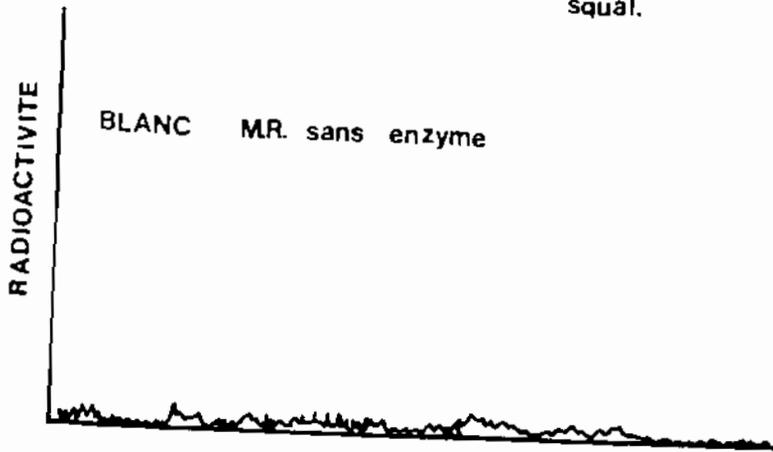
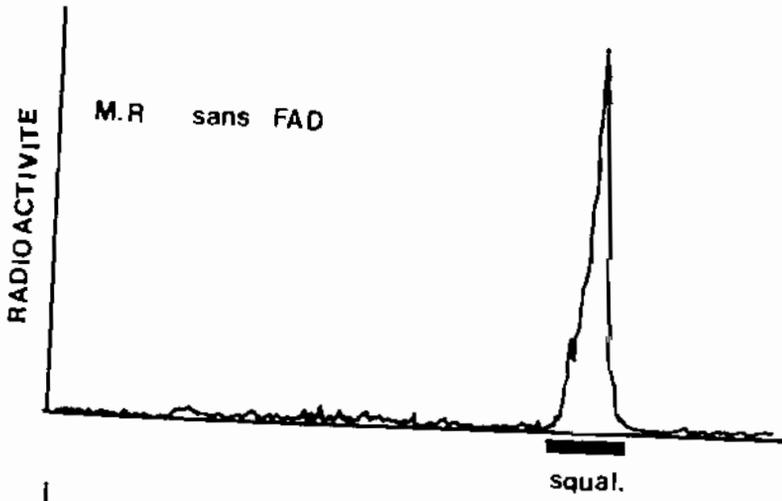
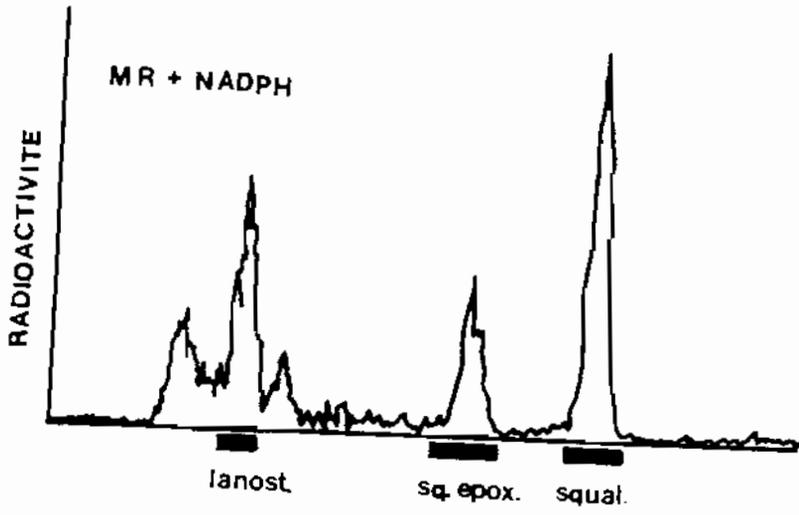
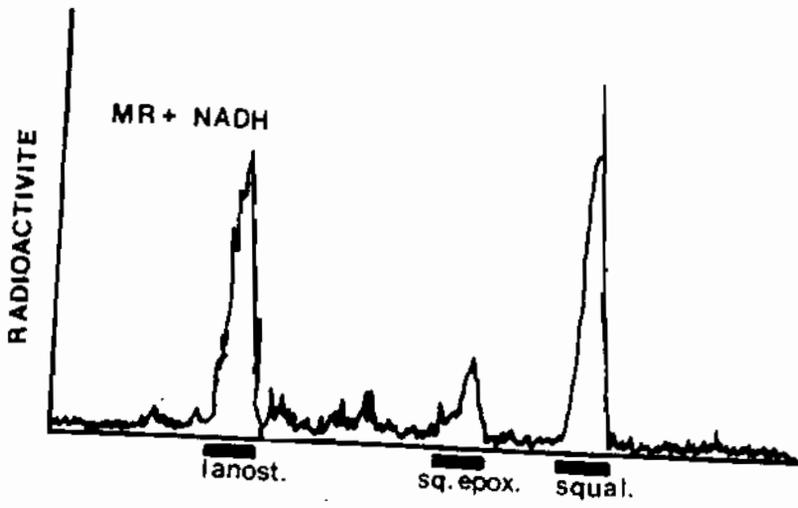
L'étude des exigences en cofacteurs (NADPH, NADH, FAD), montre (tableau 28) que le FAD est indispensable pour l'activité enzymatique. L'activité optimale est obtenue avec le NADPH plutôt

| Fractions | Cofacteurs | Activité squalène 2-3 époxydase nmoles FFF min mg |
|---|-----------------------------|---|
| M I C R O S O M E S L A V E S | 0 | 0 |
| | FAD + NADPH | 0,16 |
| | NADPH | - |
| | FAD + NADH + NADPH | 0,067 |
| | FAD + NADH | 0,052 |
| | NADH | - |
| | FAD + NADPH + S 105000 g | 0,15 |
| | S 105 000 g | FAD + NADPH |

Tableau 28 : Activités squalène époxydase

Exigences en cofacteurs et localisation de l'enzyme

Fig. 29 - ACTIVITE SQUALENE EPOXYDASE
Exigences en cofacteurs.



Migration →

qu'avec le NADH. Ce dernier a des effets inhibiteurs sur le complexe enzymatique squalène synthétase-squalène époxydase (fig. 29).

Comme l'époxydation du squalène exige de l'oxygène moléculaire, nous avons vérifié que l'oxygène n'était pas limitant dans nos conditions d'incubation. Pour cela, nous avons alors réalisé nos tests dans les conditions standard, mais en présence d'une gamme de concentrations d'eau oxygénée comprise entre 0 et 0,3 mM.

En dépit d'une activité catalase importante dans les extraits acellulaires testés, aucune stimulation de l'activité squalène époxydase n'a été observée. Les travaux de Jahnke et al. (1983) rapportent un Km apparent de 4,3 μ M d'oxygène pour la squalène époxydase de levure et une inhibition de l'activité enzymatique est observée à 2 mM d'oxygène.

Les calculs montrent que dans nos conditions de test avec l'eau oxygénée, notre système disposait de 230 μ M d'oxygène dissous ce qui prouve que l'oxygène est largement en excès dans nos conditions de test.

- c) Effets de détergents, de drogues de la classe des allylamines et de certains métabolites terminaux de la voie de biosynthèse des stérols : lanostérol et ergostérol, sur l'activité enzymatique.

En vue de solubiliser et de purifier une enzyme membranaire, une étude préalable des effets de détergents est nécessaire. De plus, dans le but de déterminer une éventuelle rétroinhibition par les produits terminaux (lanostérol, ergostérol), il a fallu rechercher par quel détergent ou solvant, ces molécules hydrophobes pouvaient être apportées sur les sites catalytiques.

Nous avons étudié les effets du désoxycholate et du mélange tween 80-acétone sur l'activité enzymatique. Ces détergents sont en effet couramment utilisés pour la solubilisation des enzymes membranaires et des molécules hydrophobes.

L'activité a également été testée en présence de deux drogues de la classe des allylamines : le SF 86-327 (Terbafine) et la naftifine inhibiteurs spécifiques de la squalène époxydase chez les champignons.

Le désoxycholate est préparé dans l'eau (0,25 % p/v), tandis que les drogues, SF 86-327 et naftifine, ont été préparées dans le mélange éthanol-eau 1:1 (v/v) à raison de 1 mg/ml.

Le tableau 29 montre que la squalène époxydase est insensible au tween 80-acétone. Par contre une inhibition totale est observée avec le désoxycholate (200 µg/ml), le SF 86-327 (1 µg/ml) et la naftifine (10 µg/ml).

En ce qui concerne la squalène synthétase, seul le désoxycholate provoque une inhibition de l'ordre de 25 % sur l'activité spécifique, les autres molécules testées étant sans effet sur l'activité enzymatique.

