

9. Résumé de thèse de Doctorat en co-tutelle

1. Introduction

Zygosaccharomyces rouxii est une levure osmotolérante appartenant à la classe des hémiascomycètes. Elle se classe dans la zone charnière séparant les espèces *S. cerevisiae sensu lato* des *Kluyveromyces* (de Montigny *et al.*, 2000). Cette position phylogénétique particulière en fait un organisme de choix pour le projet de génomique comparative des hémiascomycètes, Génolevures 3 (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>). L'annotation actuellement en cours permettra de préciser sa position.

La capacité de *Z. rouxii* à résister à des fortes pressions osmotiques conduit à ce qu'elle soit souvent trouvée comme contaminant d'aliments riches en sels ou en sucres comme les sirops, le miel et les confitures. Cette levure est aussi employée dans des processus fermentaires pour la fabrication de produits alimentaires orientaux.

La réponse d'une cellule à un stress osmotique dépend principalement du métabolisme du glycérol et de sa régulation (Hohmann, 2002). En effet, lors d'une augmentation de la pression osmotique, la cellule subit une fuite d'eau et une perte de volume qui vont être compensées par une accumulation de glycérol. Cette pression osmotique constitue donc le signal pour l'augmentation *in vivo* de la synthèse du glycérol, la diminution de son excrétion par diffusion ou encore sa réimportation après avoir été perdu par diffusion.

Le stress osmotique est en majorité causée par des hautes concentrations de sucres ou de sels (NaCl, KCl). Une forte concentration d'ions dans le milieu va entraîner leur diffusion vers l'intérieur de la cellule suivant leur gradient de concentration et perturber ainsi l'équilibre homéostatique. Le maintien de la concentration intracellulaire des ions, compatible avec le fonctionnement cellulaire, est assuré chez *S. cerevisiae* par des mécanismes de transport actif. La protéine membranaire codée par le gène *ScNHA1* (Prior *et al.*, 1996) va permettre l'efflux d'ions Na⁺, K⁺ et Li⁺ en utilisant le flux entrant de protons (H⁺). Les gènes orthologues de *ScNHA1* chez *Z. rouxii* (*ZrSOD2-22*, *ZrSOD2*, *ZrSOD22*) codent quant à eux des perméases exportant les ions sodium et lithium mais pas ceux du potassium (Kinclová *et al.*, 2001, 2002, Iwaki *et al.* 1998).

Si plusieurs études physiologiques et biochimiques ont été réalisées chez *Z. rouxii* (Jansen *et al.*, 2003; Martorell *et al.*, 2007; van Zyl *et al.*, 1990), les connaissances en génétique sont limitées. Seuls quelques gènes de *Z. rouxii* ont été clonés et caractérisés, par exemple les gènes *ZrHOG1* (Iwaki *et al.*, 1999), *ZrFPS1* (Tang *et al.*, 2005) et *ZrGPD1* (Iwaki *et al.*, 2001) impliqués dans la réponse au stress, ou encore le gène *ZrSOD2-22* (Kinclová *et al.*, 2001) codant l'antiporteur Na^+/H^+ . La plupart de *Z. rouxii* gènes a été caractérisés par complémentation de fonction chez *S. cerevisiae*. Les études de l'expression de ces gènes ou la caractérisation d'autres impliqués dans les phénomènes d'osmotolérance ne sont possibles chez *Z. rouxii* que s'il existe un ensemble d'outils génétiques et moléculaires permettant de réaliser directement dans cette espèce des études de génétique inverse. La connaissance de son genome et sa position phylogénique vont encore renforcer d'avantage l'intérêt de disposer de tels outils.

L'objectif de ce travail de thèse a été double. Le premier objectif a consisté à mettre au point un ensemble d'outils génétiques et moléculaires permettant de réaliser chez *Z. rouxii* des études de génétique inverse. Le second était d'étudier l'osmotolérance de *Z. rouxii*. Pour ce dernier point, nous avons caractérisé et comparé deux souches de *Z. rouxii* CBS 732 et ATCC 42981 montrant une structure des parois cellulaires et des propriétés osmotolérantes différentes. Nous avons étudié également l'importance des antiporters Na^+/H^+ dans l'osmotolérance de *Z. rouxii*. Enfin, nous avons complété ce travail par une approche de génomique comparative des gènes de levures codant les cations métalliques alcalins/ H^+ antiporteurs et par la participation à l'annotation du genome de *Z. rouxii* dans le cadre du projet Génolevures 3.

