



**IDENTIFICATION DES DÉTERMINANTS  
GÉNÉTIQUES IMPLIQUÉS DANS LA  
DIFFÉRENCIATION PHÉNOTYPIQUE ENTRE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ET  
*SACCHAROMYCES PARADOXUS***

**Mémoire**

**MÉLISSA GIROUX**

**MAÎTRISE EN BIOLOGIE**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Mélissa Giroux, 2013

## Résumé

L'objectif principal de cette étude était d'identifier les déterminants génétiques causant une différenciation phénotypique entre les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces paradoxus*. Ces espèces peuvent s'hybrider malgré des différences écologiques importantes, dont la capacité de croître à haute température. *S. cerevisiae* et l'hybride sont capables de croître à 37 °C tandis que *S. paradoxus* ne peut pas. L'approche qui a été utilisée est un test de complémentation. D'abord, les chromosomes de *S. cerevisiae* ont été enlevés un à un du génome de l'hybride, puis les gènes afin d'augmenter la résolution de l'approche. Ainsi, les chromosomes et les gènes de *S. paradoxus* qui ne peuvent pas compléter ceux de *S. cerevisiae*, empêchant l'hybride de croître à 37 °C, ont pu être identifiés. Les résultats indiquent que la différence entre les taux de croissance de *S. cerevisiae* et *S. paradoxus* est causée par de multiples locus ayant des effets mineurs sur le phénotype.

## **Avant-propos**

Je tiens à remercier certaines personnes sans qui je n'aurais peut-être pas réussi à accomplir ma maîtrise. D'abord, tous les membres de mon laboratoire ont été d'un grand support. J'ai toujours pu compter sur eux, peu importe les problèmes rencontrés. Je tiens particulièrement à remercier notre professionnelle de recherche, Isabelle Gagnon-Arsenault, qui a toujours eu la patience et le souci de m'aider dans mes expérimentations. Je remercie également mon directeur de recherche, Christian Landry, qui a toujours été prêt à m'aider à m'améliorer dans mes travaux.

Je tiens également à remercier mon conjoint, Jean-Philippe Hamel, qui m'a toujours supportée moralement tout au long de mon parcours. Ses encouragements m'ont permis d'avancer continuellement. Ma famille m'a également épaulée durant ma maîtrise et je les remercie.

L'expérimentation sur la perte de chromosome a permis de soumettre un article dans la revue G3 : Genes, Genomes, Genetics. Il sera reconsidéré après modifications. Des expériences sont en cours afin de répondre aux exigences des critiques et permettre sa publication.

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	II
<b>Avant-propos</b> .....	III
<b>Liste des figures</b> .....	VI
<b>Liste des tableaux</b> .....	VII
<b>1-Introduction</b> .....	8
1.1-Environnement, phénotype et génotype .....	8
1.2-Trait phénotypique simple vs complexe .....	9
1.3-Description des levures du genre <i>Saccharomyces</i> .....	10
1.4-Organismes modèles .....	11
1.5-Phénotype modèle .....	12
1.6-Objectifs .....	14
<b>2-Matériel et méthodes</b> .....	15
2.1-Survol de l'approche .....	15
2.2-Test de croissance avec perte des chromosomes .....	17
2.2.1-Souches de levures .....	17
2.2.2-Induction de la perte des chromosomes .....	17
2.2.3-Sélection des hybrides ayant perdu un chromosome .....	21
2.2.4-Confirmation de la perte des chromosomes .....	21
2.2.5-Mesure du taux de croissance sur milieu solide .....	22
2.2.6-Mesure du taux de croissance en milieu liquide .....	25
2.3-Tests de croissance avec perte de gènes .....	25
2.3.1-Croissance en milieu liquide avec fluorescence .....	25
2.3.2-Construction des souches .....	29
2.3.3-Croisements .....	32
2.3.4-Mesure des taux de croissance des souches en compétition .....	33
2.4-Comparaison de la croissance entre hybrides réciproques .....	34
2.4.1-Construction des souches .....	34
2.4.2-Mesure du taux de croissance en milieu liquide .....	43
<b>3-Résultats</b> .....	43
3.1-Test de croissance avec perte des chromosomes .....	43
3.1.1-Souches de levures .....	43
3.1.2-Confirmation de la perte des chromosomes .....	44
3.1.3-Mesure du taux de croissance sur milieu solide .....	47
3.1.4-Test de croissance en milieu liquide .....	51
3.2-Test de croissance avec perte de gènes .....	53
3.2.1-Mesure des taux de croissance des souches en compétition .....	53
3.3-Hybrides réciproques .....	57
<b>4-Discussion</b> .....	59
<b>Bibliographie</b> .....	67
<b>Annexe 2.</b> Tables d'ANOVA pour la comparaison des hybrides réciproques .....	73
Hybride témoin .....	75
<b>Annexe 3.</b> Description de l'organisation des données dans les dossiers informatiques .....	76
<b>Annexe 4.</b> Résultats des 120 gènes de <i>S. cerevisiae</i> dont la délétion chez l'hybride entraîne une diminution du taux de croissance à 37°C. ....	79