Influence du lanostérol et de l'ergostérol sur l'activité enzymatique

Le marquage de la voie de biosynthèse des stérols par l'acétate [¹⁴C] a révélé que le squalène 2-3 époxyde ne s'accumulait que dans le mutant erg 7 bloqué dans l'activité oxydo squalène-lanostérol cyclase. Par contre, dans les mutants porphyrine⁻ ainsi que dans le mutant erg 16 bloqué dans la lanostérol 14 α déméthylase, on observe une accumulation de squalène. De plus, la mesure de l'activité spécifique squalène époxydase met en évidence une activité extrêmement faible par rapport à toutes les autres activités enzymatiques déjà mesurées dans la voie de biosynthèse des stérols (tableau 34).

| | Activités spécifiques squalène époxydase (nmoles FPP/min/mg) |
|-----------------------------------|--|
| standard | 0,094 |
| Tween 80-Acetone | 0,098 |
| Lanostérol 0,12 mM | 0,078 |
| Lanostérol 0,24 mM | 0,072 |
| Lanostérol 1,2 mM | 0,065 |
| Ergostérol 0,12 mM | 0,095 |
| Ergostérol 1,2 mM | 0,078 |
| SF 10 µg/ml | 0 |
| Naftifine 10 µg/ml | 0 |
| Désoxycholate 0,25 % 200 µg/ml | 0 |
| Triton x 100 | 0 |

Tableau 29 : Effets du lanostérol et l'ergostérol sur l'activité
squalène époxydase

Inhibition par les drogues : SF, naftifine et désoxycholate

L'une des hypothèses possibles pourrait être que le lanostérol ou l'ergostérol rétroinhiberait l'activité squalène époxydase.

Pour vérifier cela, nous avons étudié, "in vitro", l'influence du lanostérol et de l'ergostérol sur l'activité enzymatique.

Les stérols (entre 0 et 1,2 mM final / essai), ont été dispersés, au préalable dans une solution acétonique de tween 80 (20 g/l), selon une technique décrite par Hata et al., 1982. La solution enzymatique (600 µg de protéines d'un extrait acellulaire 12 000g), a été ensuite préincubée pendant 15 minutes, à 30°C, en présence de lanostérol ou d'ergostérol. Le milieu réactionnel standard a été ajouté en dernier.

L'incubation pendant 30 minutes à 30°C montre que ces deux stérols ne provoquent pas une inhibition significative sur l'activité époxydase (environ 15 %) (tableau 29). Dans les mêmes conditions, la squalène synthétase n'est pas affectée.

Ceci suggère que l'activité enzymatique ne serait pas rétro-inhibée par le lanostérol ou l'ergostérol. Néanmoins, il se pourrait aussi que ces deux produits hydrophobes ne se lient pas à l'enzyme, même en présence de détergent.

3-2-2. Mesure de l'activité spécifique squalène époxydase en anaérobiose et en carence en pantothénate.

- a) Activité squalène époxydase dans des conditions anaérobies : induction de la synthèse de l'enzyme par l'oxygène.

Pour comprendre le rôle régulateur de l'ergostérol et de l'oxygène, il était intéressant de mesurer l'activité spécifique

de l'enzyme après culture en anaérobiose car dans ces conditions, le squalène s'accumule par suite de la carence en oxygène (Andreason et Stier 1953 a et b, Mopurgo et al., 1964).

L'activité enzymatique a été mesurée dans un extrait acellulaire 12 000 g, après une culture anaérobie en milieu complet YPG en présence d'acide oléique 50 mg/l et d'ergostérol, en excès (50 mg/l) ou à faible concentration (2 mg/l).

Les résultats exprimés dans le tableau 30 montrent que les activités diminuent d'un facteur 6 à 10 en comparaison avec celles obtenues dans les conditions aérobies. Cette diminution de l'activité pourrait être due à une inactivation de l'enzyme ou à un arrêt de la synthèse de l'enzyme pendant la période d'anaérobiose.

Pour trancher entre ces deux possibilités, les cellules cultivées en anaérobiose en présence d'acide oléique et d'ergostérol ont été récoltées et transférées dans un milieu complet YPG frais, en présence ou en absence de cycloheximide (50 mg/l), un inhibiteur de la synthèse protéique (Raulston et al., 1980). Les cultures ainsi séparées sont ensuite aérées pendant 10 heures avant la mesure de l'activité squalène époxydase.

Les résultats présentés dans le tableau 30 montrent que l'activité squalène époxydase est rétablie par l'aération lorsque la synthèse protéique n'est pas bloquée. Par contre, une inhibition de la synthèse protéique maintient l'activité enzymatique à un niveau très faible (diminution d'un facteur 3 par rapport à l'anaérobiose). Cette diminution de l'activité est due vraisemblablement à la protéolyse car la croissance cellulaire est complètement arrêtée.

Cette expérience démontre que la squalène époxydase est réprimée dans les conditions d'anaérobiose et que sa synthèse est induite après aération.

b) Mesure de l'activité spécifique dans
des cellules carencées en pantothénate

Les cellules de levures ont été cultivées dans le milieu YNB reconstitué (cf. Matériel et Méthodes), en présence d'une concentration limitante en pantothénate (15 µg/l). Une culture témoin a été réalisée avec une concentration optimale en pantothénate (45 µg/l) : à cette concentration la synthèse des stérols et la croissance cellulaire sont normales.

L'incubation d'un extrait acellulaire 12 000 g, dans les conditions standard de mesure de l'activité squalène époxydase, révèle une diminution de l'activité spécifique d'environ 50 % dans les cellules carencées en pantothénate (tableau 30). Par contre, l'activité squalène synthétase reste inchangée par rapport au témoin non carencé.

3-2-3. Activité spécifique squalène époxydase dans
les mutants auxotrophes pour les stérols

L'activité enzymatique a été mesurée dans les mutants auxotrophes pour les stérols, après culture à 28°C dans le milieu YPG supplémenté en ergostérol (2mg/l).

Les expériences ont été réalisées sur des extraits acellulaires 12 000 g, selon le protocole standard reporté dans le paragraphe 3-2 de ce chapitre.

Les résultats, présentés dans le tableau 31 montrent que l'activité spécifique squalène époxydase est en général déréprimée d'un facteur 4 à 5 dans les mutants auxotrophes pour l'ergostérol, exception faite pour le mutant erg 12, bloqué dans la mévalonate

| conditions de culture | Milieux de culture | Activités spécifiques squalène époxydase (nmoles FPP/min/mg) |
|--|---|--|
| A A N A É R O B I O S E | Ergostérol 50 mg/l + Acide oléique 50mg/l | 0,010 |
| | Ergostérol 2 mg/l Acide oléique 50 mg/l | 0,017 |
| B + A é r a t i o n (10heures) | Anaérobie + cycloheximide | 0,003 |
| | Aérialion sans cycloheximide | 0,050 |
| C A é r o b i e | Pantothénate 15 µg/l | 0,048 |
| | Pantuthénate 45 µg/l | 0,092 |
| | Contrôle FI 100 | 0,11 |

Tableau 30 : Activités squalène époxydase

Partie A : Effet de l'Anaérobiose

Partie B : Effet de l'Aération après Anaérobiose

Partie C : Effet du pantuthénate

kinase (l'activité squalène époxydase n'est augmentée que d'un facteur 2) et le mutant erg 16, bloqué dans la lanostérol 14 α déméthylase et dont l'époxydase est abaissée d'un facteur 3 par rapport à la souche sauvage.

La dérépression la plus forte correspond au mutant erg 7 bloqué dans l'activité squalène époxyde-lanostérol cyclase et ne synthétisant donc pas le lanostérol. L'activité spécifique dans cette souche par rapport au mutant erg 16 bloqué dans les étapes de déméthylation du lanostérol, est 20 fois plus élevée.

La carence en ergostérol pourrait donc être à la base de l'induction de la squalène époxydase. mais de plus, le lanostérol pourrait être represser. Nous avons en effet, pu observer que le lanostérol ne rétroinhibait pas l'activité enzymatique "in vitro".

Le faible niveau d'induction (facteur 2) observé dans la souche erg 12, pourrait être une conséquence de l'accumulation de mévalonate dans cette souche.

En vue de préciser ce dernier point, l'activité squalène époxydase a été déterminée dans des souches porteuses du gène ERG 12⁺ sur plasmide multicopies.

Les résultats sont présentés dans le tableau 32. Le clone erg 12 pl A01 (porteur du gène ERG 12⁺) présente la même activité que le clone erg 12 non transformé ; par ailleurs la souche sauvage FL100 porteuse du plasmide A01 présente la même activité que la souche sauvage FL100 non transformée.

Ce résultat indique que la faible dérépression de l'activité squalène époxydase n'est pas en relation directe avec la teneur intracellulaire en mévalonate.