Ce travail de thèse sera présenté sous la forme de sept manuscrits (publié, sous presse ou soumis) et de deux chapitres décrivant les résultats non-publiés.

2. Principaux résultats obtenus

2.1. Construction d'outils génétiques et moléculaires de *Z. rouxii*

Ce travail a conduit à la construction de plusieurs outils de génétique et de biologie moléculaire permettant l'utilisation de *Z. rouxii* comme organisme modèle. L'isolement et la caractérisation de six mutants d'auxotrophie comme *ura3*, *leu2*, *ade2* et la mise au point de protocoles de transformation par électroporation ont été les premières étapes indispensables à

la construction d'un ensemble de plasmides spécifiques de *Z. rouxii*. Nous avons construit un ensemble de plasmides de type épisomal présents à haut nombre de copies grâce à la présence de l'origine de répllication du plasmide endogène pRS1 de *Z. rouxii*.

Nous avons isolé 4 fragments d'ADN de cette levure présentant un % important d'identité au niveau nucléotidique et une organisation similaire aux centromères de *S. cerevisiae*. Deux d'entre-eux ont été analysés plus particulièrement et leur fonction de centromères ont été prouvées expérimentalement chez *Z. rouxii*. Ces éléments nous ont permis de construire un ensemble de plasmides centromériques qui lorsqu'ils sont introduits chez *Z. rouxii* vont être présents en copie unique.

De la même manière, nous avons conçu un vecteur permettant de réaliser des fusions GFP dans le but de localiser *in vivo* les protéines d'intérêt. Enfin, nous avons mis au point les outils et les conditions expérimentales permettant le remplacement de gènes en une étape par un mécanisme de recombinaison homologue. Grâce à ces travaux, à la construction d'une cassette *loxP-kanMX-loxP* et d'un plasmide exprimant une recombinase *cre*, il est possible à présent de déléter chez *Z. rouxii* un ou plusieurs gènes d'intérêts et d'en étudier ainsi le phénotype.

2.2. Etude des propriétés osmotolérantes de *Z. rouxii*

Deux souches de laboratoire de *Z. rouxii* sont généralement utilisées dans les différentes approches utilisant cette espèce, CBS 732^T et ATCC 42981. La souche ATCC 42981 étant plus osmotolérante que CBS 732^T, il était intéressant d'étudier les différences génomiques et génétiques de ces souches dans le but de comprendre cette variabilité.

Une analyse du caryotype électrophorétique a révélé un polymorphisme important entre ces deux souches. La souche ATCC 42981 porte un chromosome surnuméraire. Sur le plan de la structure, on peut observer des différences au niveau de leurs parois cellulaires. Celles-ci présentent en effet une résistance variable vis à vis d'enzymes lytiques comme la Zymolyase et la Lyticase qui découlent de différences de structure. La souche moins osmotolérante, CBS 732^T, possède une paroi plus rigide que celle de la souche ATCC 42981 qui est plus élastique. Les deux souches sont plus osmotolérantes que *S. cerevisiae* et produisent moins de glycérol sous les conditions de stress osmotique, indiquant l'existence d'un mécanisme capable de retenir ou de réimporter le glycérol perdu par diffusion. La souche ATCC 42981, mais pas

CBS 732^T, est aussi capable d'assimiler glycérol. Les résultats obtenus sont en accord avec une hypothèse que ATCC 42981 est une souche hybride.

2.3. Na⁺/H⁺-antiporteurs

A partir des banques de données publics, nous avons recherché les différents gènes codant pour les cations /H⁺ antiporteurs c'est à dire les orthologues des gènes *NHA1*, *NHX1* ou *KHA1* de *S. cerevisiae*. L'analyse *in silico* de ces séquences a permis de montrer la conservation de domaines protéiques qui sont très vraisemblablement important dans le fonctionnement de ces antiporteurs. La comparaison phylogénétique de celles-ci avec les protéines de type antiporteur de bactéries, de plantes et de mammifères a indiqué que les protéines Nhx sont proches des antiporteurs de plantes et de mammifères tandis que les protéines Kha sont proches de ceux des bactéries. Par contre, les protéines Nha1 forment une famille spécifique. Récemment, les homologs Nha1 étaient identifiés aussi dans le génome humain (Brett *et al.*, 2005).