**Annexe 5.** Gènes impliqués dans l'incapacité de *S. paradoxus* de croître à 37 °C en commun avec ceux identifiés par Sinha *et. al.* (2008). .....83

**Annexe 6.** Alignement des gènes YIL007C et YMR077C entre *S. cerevisiae* et *S. paradoxus*.....84

## Liste des figures

Figure 1. Approche générale de la méthodologie à faible et à haute résolution par test de complémentation. ....	16
Figure 2. Construction de la collection de souches de <i>S. cerevisiae</i> avec chromosomes conditionnels par Reid et al. (2008).. ....	19
Figure 3. Méthode utilisée pour faire perdre les chromosomes de <i>S. cerevisiae</i> de l'hybride. ....	20
Figure 4. Méthode de confirmation de la perte des chromosomes.....	24
Figure 5. Courbe de croissance illustrant la pente qui a été utilisée dans le calcul du taux de croissance. ....	27
Figure 6. Sommaire de la méthode pour la mesure du taux de croissance des hybrides en compétition .....	28
Figure 7. Construction des hybrides réciproques .....	35
Figure 8. Confirmation de la perte des chromosomes.....	45
Figure 9. Exemples de problèmes rencontrés (flèches) pour la perte des chromosomes...	46
Figure 10. Test de croissance sur milieux solides des hybrides CEN1 à CEN8 avec leurs souches parentales. ....	49
Figure 11. Test de croissance sur milieux solides des hybrides CEN9 à CEN16 avec leurs souches parentales. ....	50
Figure 12. Taux de croissance en fonction de la température (30° vs 37°) et du chromosome de <i>S. cerevisiae</i> chez les hybrides (présence/absence). ....	52
Figure 13. Fluorescence obtenue pour les souches de <i>S. cerevisiae</i> (A) et <i>S. paradoxus</i> (B) étiquetées avec mCherry et Cerulean. ....	54
Figure 14. Distribution des coefficients de sélection en fonction de la température (30 °C vs 37 °C). ....	55
Figure 15. Taux de croissance en fonction de la température (30 °C et 37 °C) et de l'allèle présent chez les hybrides ( <i>S. cerevisiae</i> ou <i>S. paradoxus</i> ) pour 20 gènes candidats. ....	58

## Liste des tableaux

Tableau 1. Souches utilisées dans l'expérimentation sur la perte de chromosomes.....	18
Tableau 2. Amorces de vérification de la perte des chromosomes de <i>S. cerevisiae</i> . ....	23
Tableau 3. Amorces utilisées pour l'intégration des cassettes Cerulean et mCherry dans le génome de <i>S. paradoxus</i> .....	31
Tableau 4. Amorces utilisées pour la délétion des gènes de <i>S. cerevisiae</i> .....	36
Tableau 5. Amorces utilisées pour la délétion des gènes de <i>S. paradoxus</i> . ....	37
Tableau 6. Souches haploïdes de <i>S. paradoxus</i> ayant les gènes candidats inactivés. ....	38
Tableau 7. Souches haploïdes de <i>S. cerevisiae</i> ayant les gènes candidats inactivés. ....	39
Tableau 8. Hybrides ayant l'allèle de <i>S. cerevisiae</i> inactivé aux gènes candidats. ....	41
Tableau 9. Hybrides ayant l'allèle de <i>S. paradoxus</i> inactivé aux gènes candidats .....	42
Tableau 10. Résultats des 30 gènes dont la délétion chez l'hybride entraîne une diminution du taux de croissance à 37 °C.....	56