L'activité squalène époxydase a également été mesurée dans le clone erg 9 pl 13 porteur du gène ERG 9⁺. L'activité spécifique

| SOUCHES | BLOCS ENZYMATIQUES | ACTIVITES SPECIFIQUES SQUALÈNE ÉPOXYDASE (nmoles FPP/min/mg) |
|----------|---|--|
| Erg 10 B | Acétoacétyl CoA thiolase | 0,41 ± 0,05 (3) |
| Erg 11 | HMG CoA synthétase | 0,46 ± 0,04 (4) |
| Erg 12 | Mévalonate kinase | 0,24 ± 0,02 (3) |
| Erg 8 | Phosphomévalonate kinase | 0,48 ± 0,06 (4) |
| Erg 19 | Pyrophosphomévalonate décarboxylase | 0,43 ± 0,08 (2) |
| Erg 9 | Squalène synthétase | Non mesurable |
| Erg 18 | Squalène époxydase | 0 |
| Erg 7 | Squalène 2-3 époxyde-lanostérol cyclase | 0,54 ± 0,03 (3) |
| Erg 16 | Lanostérol déméthylase | 0,029 ± 0,08 (3) |
| FL100 | Sauvage | 0,10 ± 0,02 (8) |

Tableau 31 : Activités squalène époxydase des mutants auxotrophes pour l'ergostérol

| SOUCHES | ACTIVITE SPECIFIQUE SQUALENE EPOXYDASE nmole/min/mg |
|----------------|---|
| Erg 12 p1 A01 | 0,21 \pm 0,02 (2) |
| Erg 9 p1 MF 13 | 0,11 \pm 0,02 (2) |
| FL100 p1 A01 | 0,108 \pm 0,02 (2) |
| Erg 9 | non mesurable |
| Erg 12 | 0,24 \pm 0,02 (2) |
| FL100 ura 3- | 0,12 (1) |

Tableau 32 : Activités squalène époxydase dans les souches porteuses de plasmides multicopies

Témoins : erg 12

erg 9

FL100 ura 3-

squalène époxydase (tableau 32) est la même que dans la souche sauvage, alors que l'activité spécifique squalène synthétase est augmentée d'un facteur 1,5 par rapport à la souche sauvage (tableau 24).

Cette expérience reconferme que l'activité squalène synthétase n'est pas limitante dans notre méthode de mesure de l'activité squalène époxydase.

4. Mesure des Activités squalène synthétase et squalène époxydase dans les diploïdes $\frac{+}{+}$, $\frac{\text{erg } 9}{+}$ et $\frac{\text{erg } 16}{+}$

Nous avons fait l'hypothèse que les activités squalène synthétase et squalène époxydase sont associées sous forme de complexe et que seul le squalène synthétisé à l'intérieur du complexe pourrait être transformé par la squalène époxydase.

Dans le cadre de cette hypothèse, le squalène ne serait donc pas échangeable d'un complexe à l'autre.

La mesure des activités enzymatiques squalène synthétase et squalène époxydase dans le diploïde hétérozygote $\text{erg } 9/+$ devrait permettre de confirmer cette hypothèse.

Dans un hétérozygote $\frac{\text{erg } 9}{+}$ en effet, on doit avoir une moitié de complexe fonctionnel et une moitié de complexe inactif.

La mesure des activités squalène synthétase et squalène époxydase à partir d'un extrait acellulaire (12 000 g) de l'hétérozygote est présentée dans le tableau 33.

| SOUCHES | ACTIVITES SPECIFIQUES SQUALENE SYNTHETASE (nmole FPP/min/mg) | ACTIVITES SPECIFIQUES SQUALENE EPOXYDASE (nmole FPP/min/mg) |
|----------|--|---|
| Erg 9/+ | 0,20 | 0,047 |
| Erg 16/+ | 0,74 | 0,059 |
| +/+ | 0,42 | 0,092 |
| Erg 9 | 0 | non mesurable |
| Erg 16 | 0,76 | 0,029 |
| FL100 | 0,45 | 0,098 |

Tableau 33 . Activités enzymatiques squalène synthétase et squalène époxydase dans quelques diploïdes.

Les résultats montrent qu'effectivement les activités spécifiques squalène synthétase et squalène époxydase sont toutes les deux diminuées de moitié par rapport à la souche sauvage. Ces résultats confirment notre hypothèse.

Le diploïde erg 16/+ a également été étudié car dans la souche mutante haploïde erg 16, l'activité spécifique squalène synthétase est déréprimée d'un facteur 1,5, alors que l'activité spécifique squalène époxydase est réprimée d'un facteur 3.

La mesure des activités enzymatiques dans le diploïde hétérozygote erg 16/+ (tableau 28), montre que l'activité squalène synthétase reste déréprimée (facteur 1,5) alors que l'activité squalène époxydase est augmentée d'un facteur 2 par rapport au mutant erg 16, mais reste toujours plus faible d'un facteur 2 environ par rapport à la souche sauvage.

Ce résultat indique que la synthèse des deux enzymes ne serait pas régulée par les stérols libres biosynthétisés, mais par des stérols associés aux membranes. En effet, les activités spécifiques mesurées dans le diploïde erg 16/+ correspondent à la moyenne arithmétique des activités correspondantes obtenues dans les haploïdes impliqués ; alors que la teneur en ergostérol du diploïde est identique à celle de la souche sauvage.

DISCUSSION

Nous avons pu mettre au point une méthode de mesure "in vitro" de l'activité squalène époxydase chez la levure Saccharomyces cerevisiae, en utilisant le FPP [^{14}C] comme substrat.

Les activités spécifiques obtenues par cette méthode sont voisines de celles rapportées par Jahnke et Klein (1983), avec du squalène endogène. Notre technique est cependant plus simple que celle décrite par ces auteurs.

Comme pour l'enzyme de Candida et celle de foie de rat, l'enzyme de Saccharomyces cerevisiae exige du FAD, du NADPH ou du NADH. L'activité optimale est cependant obtenue avec le NADPH. Le NADH a par ailleurs une action inhibitrice lorsqu'il est associé au NADPH dans le milieu réactionnel. En cela, l'enzyme de S. cerevisiae ressemble plus à celle de foie de rat qu'à celle de Candida albicans, plus active avec le NADH.

L'exigence en FAD montre que la squalène époxydase de levure est une flavoprotéine, à l'instar des autres squalène époxydases. Aucune stimulation de l'activité enzymatique par le surnageant acellulaire 105 000 q n'a été observée ; ce qui démontre qu'aucune fraction soluble du type "sterol Carrier protein" (SCP) ou "Supernatant protein factor" (SPF), n'est requise pour l'enzyme de S. cerevisiae. En cela, elle diffère de celle du foie de rat et de Candida albicans, toutes deux stimulées par des facteurs solubles du surnageant acellulaire (Yamamoto et al., 1970 ; Srikantiah et al., 1976 ; Friedlander et al., 1980 ; Ryder et al., 1984).

Cette stimulation n'est cependant pas reproductible dans l'enzyme de Candida albicans.

Nos résultats concordent avec ceux de Jahnke et Klein.

Nous avons pu montrer que l'activité squalène époxydase est quasiment nulle en anaérobiose et qu'elle est rétablie par l'aération des cellules.

Le fait que cette activité soit fortement diminuée en anaérobiose (en présence d'un excès ou d'une faible concentration d'ergostérol) et qu'une synthèse protéique soit nécessaire pour la forma-

tion de l'enzyme lors de l'aération des cellules anaérobies suggère fortement que la synthèse de la squalène époxydase serait dépendante de la présence de l'oxygène moléculaire.

Nous avons montré que le squalène exogène ne peut être un substrat adéquat pour l'enzyme "in vitro" et que le FPP serait plus convenable : cette observation constitue un argument important en faveur d'un complexe entre la squalène synthétase et la squalène époxydase. Dans ce complexe protéique microsomal, seul le squalène synthétisé "in situ" pourrait être transformé en squalène époxyde.

Néanmoins, un échange devrait pouvoir exister entre deux populations de microsomes dans la mesure où le diploïde $\frac{\text{erg1} +}{+ \text{erg} 9}$ a un phénotype sauvage.

Nous avons également montré que la squalène époxyde-lanostérol cyclase est microsomale et probablement associée au même complexe.

La mesure de l'activité enzymatique dans les mutants auxotrophes pour les stérols montre que l'activité est en général déréprimée par un facteur 4 par rapport à la souche sauvage. La seule exception serait le mutant erg 16 présentant une activité squalène époxydase diminuée d'un facteur 3 par rapport à la souche sauvage.

Cette faible activité spécifique dans le mutant erg 16 n'est vraisemblablement pas due à une rétroinhibition de l'enzyme par le lanostérol accumulé, dans la mesure où nous n'avons pas pu mettre en évidence une rétro-inhibition par le lanostérol "in vitro".

La variation d'activité spécifique observée (facteur 20 entre erg 16 et erg 7 et facteur 40 entre la souche sauvage en anaéro-

biose et erg 7). serait dûe vraisemblablement à une régulation au niveau de la synthèse de l'enzyme, c'est-à-dire, au niveau transcriptionnel.

Nous avons également pu observer que les activités squalène synthétase et squalène époxydase seraient régulées d'une manière similaire c'est-à-dire que lorsque l'une des enzymes est fortement induite, l'autre l'est également.

Par contre, le lanostérol aurait un effet spécifique de répression sur la squalène époxydase.

Ces résultats, indiquant une régulation coordonnée de la synthèse de ces deux enzymes, renforcent l'hypothèse d'une association de ces 2 protéines dans un même complexe multienzymatique.

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

Le travail décrit dans ce mémoire est une contribution à l'étude des mécanismes de régulation de la biosynthèse des stérols chez la levure Saccharomyces cerevisiae.

Au moment où nous abordons cette étude, les connaissances sur cette régulation chez S. cerevisiae étaient éparses.

En vue d'y apporter de nouveaux éléments nous nous sommes inspirés des résultats obtenus antérieurement, entre autres, par Servouse et Karst (1984-1986), sur la régulation des trois premières enzymes de la voie de biosynthèse des stérols.