Le gène *ZrSOD2-22* codant pour l'antiporteur Nha1p de *Z. rouxii* CBS 732^T, qui a été étudié jusqu'à présent uniquement en contexte hétérologue chez *S. cerevisiae*, a été délété chez *Z. rouxii*. L'analyse phénotypique du mutant obtenu a confirmé la fonction de ce gène dans la tolérance aux ions Na⁺ et Li⁺. En explorant la base de données Génolevures 3, un second gène appartenant à la famille des antiporteurs Na⁺/H⁺ a été identifié chez *Z. rouxii* et nommé *ZrNHA1*. Nous avons montré que cette protéine a une localisation membranaire. Nous avons construit des mutants de délétion *Zrnha1Δ* et *Zrsod2-22Δ* et le mutant double *Zrnha1Δ Zrsod2-22Δ* de *Z. rouxii*. L'analyse phénotypique de ces mutants et les mesures de l'efflux des cations en contexte hétérologue chez *S. cerevisiae* ont prouvé que *ZrNha1p* était capable de transporter l'ion K⁺, mais aussi Na⁺, et de participer à la tolérance de la cellule aux ions K⁺, Na⁺ et Li⁺. En présence des ions Na⁺ et Li⁺, les deux antiporteurs apparemment complémentent l'un l'autre. La levure *Z. rouxii* possède donc deux antiporteurs Na⁺/H⁺: Un avec une large spécificité de substrat (*ZrNHA1*) et un autre avec une spécificité de substrat plus étroite (*ZrSOD2-22*). L'analyse de syntenie des gènes avoisinant *ZrNHA1* et *ZrSOD2-22* suggère que *ZrSOD2-22* résulte d'une duplication génique et insertion dans une nouvelle région du génome.

2.4. Séquençage et annotations de *Z. rouxii* génome

Z. rouxii fait partie des espèces étudiées dans le cadre du projet de génomique comparative Génolevures 3. Nous avons donc participé à l'annotation des différents génomes des 4 espèces appartenant ou proche du groupe des *Kluyveromyces*. Ce travail a représenté un bon complément de formation dans le cadre de cette thèse.

3. Conclusion et perspectives.

Les outils génétiques et moléculaires ainsi que l'amélioration des techniques, notamment de transformation, mis au point lors de ce travail de thèse nous ont permis d'avancer dans la compréhension du phénomène d'osmotolérance de *Z. rouxii*. Nous avons pu préciser le rôle des antiporteurs Na^+/H^+ dans ce phénomène. La levure *Z. rouxii* possède deux types de Na^+/H^+ antiporteurs: l'un avec une large spécificité de substrat (*ZrNHAI*) et l'autre avec une spécificité plus étroite (*ZrSOD2-22*). L'analyse *in silico*, grâce aux banques de données, des cations métaux alcalins $/\text{H}^+$ antiporteurs pour l'ensemble des génomes de levures séquencés a permis de localiser les régions clés pour le fonctionnement de ces transporteurs.

La connaissance de la séquence complète du génome et les outils conçus dans ce travail permettent d'utiliser à présent la levure *Z. rouxii* comme modèle expérimental au même titre que *S. cerevisiae*. Les approches expérimentales qui pourront être développées *in vivo* permettront ainsi de renforcer les approches de génomique comparative.

4. Références

- Brett, C.L., Donowitz, M., Rao, R. (2005) Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C223-239.
- de Montigny, J., Straub, M., Potier, S., Tekaiia, F., Dujon, B., Wincker, P., Artiguenave, F., Souciet, J. (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 8. *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEBS Lett* **487**: 52-55.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.
- Iwaki, T., Higashida, Y., Tsuji, H., Tamai, Y., Watanabe, Y. (1998) Characterization of a second gene (*ZSOD22*) of Na^+/H^+ antiporter from salt-tolerant yeast