## 1-Introduction

### 1.1-Environnement, phénotype et génotype

Il existe un lien entre l'environnement d'un individu, le génotype qu'il exprime et le phénotype qu'il affiche. D'abord, les individus sont adaptés à leur environnement grâce à la sélection naturelle et il est possible de voir cette adaptation par le phénotype exprimé. Le meilleur exemple est le camouflage. Différentes espèces proches peuvent montrer une variation de coloration en fonction de l'habitat dans lequel elles se trouvent, afin d'augmenter leur succès reproducteur. Toutefois, le phénotype est sous la gouverne du génotype. C'est le génotype qui est exprimé et certains gènes sont souvent la clé de la différenciation phénotypique. Plusieurs études tentent d'ailleurs d'identifier les bases moléculaires expliquant des phénotypes qui diffèrent chez des espèces proches qui habitent des environnements différents. Un premier exemple est le cas de la souris de plage *Peromyscus polionus* (Hoekstra *et al.* (2006). Cette espèce est divisée en 8 sous-espèces qui montrent une variation de la coloration du pelage allant de très clair à très foncé. Les différentes colorations ont été sélectionnées pour le camouflage, car ces souris se retrouvent sur différents types de plages et dans les terres. Hoekstra *et al.* (2006) ont montré que la variation de la pigmentation est causée par une mutation dans le gène qui code pour le récepteur de la mélanocortine-1, entraînant un changement de charge de l'acide aminé. Mundy *et al.* (2004) ont également montré que la différence dans le mélanisme chez l'oie des neiges (*Anser c. caerulescens*) et chez les labbes arctiques (*Stercorarius Parasiticus*) est associée avec une mutation dans le gène du récepteur de la mélanocortine-1. Le mélanisme chez ces espèces est impliqué dans le choix des partenaires sexuels. Un autre exemple est le changement morphologique apparent qui se produit en fonction de l'environnement. Un des cas les plus connus est celui de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) (Shapiro *et al.*, 2004). Cette espèce est présente en eau salée et en douce. En eau douce, le poisson va avoir une réduction des structures pelviennes et des épines dorsales. En eau douce, il y a moins de poissons prédateurs ce qui rend les structures de défense moins utiles. Il y a également moins de calcium disponible pour la formation de ses structures. Puis, il y a une augmentation de la prédation par des macroinvertébrés qui capturent les épinoches par les épines. Il est donc plus avantageux pour le poisson de ne pas avoir d'épines ou de les avoir très réduites. Les

auteurs ont identifié le gène *Pitx1* qui s'exprime chez les individus marins, entraînant une croissance au niveau du bassin, et qui ne s'exprime pas chez les individus en eau douce, entraînant une absence des structures pelviennes.