- Dans un premier temps nous avons mesuré le taux de stérols dans les mutants hétérozygotes afin de rechercher si une enzyme était limitante dans la voie de biosynthèse des stérols.

- Nous avons ensuite étudié l'influence de l'amplification du gène ERG 10 (acétoacétyl CoA thiolase), sur la biosynthèse des stérols.

- Nous avons également étudié une souche riche en stérols NCYC 739, ainsi que des mutants amphotéricine B résistants afin de déterminer si des souches riches en stérols pouvaient présenter un phénotype spécifique, en vue de la recherche de mutants de régulation.

- Enfin, nous avons précisé les mécanismes de régulation des deux premières enzymes spécifiques de la branche stérol de cette voie de biosynthèse : la squalène synthétase et la squalène époxydase.

La mesure du taux d'ergostérol dans les diploïdes hétéroallèles a montré que le seul diploïde, qui, significativement, a moins de stérols, que la souche sauvage est le diploïde $\frac{\text{erg } 10}{+}$

Ce résultat indique que l'acétoacétyl CoA thiolase serait limitante. Les travaux de Servouse et Karst (1986) avaient déjà montré que cette activité pourrait contrôler le flux d'acétyl CoA vers la voie de biosynthèse des stérols : l'activité est en effet dérprimée lors d'une carence en stérols (mutants auxotrophes) et réprimée en présence d'un excès de stérols.

L'isolement et l'amplification du gène ERG 10, codant pour l'activité acétoacétyl-CoA thiolase (Gloeckler 1984), a permis d'augmenter cette activité enzymatique d'un facteur 14 par rapport à la souche sauvage.

La mesure du taux d'ergostérol dans une souche porteuse de ce gène ERG 10 sur plasmide multicopie, a montré qu'une telle souche ne synthétisait pas plus d'ergostérol que la souche sauvage.

Nous avons alors essayé de mesurer la vitesse de synthèse des stérols et des composés intermédiaires grâce à l'incorporation d'acétate [^{14}C].

Aucune augmentation de la vitesse de synthèse n'a pu être mise en évidence dans le clone erg 10 transformé, par rapport à la souche sauvage.

Il faut cependant être prudent car il est possible que l'incorporation de l'acétate [^{14}C] ne soit pas un moyen idéal de mesure de la vitesse de synthèse des stérols. Ainsi, la synthèse de l'acétyl CoA, catalysée, à partir de l'acétate [^{14}C], par l'acétyl CoA thiokinase pourrait déjà être une étape limitante.

La souche NCYC 739 a été décrite dans la littérature (Mercer, 1979) comme étant riche en stérols.

En vue de déterminer un phénotype propre pour les souches à teneur élevée en stérols, nous avons testé la résistance de cette souche à la nystatine et à l'amphotéricine B. Nous avons montré que la souche était amphotéricine B résistante.

Nous avons ensuite isolé des mutants amphotéricine B résistants. Ces mutants présentaient également une teneur élevée en stérols par rapport à la souche sauvage.

Ultérieurement, A.M. Maudet (1987) a pu isoler des mutants ADH⁻, (déficients dans l'activité alcool déshydrogénase). Ces mutants présentent une teneur élevée en stérols et sont amphotéricine B résistants.

L'augmentation de la teneur en stérols de ces souches peut être attribuée à une augmentation du pool d'acétyl CoA.

La squalène synthétase et la squalène époxydase sont situées à l'embranchement des voies conduisant vers les stérols et vers les isoprénoïdes. Ce sont les premières enzymes spécifiques de la voie des stérols, de plus, elles sont les premières à synthétiser des intermédiaires hydrophobes (squalène synthétase) ou à utiliser un substrat hydrophobe (squalène époxydase).

L'étude de ces deux enzymes a montré qu'elles sont, comme la squalène époxyde-lanustérol cyclase, fortement liées à des fractions membranaires du réticulum endoplasmique.

Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les enzymes impliquées dans la biosynthèse des stérols, à partir du farnésyl pyrophosphate, sont localisées au niveau d'un site membranaire intracellulaire spécifique : le réticulum endoplasmique.

Nous avons montré que les fractions protéiques solubles du type SCP ("sterol carrier protein") ou SPF ("supernatant protein factor"), n'avaient aucun effet stimulant sur ces deux enzymes chez la levure.

L'activité squalène époxydase de S. cerevisiae n'a pu être mesurée qu'en utilisant le farnésyl pyrophosphate. Le squalène radioactif n'est pas un bon substrat de l'enzyme et de plus, le squalène froid ajouté dans un milieu d'incubation contenant du squalène [¹⁴C] comme substrat, ne conduit à aucune dilution isotopique. Tout se passe comme si le squalène n'était pas le substrat de l'enzyme.

Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que la squalène synthétase et la squalène époxydase seraient associées, au niveau du réticulum endoplasmique, dans un complexe multienzymatique. Un tel système serait comparable au complexe enzymatique catalysant la synthèse des acides gras (fatty acid synthetase). Le produit de la première réaction ne serait pas libéré dans le cytosol mais serait directement métabolisé dans le complexe par la sous-unité suivante, chaque produit étant utilisé selon un ordre pré-établi.

La mesure de l'activité spécifique des deux enzymes a révélé que l'activité squalène synthétase est 5 fois plus élevée que l'activité squalène époxydase ; ceci nous a permis d'utiliser le FPP comme substrat, pour la mesure de l'activité spécifique squalène époxydase.

Les deux enzymes exigent du NADH ou du NADPH, l'activité optimale étant obtenue avec le NADPH. Spécifiquement, la squalène époxydase exige du FAD en plus.

En anaérobiose, en présence de fortes concentrations d'ergostérol (50 mg/l) les deux activités sont diminuées respectivement d'un facteur 2 pour la squalène synthétase et d'un facteur 10 pour la squalène époxydase.

Une faible supplémentation en ergostérol (2 mg/l) ramène la squalène synthétase à son niveau normal, tandis que la squalène

époxydase reste maintenue à un niveau très faible (facteur 6 à 7 par rapport aux conditions aérobies).

Nos résultats montrent bien que le taux intracellulaire de stérols pourrait réguler la squalène synthétase. La particularité de la squalène époxydase est que sa synthèse serait induite par l'oxygène et réprimée en carence d'oxygène, ce que nous avons démontré dans le chapitre VI.

Les activités spécifiques des deux enzymes sont fortement dérèprimées (facteur 1,5 à 5), dans la plupart des mutants auxotrophes pour l'ergostérol.

Pour la squalène synthétase, les mutants bloqués avant la synthèse du mévalonate présentent la plus forte dérèpression (erg 10 et erg. 11).

Par contre, l'activité enzymatique est légèrement diminuée dans le mutant erg 12 bloqué dans la mévalonate kinase et qui, logiquement, accumulerait du mévalonate. Ceci nous a conduit à faire l'hypothèse que la teneur intra-cellulaire en mévalonate pourrait réguler la synthèse de la squalène synthétase : à faible concentration en mévalonate, l'enzyme serait induite (erg 10 et erg 11), et à forte concentration en mévalonate, l'enzyme serait réprimée (erg. 12). Dans le cas du clone erg 12 pl A01, présentant une activité spécifique mévalonate kinase augmentée d'un facteur 15 par rapport à la souche sauvage, l'activité squalène synthétase est augmentée d'un facteur 3 par rapport à la souche mutante erg 12.

Ce résultat confirme l'influence du mévalonate sur la squalène synthétase. L'intérêt physiologique d'une telle régulation serait d'éviter la formation de fortes concentrations de stérols, en cas d'accumulation de mévalonate.

Dans le cas de la squalène époxydase, le mutant erg 7, bloqué dans l'activité squalène 2-3 époxyde-lanostérol cyclase, présente la plus forte dérégulation (facteur 5), les autres mutants présentant une dérégulation d'un facteur 4 environ. A l'opposé, dans le mutant erg 16, l'activité n'est pas dérégulée mais diminuée d'un facteur 3 par rapport à la souche sauvage. Ce niveau faible d'activité permet d'expliquer pourquoi les mutants bloqués dans les étapes de déméthylation du lanostérol (erg 16 et mutants porphyrine⁻) accumulent du squalène en plus du lanostérol.

Nous avons pu montrer que le lanostérol ne rétroinhibait pas la squalène époxydase "in vitro" ce qui tend à prouver que l'accumulation de lanostérol réprimerait la synthèse de l'enzyme. Cette régulation pourrait être importante dans le fonctionnement cellulaire car les triterpènes sont incompatibles avec le fonctionnement membranaire.

Le fait que le mutant erg 18 (bloqué dans l'activité squalène époxydase), ait une activité squalène synthétase identique à celle de la souche sauvage montre que le squalène accumulé ne réprime pas la synthèse de la squalène synthétase. Cette accumulation de squalène suggère fortement que les voies de biosynthèse des isoprénoides (dolichol, ubiquinones) n'entrent pas en compétition de façon significative avec celle des stérols chez la levure.