### 1.2-Trait phénotypique simple vs complexe

Dans plusieurs études, il n'y a généralement qu'un gène majeur qui est impliqué dans la différenciation phénotypique entre espèces proches. Toutefois, il s'agit souvent d'un trait phénotypique peu complexe. Est-ce que dans le cas d'un trait complexe, comme la croissance ou l'adaptation à la température, il y a qu'un gène majeur d'impliqué ou s'agit-il de plusieurs locus avec des effets mineurs? Coyne et Orr (1992) ont débattu sur le fait que la différence phénotypique provient d'un modèle oligogénique, c'est-à-dire que peu de gènes à faibles effets vont être responsables de cette différenciation. Quant à Bradshaw et Schemske (2003), ils ont voulu débattre du point qu'il y ait près d'une infinité de mutations adaptatives ayant de faibles effets sur le phénotype. Pour ce faire, ils ont tenté d'estimer la valeur adaptative de la substitution de l'allèle Yellow Uppers5-7 (YUP), responsable de la formation ou non du pigment caroténoïde dans les pétales des deux espèces. Les auteurs ont choisi l'espèce *Mimulus lewisii*, une fleur aux pétales roses et pollinisée par les bourdons, et son espèce sœur *Mimulus cardinalis*, une fleur aux pétales rouges et pollinisée par les colibris. Ils ont donc créé des lignées isogéniques dans lesquelles l'allèle YUP a été remplacé par celui de l'autre espèce. *M. cardinalis* mutant a montré une coloration plus foncée et a obtenu 74 fois plus de visite de bourdons que *M. cardinalis* sauvage. Quant à *M. lewisii* mutante, elle a présenté une coloration jaune-orange et a obtenu 68 fois plus de visites par les colibris que l'espèce sauvage. Ces résultats montrent donc que la différence dans la préférence des pollinisateurs peut être initiée par une mutation unique ayant une grande répercussion sur la coloration des fleurs. Un autre exemple impliquant plus d'un gène est le cas de la morphologie des becs des pinsons de Darwin (Abzhanov *et al.*, 2006). Ce sont les variations d'expression ou de régulation des gènes de la calmoduline et de la Bmp (bone morphogenetic protein) qui agissent sur la variation de la morphologie des becs. Toutefois, afin de bien répondre à cette question, à savoir si un trait complexe est sous le contrôle d'un gène avec un effet majeur ou sous le contrôle de plusieurs locus avec des effets mineurs, l'utilisation d'un

organisme modèle peut s'avérer utile et avantageux. En effet, il agit à titre d'outil moléculaire permettant la dissection fine du génome.

### 1.3-Description des levures du genre *Saccharomyces*

Les levures du genre *Saccharomyces* sont très connues pour leur utilisation en industrie agroalimentaire. Elles sont utilisées pour la fabrication du pain, du vin et de la bière (Salvado *et al.* (2011). Elles sont également utilisées en biologie moléculaire, en génétique classique, en biochimie et en génomique comparative, particulièrement la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ses propriétés, dont son génome de petite taille, son cycle cellulaire court, sa culture facile et la délétion facile de ses gènes font de *S. cerevisiae* l'organisme eukaryote le mieux caractérisé et l'un des plus utilisés (Cubillos *et al.*, 2009).

Bien que les levures du genre *Saccharomyces* soient largement utilisées en biologie moléculaire et en génétique, ces organismes tendent à être de plus en plus utilisés au niveau de la recherche en écologie et en évolution (Landry *et al.*, 2006; Replansky *et al.*, 2008). Les thèmes comme la génétique des populations, la biogéographie des micro-organismes, l'écologie des communautés ou bien la spéciation peuvent être étudiés avec ces levures (Replansky *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont démontré que *S. cerevisiae* et *S. paradoxus* occupent les mêmes niches écologiques dans les régions boisées (écorce de chêne, sève de chêne et sol associé au chêne) (Naumov *et al.*, 1998; Sniegowski *et al.*, 2002). Une autre étude a montré que la levure *S. kudriavzevii* est en sympatrie avec *S. cerevisiae* et *S. paradoxus* au Portugal. Il a également été montré que *S. uvarum* est en sympatrie avec *S. paradoxus* au Canada (Sampaio et Goncalves (2008).

Bien que ces espèces se retrouvent dans les mêmes niches écologiques, elles montrent une variation dans la température de croissance optimale. Il y a des espèces thermophiles, dont *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, et *S. mikatae*. D'autres sont cryotolérantes, dont *S. bayanus var. uvarum*, *S. arboricolus* et *S. kudriavzevii*. La levure ayant la température de croissance optimale la plus élevée est *S. cerevisiae* (33 °C) et

celle ayant la plus basse est *S. kudriavzevii* (23 °C) (Salvado *et al.* (2011). Malgré la grande utilisation de *S. cerevisiae* en biologie moléculaire ou en agroalimentaire, l'étude de son écologie ne fait que débiter (Landry *et al.*, 2006; Replansky *et al.*, 2008).

Une équipe de recherche a tenté de quantifier la complexité de l'écosystème de *S. cerevisiae* via la fermentation (Goddard, 2008). Ils ont démontré que cette espèce de levure transformait son environnement par ses activités de fermentation. De cette façon, elle produit de l'éthanol afin d'être plus compétitive face aux autres espèces de levures, mais les chercheurs ont également découvert qu'elle produisait de la chaleur, qu'ils ont d'ailleurs quantifiée. Cette chaleur lui procure approximativement un avantage de 7 % en fitness par rapport au reste de la communauté de levures. *S. cerevisiae* peut donc posséder un ou plusieurs gènes qui lui permettent de survivre dans un environnement à haute température contrairement aux autres espèces de levures.

Sampaio et Goncalves (2008) ont tenté d'expliquer l'influence de la température sur l'association sympatrique des différentes espèces de levures du genre *Saccharomyces*. Leur étude a montré que grâce aux phénotypes différents des espèces, celles-ci étaient capables d'exploiter différentes niches écologiques (température) dans le même habitat, évitant ainsi le principe d'exclusion compétitive. Ce principe repose sur les travaux de Gause (1934) démontrant que des populations de deux espèces exploitant les mêmes ressources ne peuvent coexister dans la même niche écologique. L'espèce la plus compétitive va éliminer l'autre au fil du temps si les ressources sont limitantes. Sampaio et Goncalves (2008) suggèrent qu'une ségrégation temporelle des niches thermiques permet l'association sympatrique d'espèces adaptées aux hautes et basses températures.

#### 1.4-Organismes modèles

La levure *S. cerevisiae* a été choisie ainsi que son espèce sœur *S. paradoxus* dans cette étude. Cette dernière est la plus proche parente de *S. cerevisiae*, avec une identité de séquence d'ADN total d'environ 85 % (Kao *et al.*, 2010), et possède 5 gènes uniques (Kellis *et al.*, 2003). Le temps de divergence entre ces deux espèces est d'environ 5 à 10 millions d'années. De plus, ces deux espèces de levures sont capables de s'hybrider

(Replansky *et al.*, 2008). De plus, ces deux espèces de levures sont capables de s'hybrider (Replansky *et al.*, 2008) et il est possible de retrouver des hybrides en nature (Liti *et al.*, 2006).

*S. paradoxus* est également un bon modèle pour l'étude de la biologie évolutive et écologique. *S. paradoxus* et *S. cerevisiae* sont presque identiques au niveau phénotypique et il est difficile de les distinguer. Elles se différencient au niveau de la morphologie des spores, de la cellule et de l'asque, mais également dans l'assimilation et la fermentation des composés organiques (Replansky *et al.*, 2008). Liti *et al.* (2009) ont également montré que *S. paradoxus* est résistant au cycloheximide et sensible à la paramomycine, au cuivre et à la chaleur (en comparaison avec *S. cerevisiae*), contrairement à *S. cerevisiae*. Toutefois, la température optimale de croissance est différente pour les deux espèces. Salvado *et al.* (2011) ont démontré que la température optimale de *S. cerevisiae* était de 32,27 °C et que celle de *S. paradoxus* était de 29,92 °C. Leurs résultats correspondent en partie à ceux obtenus par Sweeney *et al.* (2004), soit une température optimale de 37 °C pour *S. cerevisiae* et de 30 °C pour *S. paradoxus*. Liti *et al.* (2009) ont démontré que la capacité de croître à 37 °C est considérée comme un phénotype séparant les deux espèces. Ils ont quantifié plusieurs phénotypes, dont la résistance au froid, à la chaleur, à différents pH et à plusieurs drogues ou antibiotiques (MMS, paramomycine, cycloheximide, caféine, tunicamycine, cisplatine, anisomycine et hydroxyurée) en mesurant la densité de population par une technique de micro-culture à haute résolution.

### 1.5-Phénotype modèle

Le phénotype qui a été choisi est la capacité de croître à 37 °C, car il s'agit d'un trait séparant bien *S. cerevisiae* et *S. paradoxus* (Liti *et al.*, 2009). Le taux de croissance à 37 °C de *S. cerevisiae* est plus élevé que celui de *S. paradoxus*. L'hybride a un taux de croissance similaire à celui de *S. cerevisiae*.