L'isolement de mutants bloqués dans la synthèse des isoprénoides permettrait de clarifier l'éventuelle inter-relation entre les deux voies. Un élément de réponse est apporté par la mesure des activités spécifiques des enzymes de la voie de biosynthèse, résumée dans le tableau 34.

| Souches | Acétoacétyl CoA thiolase | HMG-CoA synthétase | HMG-CoA réductase | Squalène synthétase | Squalène époxydase |
|----------|-----------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| Erg 10 B | 0 | 22 ± 2 | 10 ± 0,1 | 2,25 ± 0,067 | 0,41 ± 0,05 |
| Erg 11 | 322 ± 42 | 0 | 8,2 ± 1,3 | 1,97 ± 0,07 | 0,46 ± 0,04 |
| Erg 12 | 294 ± 56 | 33 ± 11 | 4,4 ± 1,4 | 0,36 ± 0,04 | 0,24 ± 0,02 |
| Erg 8 | 336 ± 42 | 48 ± 6 | 5,5 ± 1,6 | 1,11 ± 0,18 | 0,48 ± 0,06 |
| Erg 19 | ND | ND | ND | 1,44 ± 0,09 | 0,43 ± 0,08 |
| Erg 9 | 126 ± 28 | 20 ± 4 | 4,4 ± 1,6 | 0 | ND |
| Erg 18 | ND | ND | ND | 0,44 ± 0,05 | 0 |
| Erg 1 | 252 ± 51 | 35 ± 9 | 5,0 ± 1,1 | ND | ND |
| Erg 7 | 238 ± 14 | 20 ± 4 | 5,0 ± 1,4 | 0,60 ± 0,01 | 0,54 ± 0,03 |
| Erg 16 | 336 ± 14 | 48 ± 2 | 6,0 ± 0,1 | 0,76 ± 0,02 | 0,029 ± 0,08 |
| FL100 | 140 ± 20 | 22 ± 6 | 5,5 ± 1,4 | 0,47 ± 0,02 | 0,10 ± 0,02 |

Tableau 34 : Activités spécifiques comparées des enzymes mesurées dans les mutants auxotrophes pour l'ergostérol et la souche sauvage FL100.

Les activités sont exprimées en nmoles/mg protéines/min.

Les mutants bloqués avant la synthèse du FPP sont incapables de synthétiser des stérols et les isoprénoides. Ces mutants présentent effectivement une forte activité spécifique acétoacétyl CoA thiolase et HMG CoA synthétase ; mais, des mutants, comme erg 16, bloqués en fin de chaîne, peuvent également présenter une forte dérégulation de ces activités enzymatiques. Ceci tendrait à démontrer que le dolichol et l'ubiquinone, synthétisés à l'état de traces, n'auraient aucune influence sur le taux des enzymes.

L'ensemble de nos travaux ainsi que ceux réalisés antérieurement par Trocha et al., 1976 et Servouse et Karst en 1986 sur la régulation des 3 premières étapes enzymatiques de la voie, permettent de penser que les mécanismes de régulation de cette voie sont très complexes.

Trocha et Sprinson ainsi que Servouse et Karst ont envisagé qu'une régulation importante pourrait déjà avoir lieu en début de chaîne (acétoacétyl CoA thiolase). D'autres travaux rapportent que l'HMG CoA réductase serait régulée vraisemblablement par feedback. Il est cependant clair, grâce à nos travaux, qu'en ce qui concerne la synthèse des stérols, la squalène synthétase et la squalène époxydase auraient également un rôle important. En effet, si l'on considère la voie des stérols, on constate qu'il y a en permanence un pool de squalène plus ou moins important, alors que les autres intermédiaires comme le GPP ou le FPP sont difficiles à mettre en évidence. La squalène synthétase et la squalène époxydase sont vraisemblablement soumises à une régulation transcriptionnelle, en fonction des besoins en stérols de la cellule.

Nous avons montré que l'utilisation du FPP comme substrat conduit essentiellement à la synthèse du lanostérol. Ceci nous a permis de penser qu'il y a une canalisation du substrat à l'intérieur du complexe multienzymatique. En vue de comprendre ce "channeling" au niveau du complexe multi-enzymatique, il serait intéressant d'étu-

dier la formation et la structure de ce complexe (squalène synthétase, squalène époxydase, squalène époxyde lanostérol cyclase).

Par ailleurs, l'étude des autres enzymes de la voie de biosynthèse des stérols permettra de compléter nos résultats et mieux préciser encore, les mécanismes de régulation de la biosynthèse des stérols chez la levure *S. cerevisiae*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADAMS B.G. and PARKS L.W. 1967

Evidence for dual physiological forms of ergosterol in Saccharomyces cerevisiae. J. Cell physiol. 70, 161-168.

AGNEW W.S. and POPJAK G. 1978 (a)

Stoichiometry and Kinetics of presqualene pyrophosphate and squalene synthesis by yeast microsomes. J. Biol. chem. 253, 4566-4573.

AGRANOFF B.W., EGGERER H., HENNING U. and LYNEN F. 1960

Biosynthesis of terpenes VII. Isopentenyl pyrophosphate isomerase. J. Biol. chem. 235, 326-332.

ALTMAN L.J., KOWERSKI R.C. and RILLING H.C. 1971

Synthesis and Conversion of presqualene alcohol to squalene J. Amer. Chem. Soc. 93, 1792-1783.

ALTMAN L.J., ASH L. and KOWERSKI R.C. 1972

Prephytoene pyrophosphate, a new intermediate in the biosynthesis of carotenoids. J. Amer. Chem. Soc. 94, 3257-3259.

ANDREASON A.A. and STIER T.J.B. 1953 (a)

Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae I. Ergosterol requiring for growth in a defined medium. J. Cellular Comp. physiol. 41, 23-26.

ANDREASON A.A. and STIER T.J.B. 1953 (b)

Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. J. Cellular Comp. physiol. 43, 271-282.

AOYAMA Y. YOSHIDA Y., SATO R. 1984

Yeast cytochrome P. 450 catalysing lanosterol 14 α demethylation II - Lanosterol metabolism by purified P 450 14 DM and by intact microsomes. J. Biol. Chem. 259, 1661-1666.

ARCHER D.B. 1976

Effect of the lipid composition of Mycoplasma mycoides subspecies capri and phosphatidylcholin vesicles upon action of polyene antibiotics. Biochem Biophys. Acta 436, 68-76.

BAILEY R.B. and PARKS L.W. 1974

Yeast sterols esters and their relationship to the growth of yeast. J. Bacteriol. 124, 606-612.

BARION D.H.R., DAVIES P.J., KEMPE U.M., Mc GARRITY J.F. and WIDDOWSON D.A. 1972.

Biosynthesis of terpenes and Steroids Part VIII. The synthesis and metabolism in Saccharomyces cerevisiae of Ergosta 7, 22, 24 (28) trien 3 β -ol. J. Chem. Soc. Perkin trans I, 1231-1233.

BARION D.H.R., CORRIE J.E.I., MARSHALL P.J. and WIDDOWSON D.A. 1973

Biosynthesis of terpenes and Steroids VII Unified scheme for the biosynthesis of ergosterol in Saccharomyces cerevisiae. Biorg. chem. 2, 363-373.

BENVENISTE P., HIRTH L. et CURISSON G. 1966

La biosynthèse des stérols dans les tissus de tabac cultivés "in vitro" II. Particularités de la biosynthèse des phytostérols des tissus de tabac cultivés "in vitro". Phytochem. 5, 45-58.

BENVENISIE P., OURISSON G. et HIRIH L. 1970

Biosynthèse du squalène dans un système acellulaire obtenu à partir de tissus de tabac cultivés "in vitro". Phytochem. 9, 1073-1082.

BEYTIA E., QURESHI A.A. and PORTER J. 1973

Squalène Synthetase

III - Mechanism of the reaction. J. Biol. chem. 248, 1856-1867

BLOCH K. and RIITENBERG D. 1942 (a)

J. Biol. chem. 143, 297.

BLOCH K. and RTTENBERG D. 1942 (b)

J. Biol. chem. 145, 625.

BLOCH K., CHAYKIN S., PHILLIPS A.H. and DE WAARD A. 1959

J. Biol. Chem. 234, 2595.

BLOCH K. and COREY E. 1967

A soluble 2-3 oxidosqualene sterol cyclase. J. Biol. chem. 242, 3014.

BOLL M., LOWEN M., STILL J. and BERNDT J. 1975.

Sterol biosynthesis in yeast :
3 Hydroxy -3- methyl - glutaryl coenzyme A reductase as a
regulatory enzyme. Eur. J. Biochem. 54, 435-444.

BREIVIK O.N. and OWADES J.L. 1956

Spectrophotometric semi microdetermination of ergosterol in
yeast. Agr. Food. chem. 5, 360-363.

BROWN M.S. and GOLDSTEIN J.L. 1980

Multivalent feed-back regulation of HMG CoA reductase, a
control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth.
J. Lipid. Res. 21, 505-517.

CHANG T.Y. and LIMANEK J.S. 1980

Regulation of Cytosolic acetoacetyl CoA thiolase, 3-Hydroxy-
3-methylglutaryl CoA synthase, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase
and Mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25-Hydroxy
cholesterol in chinese ovary cells. J. Biol. chem. 255, 7787-7795.

CHIN J., and BLOCH K. 1984

Role of supernatant protein factor and anionic phospholipid
in squalene uptake and conversion by microsomes. J. Biol. chem. 259,
11735-11738.