La capacité de croître à haute température est un trait complexe. La température ambiante occasionne certains effets importants en nature. D'abord, elle affecte le taux des réactions biochimiques qui entraînent des conséquences physiologiques importantes, par exemple

le maintien d'une température interne stable chez certains organismes. En influant sur les taux biochimiques, la température modifie l'énergie cinétique libérée des réactions biochimiques (Keller et Seehausen, 2012). La température n'a pas seulement un effet au niveau moléculaire, mais également au niveau des processus biologiques de l'organisme entier, par exemple le taux de croissance (Kingsolver, 2009). De plus, l'environnement thermal semble avoir des effets indirects en influençant les interactions biologiques que vit un organisme. En effet, la diversité d'espèces et le nombre d'individus tendent à diminuer en altitude et à de hautes latitudes (Kingsolver, 2009).

Peu d'études démontrent d'un point de vue moléculaire les bases de la différence phénotypique dans la capacité de croître à différentes températures d'espèces sœurs. Par exemple, Matute *et al.* (2009) ont étudié deux espèces sœurs de drosophiles ayant des préférences thermales différentes. *D. yakuba* se retrouve en basse altitude tandis que *D. santomea* vit en haute altitude. Les auteurs ont voulu déterminer si cet isolement spatial était le résultat d'une tolérance ainsi que d'une préférence différentielle de température. Pour cela, ils ont estimé le succès reproducteur des deux espèces ainsi que de leur hybride F1 à différentes températures et leurs préférences thermales. Ils ont procédé à des analyses génétiques limitées en discernant si les chromosomes sexuels, le cytoplasme et les autosomes étaient en cause dans les différences de traits en examinant les hybrides F1 et les rétrocroisements. En étudiant la viabilité des larves ainsi que l'éclosion des œufs, ils ont conclu que les gènes affectant la différence dans la préférence de température se retrouveraient sur les autosomes. Toutefois, cette équipe n'a pas déterminé quels sont ces gènes.

L'équipe de Sinha *et al.* (2008) a également essayé d'identifier les bases moléculaires derrière la capacité de croissance à haute température chez deux souches de *S. cerevisiae*, une souche clinique et la souche de laboratoire S288c ainsi que l'hybride entre les deux. Ils ont utilisé une approche de cartographie par rétrocroisement et ont trouvé trois nouveaux lieux de caractères quantitatifs (QTL) impliqués dans ce phénotype. Ils ont trouvé 934 gènes qui causent une réduction du fitness à 37 °C.