CLAYTON R.B., NELSON A.N. and FRANTZ ID. 1965

The skin sterols of normal and triparanol treated
J. lipid. Res. 4, 166-170.

COREY E.J., RUSSEY W.E. and ORTIZ DE MONTELLANO P.R. 1966

2-3 oxidosqualene, an intermediate in the biological synthesis
of sterols from squalene.
J. Amer. chem. Soc. 88, 4750-4751.

COREY E.J. and GROS S.K. 1967

Formation of sterols by the action of 2-3 oxidosqualene-sterol cyclase on the factitious substrates 2,3, 22, 23 dioxidosqualene and 2,3 oxido 22-23 dihydrosqualene.

J. Amer. chem. Soc. 89, 4561-4562.

COREY E.J. and VOLANTE R.P. 1976

Application of unreactive analogs of terpenoid pyrophosphates to studies of multistep biosynthesis : Demonstration that "presqualene pyrophosphate" is an essential intermediate on the path to squalene.

J. Amer. chem. Soc. 98, 1291-1293.

CORNFORTH J.W. and POPJAK G. 1966

Substrate stereochemistry in squalene biosynthesis

Biochim. Biophys. Acta 101, 553-568.

DAHL C., BIEMANN H.P. and DAHL J. 1987

A protein kinase antigenically related to pp 60^{v-Src} possibly involved in yeast cell cycle control : Positive in vivo regulation by sterol.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4012-4016.

DEAN P.D.G., ORTIZ DE MONTELLANO P.R., BLOCH K. and COREY E.J., 1967

A soluble 2-3 oxidosqualene sterol cyclase

J. Biol. chem. 242, 3014-3015.

DASTOLI F.R. and PRICE 1967

Further studies on xanthine oxidase in non polar media.

Arch. Biochem. and Biophys. 122, 289-291.

DE GIER J., MANDERSLOOT J.G., VAN DEENEN L.L.M. 1968

Lipid composition and permeability of Liposomes

Biochim. Biophys. Acta 150, 666-675.

DE KRUIJFF B., GERRITSEN W.J., OERLEMANS A., DEMEL L.A. and VAN DEENEN L.L.M. 1974

Polyene antibiotic sterol interactions in membranes of Acholeplasma laidlawii cells and lecithin liposomes I. Specificity of the membranes permeability changes induced by the polyene antibiotics.

Biochim. Biophys. Acta 339, 30-43.

DE KRUIJFF B., GERRITSEN W.J., OERLEMANS A., VAN DIJCK P.W.M., DEMEL R.A. and VAN DEENEN L.L.M. 1974

Polyene antibiotic sterol interactions in membranes of Acholeplasma laidlawii cells and lecithin liposomes II. Temperature dependence of the polyene antibiotic sterol complex formation.

Biochim. Biophys. Acta 339, 44-56.

DE KRUIJFF B. and DEMEL R.A. 1974

Polyene antibiotic sterol interactions in membranes of Acholeplasma laidlawii cells and lecithin liposomes III. Molecular structure of the polyene antibiotic cholesterol complexes.

Biochim. Biophys. Acta 339, 57-61.

DE MEL R.A. and DE KRUIJFF B. 1976

The function of sterols in membranes

Biochim. Biophys. Acta 457, 109-132.

DEQUIN S. 1986

Etude du gène *erg 10*, codant pour l'acétoacétyl CoA thiolase chez Saccharomyces uvarum.

Thèse de Doctorat, Université de Nancy I.

DURR I.F. and RUDNEY H. 1960

The reduction of β -hydroxy β -methylglutaryl Coenzyme A to mevalonic acid.

J. Biol. chem. 235, 2572-2578.

- EBERHARDT N.L. and RILLING H.C. 1975
Prenyltransferase from Saccharomyces cerevisiae
Purification to Homogeneity and molecular properties
J. Biol. Chem. 250, 863-866.
- EILENBERG H. and SCHECHTER I. 1984
A possible regulatory role of Squalene epoxidase in chinese
Hamster ovary cells.
Lipids 19 (7), 539-543
- EPSTEIN W.W. and RILLING H.C. 1970
Studies on the mechanism of Squalene biosynthesis ; the struc-
ture of presqualene pyrophosphate.
J. Biol. Chem. 245, 4597-4605.
- ESTABROOK R.W., HILDEBRANDT A.G., BARON J., NETTER K.J. and LETBMAN
K. 1971
A new spectral intermediate associated with cytochrome P-450
function in liver microsomes.
Biochem. Biophys. Research. Comm. 42, 132-139.
- FAUST J.R., GOLDSTEIN J.L. and BROWN M.S. 1979
Squalene Synthetase activity in Human fibroblasts : Regula-
tion via the low density lipoprotein receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5018-5022.
- FAUST J.R., GOLDSTEIN J.L. and BROWN M.S. 1979
Synthesis of ubiquinone and cholesterol in human fibroblasts :
Regulation of a branched pathway.
Arch. Biochem. Biophys. 192, 86-89.
- FERGUSON J.B. and BLOCH K. 1977
Purification and properties of a soluble protein activator of
rat liver Squalene epoxidase
J. Biol. chem. 252, 5381-5385.

FRYBERG M., OESCHLAGER A.C. and UNRAU A.M. 1972

Biosynthetic routes to ergosterol in yeast.
Biochem. Biophys. Research Comm. 48, 593-597.

FRYBERG M. OESCHLAGER A.C. and UNRAU A.M. 1973

Biosynthesis of ergosterol in yeast. Evidence for multiple pathways.
J. Amer. chem. Soc. 95, 5747-5757.

FRIEDLANDER E.J., CARAS I.W., LIN t.F.H. and BLOCH K. 1980

Supernatant protein factor facilitates intermembrane transfer of Squalene.
J. Biol. chem. 255, 8042-8045.

GAVEY K.L. and SCALLEN T.J. 1978

Non participation of 105000 g liver supernatant or Sterol carrier protein in the enzymatic conversion of farnesyl pyrophosphate to Squalene by rat liver microsomes.
J. Biol. chem. 253, 5470-5475.

GIBBONS G.F., GOAD L.J., GOODWIN T.W. and NES W.R. 1971

Concerning the role of lanosterol and cycloartenol in steroids biosynthesis.
J. Biol. chem. 246, 3967-3976.

GLOECKLER R. 1984

Contribution à la génétique moléculaire des souches de brasserie : clonage du gène ERG 10.
Thèse Doctorat Université de Nancy I.

GUILLERMOND A. 1902

Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences PARIS.

HATA S., NISHINO T., ARIGA N. and KATSUKI H. 1982

Effect of detergents on sterol biosynthesis in a cell-free system of yeast.
J. lipids Res. 23, 803-810.

- HATANAKA H., KAWAGUCHI A., HAYAKAWA S. and KATSUKI H. 1972
Structural specificity of bile acid for inhibition of sterol synthesis in cell-free extracts of yeast.
Biochim. Biophys. Acta 270, 397-406.
- HENRY S.A. 1982
Membrane lipids of yeast : Biochemical and Genetic studies.
The molecular biology of the yeast *Saccharomyces* : Metabolism and Gene expression , 101-158.
- HOSONO K. and AIDA K. 1974
Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* defective in mitochondria due to pantothenic acid deficiency
J. gen. Appl. Microbiol. 20, 47-58.
- JAHNKE L. and KLEIN H.P. 1983
Oxygen requirements for formation and activity of the squalene epoxidase in *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Bacteriol. 155, 488-492.
- JAMES M.J. and KANDUTSCH A.A. 1979
Inter-relationship between dolichol and sterol synthesis in mammalian cell cultures.
J. Biol. Chem. 254, 8442-8446.
- JARMAN T.R., GUNATILAKA A.A.L. and WIDDOWSON D.A. 1975
Bioorg. chem. 4, 202-211.
- KARST F. and LACROUTE F. 1973
Isolation of pleiotropic yeast mutants requiring ergosterol for growth.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 741-747.
- KARST F. and LACROUTE F. 1974
Yeast mutant requiring only a sterol as growth supplement.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 370-376.
- KARST F. and LACROUTE F. 1977
Ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*
Mutants deficient in the early steps on the pathway
Molec. Gen. Genet. 154, 269-277.

KARST F. 1978

Isolément et caractérisation de mutants auxotrophes pour l'ergostérol chez la levure Saccharomyces cerevisiae.

Thèse de Doctorat d'Etat, Université Louis Pasteur, Strasbourg.

KAWAGUCHI A., HATANAKA H. and KATSUKI H. 1968

Control of ergosterol biosynthesis in yeast.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 463-468.

KAWAGUCHI A. 1970

Control of ergosterol biosynthesis in yeast

J. Biochem. (Tokyo) 67, 219-227.

KLEIN H.P., EATON N.R. and MURPHY J.C. 1954

Net Synthesis of sterols in resting cells of Saccharomyces cerevisiae.

Biochim. Biophys. Acta 13, 591-600.

KORNBLATT J.A. and RUDNEY H. 1971

Two forms of Acetoacetyl CoA thiolase in yeast

II. Intracellular location and relationship to growth

J. Biol. chem. 246, 4424.

KUSWIK - RABIEGA G. and RILLING H.C. 1987

Squalene Synthetase.

Solubilization and partial purification of squalene synthetase, copurification of presqualene pyrophosphate and squalene synthetase activities.

J. Biol. Chem. 262, 1505-1509.

LANGDON R.G. and BLOCH K. 1953 (a)

The biosynthesis of Squalene

J. Biol. Chem. 200, 129-134.

LANGDON R.G. and BLOCH K. 1953 (b)

The utilization of Squalene in the biosynthesis of cholesterol.

J. Biol. chem. 200, 135-143.

LYNEN F., EGGERER H., HENNING U. and KESSEL I. 1958

Farnesyl - Pyrophosphat und 3- Methyl - Δ^3 - butenyl - 1 -
pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens.

(Zur biosynthese der terpene, III)

Angew. chem. 70, 738-742.

MASON H.S. 1965

Oxidases : Microsomal mixed - function oxidases

Ann. Rev. Biochem. 34, 595-634.

MAUDEI A. M. 1987

Isolément et étude de mutants de Saccharomyces cerevisiae
bloqués dans l'activité alcool déshydrogénase : Influence sur la bio-
synthèse des stérols.

Mémoire de DEA Université de Poitiers.

MBAYA B. 1983

Etude des mécanismes de régulation de la biosynthèse de l'er-
gostérol. - Isolément de mutants amphotéricine B résistants.

Mémoire de DEA de biologie cellulaire et moléculaire Université
de Poitiers.

MBAYA B. and KARSI F. 1987

In vitro assay of squalene epoxidase of Saccharomyces cerevisiae
Biochem. Biophys. Res. Commun. 147, 556-564.

MERCER E.IK, BALOCH R.I., WIGGINS I.E. and BALDWIN B.C. 1984

Inhibition of ergosterol biosynthesis in Saccharomyces cere-
visiae and Ustilago maydis by tridemorph, Fenpropimorph and Fenpropidin.

Phytochem. 23, 2219-2226.

MONS N. 1984

Isolément et caractérisation de mutants auxotrophes pour l'er-
gostérol chez la levure Saccharomyces cerevisiae.

Thèse de Doctorat de 3e cycle, Université de Poitiers, UER
Sciences Fondamentales et Appliquées.

MOORE J.T. and GAYLOR J.L. 1969

Isolation and purification of an S adenosyl methionine : Δ 24 sterol methyltransferase from yeast.

J. Biol. chem. 244, 6334-6340.

MOORE J.T. and GAYLOR J.L. 1970

Investigation of an S. adenosyl methionine : Δ 24 sterol methyltransferase in ergosterol biosynthesis in yeast.

J. Biol. Chem. 245, 4684-4688.

MOPURGO G., SERPULI-CRESCENZI G., TECCE E., VALENTE F. and VENETACCI D. 1964.

Influence of ergosterol on the physiology and the ultrastructure of Saccharomyces cerevisiae.

Nature (London), 24, 897-899.

NEAL W.D. and PARKS L.A. 1977

Sterol 24 (28) methylene reductase in Saccharomyces cerevisiae.

J. Bacteriol., 129, 1375-1378.

NES W.R. 1974

Role of sterols in membranes

Lipids 9, 596-612

NES W.R. 1977

The biochemistry of plant sterols

Adv. Lipids. res. 15, 233-324.

NES W.R., SEKULA B.C., NES W.D. and ADLER J.H. 1978

The functional importance of structural features of ergosterol in yeast.

J. Biol. chem. 253, 6218-6225.

NISHINO T., HATA S., OSUMI T. and KATSUKI H. 1980

Biosynthesis of ergosterol in cell-free system of yeast.

J. Biochem. (Japan) 88, 247-254.

NISHINO T., HATA S., TAKETANI S., YABUSAKI Y. and KATSUKI H. 1981

Subcellular localization of the enzymes involved in the late stage of ergosterol biosynthesis in yeast.

J. Biochem (Japan) 89, 1391-1396.

ONO T. and BLOCH K. 1975

Solubilization and partial characterisation of rat liver squalene epoxidase.

J. Biol. chem. 250, 1571-1579.

ONO T., OZASA S., HASEGAWA F. and IMAI Y. 1977

Involvement of NADPH-Cytochrome c reductase in the rat liver squalene epoxidase system.

Biochim. Biophys. Acta 486, 401-407.

ONO T., TAKAHASHI K., ODANI H., KONNO H. and IMAI Y. 1980

Purification of squalene epoxidase from rat liver microsomes

Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 522-528.

OSUMI T., TAKETANI S., KATSUKI H., KUHARA T. and MATSUMOTO I. 1978

Ergosterol biosynthesis in yeast.

Pathways in the late stages and their variation under various conditions.

J. Biochem. (Japan) 83, 681-691.

OSUMI T., NISHINO T. and KATSUKI H. 1979.

Studies on the Δ^5 -Desaturation in ergosterol biosynthesis in yeast.

J. Biochem (Japan) 85, 819-826.

OURISSON G., ALBRECHT P. and ROHMER M. 1979

Pure appl. chem. 51, 709.

PALTAUF F. , DAUM G., ZUDER G., HÖGENAUER G., SCHOLZ G. and SEIDL G. 1982

Squalene and ergosterol biosynthesis in fungi treated with naftifine, a new antimycotic agent.

Biochim. Biophys. Acta 712, 268-273.

PARKS L.W., Mc LEAN BOWEN C., TAYLOR F.R. and HOUGH S. 1978

Sterols in yeast subcellular fractions

Lipids 13, 730-735.

PARKS L.W., Mc LEAN BOWEN C., BOTTEMA K., TAYLOR F.R., GONZALES R.,
JENSEN B.W. and RAMP J.R. 1982

Aspects of sterol metabolism in the yeast Saccharomyces cere-
visiae and in phytophthora.

Lipids 17, 187-196.

PINTO J.W. and NES W.R. 1983

Stereochemical specificity for sterols in Saccharomyces cere-
visiae

J. Biol. chem. 258, 4472-4476.

PINTO J.W., LOZANO R., SEKUI A B.C. and NES W.R. 1983

Stereochemically distinct roles for sterols in Saccharomyces
cerevisiae.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 112, 47-54.

PINTO J.W., LOZANO R. and NES W.R. 1985

Inhibition of Sterol biosynthesis by ergosterol and cholesterol
in Saccharomyces cerevisiae.

Biochim. Biophys. Acta, 836, 89-95.

PLIENINGER H. and IMMEL H. 1965

Die Darstellung von reinem ~~XX~~dimethylallyl pyrophosphate nach
dem verfahren von F. Cramer.

Chem. Ber., 98, 414-418.

POPJAK G. and CORNFORTH J.W. 1966

Substrate stereochemistry in squalene biosynthesis.

Biochim. Biophys. Acta : 101, 553-568.

POPJAK G., 1969

Enzymes of sterols biosynthesis in liver and intermediates of sterols biosynthesis.

In : J.S.P. Colowick and N.O. KAPLAN (ed.). Methods in enzymology Vol. XV, Steroids and terpenoids. Academic Press, Inc. New York, p. 445.

POPJAK G. and AGNEW W.S. 1979

Squalene synthetase

Mol. Cell. Biochem. 27, 97-116.

PORALLA K. and KANNENBERG E. 1987

Hopanoids : Sterols equivalents in bacteria

Am. Chem. Soc. 239-251.

QURESHI A.A., BEYTIA E. and PORTER J. 1973

Squalene Synthetase

II - Purification and properties of baker's yeast

J. Biol. chem. 248, 1848-1855.

RABINOWITZ J.L. and GURIN S. 1954

Ibid. 208, 307.

RAULSTON D.L., MILLER L.R. and SCHOEPFER G.J. 1980

Cycloheximide inhibits sterol biosynthesis in cell-free preparation of rat liver

J. Biol. chem. : 255, 4706-4709.

REES H., GOAD L.J. and GOODWIN T.W. 1968

Studies in Phytosterol biosynthesis

Mechanism of biosynthesis of cycloartenol

Biochem. J. 107, 417-426.

RICHARD L. 1986

Isolement et étude de la structure du gène codant pour la squalène synthétase chez la levure Saccharomyces cerevisiae.

Mémoire Diplôme d'ingénieur C.N.A.M. en Biologie industrielle et agro-alimentaire.

CNAM - Centre Régional POITOU-CHARENTES.

RILLING H.C. 1966

A new intermediate in the biosynthesis of squalene
J. Biol. chem. 241, 3233-3246.

RILLING H.C., POULTER C.D., EPSTEIN W.W. and BRENT L. 1971

Studies on the mechanism of squalene biosynthesis.
Presqualene pyrophosphate, stereochemistry and a mechanism for
its conversion to squalene
J. Amer. chem. soc. 93, 1783-1785.

RILLING H.C. 1972

The effect of sterol carrier protein on squalene synthesis
Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 470-475.

RINE J. BASSON M.E. and THORSNESS M. 1986

Saccharomyces cerevisiae contains two functional genes encoding
3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A. reductase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5563-5567.

RODWELL V.W., Mc NAMARA D.J. and SHAPIRO D.J. 1973

Regulation of Hepatic 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A
reductase
Adv. Enzymol. 38, 373-412.

ROTHBLAT G.H., MARTAK D.S. and KRITCHEWSKY D. 1962

A quantitative colorimetric assay for Squalene
Anal. Biochem. 4, 52-56.

RUDNEY H., SEXTON R.C., GUPTA A.K., and PANINI S.R. 1987

Regulation of Isoprenoid biosynthesis : Oxygenated sterols
as modulators of HMG CoA reductase activity
Chem. Script. 27, 57-62.

RYDER N.S. and DUPONT M.C. 1984

Properties of a particulate squalene epoxidase from Candida
albicans
Biochim. Biophys. Acta 794, 466-471.

SAAT Y.A. and BLOCH K. 1976

Effect of a supernatant protein on microsomal squalene epoxi-
dase and 2, 3-oxidosqualene-lanosterol cyclase
J. Biol. Chem. 251, 5155-5160

SCHECHTER I., SWEAT F.W., and BLOCH K. 1970

Comparative properties of 2, 3-oxidosqualene-lanosterol cyclase from yeast and liver.

Biochim. Biophys. Acta 220, 463-468.

SCHECHTER I. and BLOCH K. 1971

Solubilization and purification of trans-farnesyl pyrophosphate squalene synthetase.

J. Biol. chem. 246, 7690-7696.

SCHUTZ G. and FEIGELSON P. 1972

Purification and properties of rat liver tryptophan oxygenase

J. Biol. Chem. 247, 5327-5332.

SERVOUSE M., MONS N., BAILLARGEAT J.L. and KARST F. 1984

Isolation and characterization of yeast mutants blocked in mevalonic acid formation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 123, 424-430.

SERVOUSE M. and KARST F. 1986

Regulation of early enzymes of ergosterol biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae.

Biochem. J. 240, 541-547.

SHAW W.H.C. and JEFFERIES J.B. 1953

The determination of ergosterol in yeast. I : The ultraviolet absorption of purified ergosterol.

Analyst. 7B, 509-528.

SHIMIZU I., NAGAI J., HATANAKA H. and KATSUKI H. 1973

Mevalonate synthesis in the mitochondria of yeast.

Biochim. Biophys. Acta 296, 310-320.

SIH C.J. 1969

Enzymatic mechanism of steroid hydroxylation

Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate serves two distinct roles in hydroxylation

Science 1297-1300.

SRIKANTIAH M.V., HANSBURY E., LOUGHRAN E.D. and SCALLEN T.J. 1976
Purification and properties of sterol carrier protein
J. Biol. Chem. 251, 5496-5504

STARR P.R. and PARKS L.W. 1962 b
Some factors affecting sterol formation in Saccharomyces cerevisiae
J. Bacteriol. 83, 1042-1046.

TAI H.H. and BLOCH K. 1972
Squalene epoxidase of rat liver
J. Biol. chem. 247, 3767-3773.

TAKETANI S., OSUMI, KATSUKI H. 1978
Characterization of sterol - ester hydrolase in Saccharomyces cerevisiae
Biochim. Biophys. Acta 525, 87-92.

TAVORMINA P.A., GIBBS M.H. and HUFF J.W. 1956
The utilization of β - hydroxy - β - methyl δ valerolactone
in cholesterol biosynthesis.
J. Amer. Chemic. Soc. 78, 4498-4501.

TAYLOR F.R. and PARKS L.W. 1978
Metabolic interconversion of free sterols and steryl esters
in Saccharomyces cerevisiae.
J. Bacteriol. 136, 531-537.

TAYLOR F.R., RODRIGUEZ R.J. and PARKS L.W. 1983
Requirement for a second sterol biosynthetic Mutation for
viability of a sterol C-14 demethylation defect in Saccharomyces cere-
visiae.
J. Bacteriol. 155, 64-68.

TCHEN T.T. and BLOCH K. 1957 (a)

On the conversion of squalene to lanosterol "in vitro"
J. Biol. Chem. 253, 921-930.

TCHEN T.T. and BLOCH K. 1957 (b)

On the mechanism of enzymatic cyclization of squalene.
J. Biol. Chem. 253, 931-939.

TCHEN T.T. 1958

Mevalonic kinase purification and properties
J. Biol. Chem. 233, 1100-1103.

TEERLINK T., DE KRUIJFF B. and DEMEL R.A. 1980

The action of pimaricin, etruscomycin and amphotericin
B on liposomes with varying sterol content.
Biochem. Biophys. Acta 599, 484-492.

THOMPSON E.D. and PARKS L.W. 1974

The effect of altered sterol composition on cytochrome oxidase
and S-adenosyl methionine : Δ^{24} sterol methyltransferase enzyme of yeast
mitochondria.

Biochim. Biophys. Res. Commun. 57, 1207-1213.

TROCHA P.J. and SPRINSON D.B. 1976

Location and regulation of early enzymes of sterol biosynthesis
in yeast

Arch. Biochem. Biophys. 174, 45-51.

TRZASKOS J.M., BOWEN W.D., SHAFTEE A., FISCHER R.T. and GAYLOR J.L. 1984

Cytochrome P 450 dependent oxidation of lanosterol in choles-
terol biosynthesis.

Microsomal electron transport and C₃₂ demethylation.
J. Biol. Chem. 259, 13402-13412.

VAN TAMELEN E.E. and CURPHEY T.J. 1962

The selective "in vitro" oxidation of the terminal double bonds in squalene.

Tetrahedron letters 3, 121-124.

VAN TAMELEN E.E., WILLET J.D., CLAYTON R.B. and LORD K.E. 1966

Enzymatic conversion of squalene 2-3 oxide to lanosterol and cholesterol

J. Amer. Chem. Soc. 88, 4752-4754.

VERTUT-CROQUIN A., BOLARD J., CHABBERT M. and GARRY BOBO C. 1983

Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol and ergosterol containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study.

Biochem. 22, 2939-2944.

WARBURG G.F., WAKEEL M. and WILTON D.C. 1982

The role of squalene synthetase in the inhibition by cholesterol of tetrahymenol biosynthesis in Tetrahymena pyriformis.

Lipids 17, 230-234.

WILLET J.D., SHARPLESS K.B., LORD K.E., VAN TAMELEN E.E. and CLAYTON R.B. 1967.

Squalene 2-3 oxide, an intermediate in the enzymatic conversion of squalene to lanosterol and cholesterol

J. Biol. Chem. 242, 4182-4191

WOODS R.A. 1971

Nystatin resistant mutants of yeast : alterations in sterol content.

J. Bacteriol. 108, 69-73.

WOODWARD R.B. and BLOCH K. 1953

The cyclization of squalene in cholesterol synthesis

J. Amer. Chem. Soc. 75, 2023-2024.

YAMAMOTO S. and BLOCH K. 1970

Studies on Squalene epoxidase of rat liver.

J. Biol. Chem. 245, 1670-1674.

RESUME

Au cours du cycle cellulaire de Saccharomyces cerevisiae, la synthèse des stérols et leur teneur intracellulaire sont soumises à une régulation dont les mécanismes sont très complexes. Afin de les préciser, plusieurs approches ont été abordées.

Nous avons mesuré le taux d'ergostérol dans des diploïdes hétérozygotes porteurs de mutations d'auxotrophie pour l'ergostérol, ce qui nous a permis de mettre en évidence un abaissement de la teneur en ergostérol dans un diploïde ne portant qu'un seul allèle fonctionnel pour l'acétoacétyl-CoA thiolase. Néanmoins l'augmentation de l'activité spécifique Acétoacétyl-CoA thiolase, obtenue par amplification génique, ne conduit pas à une augmentation du taux d'ergostérol. Par ailleurs, nous avons pu montrer qu'une élévation de la teneur en ergostérol était corrélée à une augmentation de la résistance des cellules de levure à l'amphotéricine B.

Nous avons ensuite mesuré les activités spécifiques squalène synthétase et squalène époxydase, premières étapes spécifiques de la branche « stérol » de la voie de biosynthèse, dans des extraits acellulaires de la souche sauvage et de mutants auxotrophes. Les deux enzymes sont liées, comme la squalène époxyde-lanostérol cyclase, au réticulum endoplasmique. Aucune fraction soluble n'est exigée par ces activités. La squalène époxydase a pu être mesurée « in vitro » par utilisation du farnésyl pyrophosphate comme substrat, l'enzyme de Saccharomyces cerevisiae ne fonctionnant pas avec le squalène exogène. Ceci suggère que les deux activités sont associées, au niveau du réticulum endoplasmique, dans un complexe multienzymatique ; le squalène synthétisé n'étant pas libéré, mais directement transformé en squalène époxyde.

L'exigence en cofacteurs pour les deux enzymes a été étudiée. La synthèse de la squalène époxydase est régulée par l'oxygène moléculaire. Les activités spécifiques des deux enzymes sont fortement déréprimées (facteur 1,5 à 5) dans la plupart des mutants auxotrophes. La relation bloc enzymatique-activités squalène synthétase et époxydase a été discutée.

MOTS CLES : Biochimie - Génétique - Physiologie - Métabolisme - Ergostérol (stérol) - Acide mévalonique - Isoprénoïdes - Saccharomyces cerevisiae - Régulation (gène-enzyme) - Auxotrophie (mutant auxotrophe) - Antibiotique (nystatine, amphotéricine B) - Squalène synthétase - Squalène époxydase - Squalène époxyde-lanostérol cyclase.