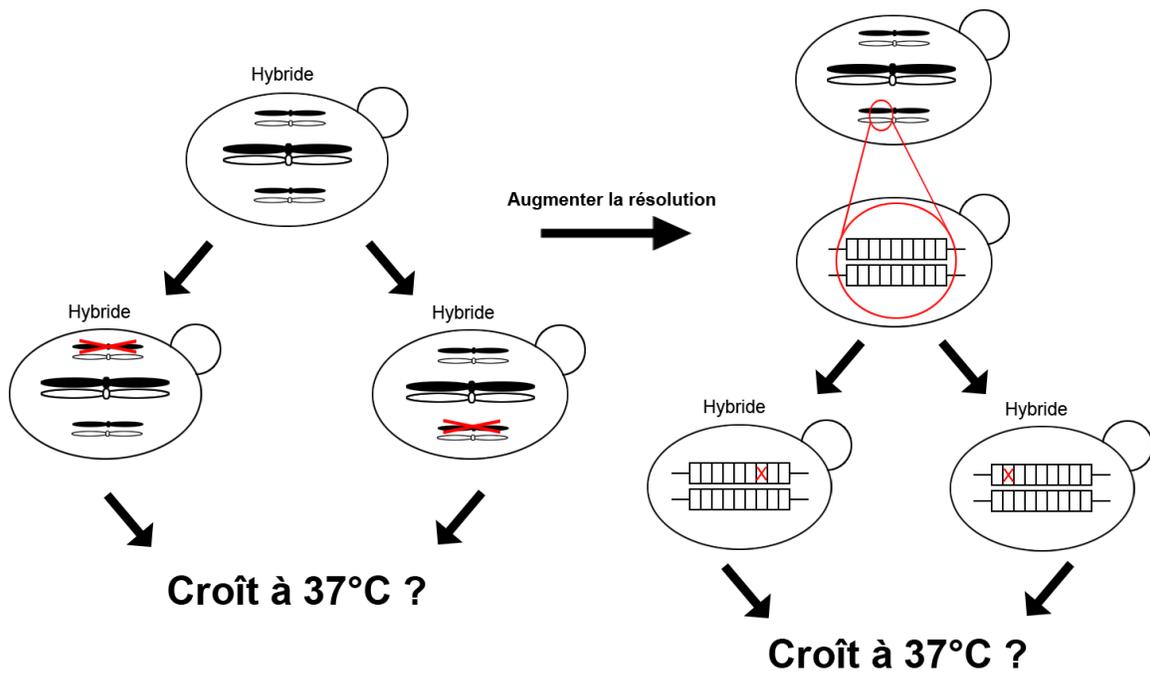
## 1.6-Objectifs

Il a clairement été démontré que les différentes espèces de levures présentent une variation dans la capacité de croître à différentes températures. Toutefois, les déterminants génétiques de cette différenciation n'ont pas été identifiés. Le but principal de mon projet de maîtrise est donc d'identifier les déterminants génétiques responsables de la différenciation phénotypique, soit la capacité de croître à 37 °C, entre les deux espèces sœurs *S. cerevisiae* et *S. paradoxus*. Pour ce faire, mon premier objectif est d'identifier le ou les chromosomes de *S. paradoxus* qui ne permettent pas à l'hybride de croître à 37 °C, et donc qui ne complètent pas la perte de ceux de *S. cerevisiae*. Il s'agit d'un test de complémentation. Le nombre de chromosomes impliqués sera un indice pour savoir si le phénotype de *S. paradoxus* est causé par un locus majeur ou par plusieurs locus avec des effets plus faibles. Par exemple, s'il n'y a qu'un chromosome impliqué, on pourra émettre l'hypothèse qu'il peut y avoir plusieurs locus à effets mineurs ou un locus à effet majeur. Dans ce cas, en augmentant la résolution du test de complémentation en allant au niveau des gènes, il sera possible de vérifier s'il s'agit d'un gène majeur qui est responsable. Toutefois, dans le cas de plusieurs chromosomes impliqués, il pourrait y avoir plusieurs gènes d'effets mineurs sur chaque chromosome ou un gène d'effet majeur sur un chromosome et plusieurs gènes d'effets mineurs sur d'autres chromosomes. Le deuxième objectif à atteindre, afin de mieux comprendre la différenciation phénotypique entre espèces proches, va à plus petite échelle, en identifiant le(s) gène(s) responsable(s) de l'incapacité à croître à 37 °C de *S. paradoxus* et qui ne complètent pas la perte de ceux de *S. cerevisiae*.

## **2-Matériel et méthodes**

### 2.1-Survol de l'approche

Pour répondre au premier objectif, je vais croiser une souche de *S. paradoxus* avec une collection de 16 souches de *S. cerevisiae* dont chacune a un chromosome conditionnel. Il sera donc possible d'enlever chacun des 16 chromosomes conditionnels de *S. cerevisiae* des nouveaux hybrides formés en les déstabilisant. Ainsi, la comparaison du taux de croissance à 37 °C entre les hybrides normaux et ceux ayant perdu un chromosome pourra être effectuée. Les hybrides déstabilisés qui démontreront un taux de croissance plus faible à 37 °C comparativement à l'hybride parental, indiquera que le chromosome de *S. paradoxus* ne peut pas compléter la perte de celui de *S. cerevisiae* à 37 °C. Puis, afin de répondre au deuxième objectif, je vais croiser *S. paradoxus* avec une collection de délétion de *S. cerevisiae* afin de trouver quels sont les gènes impliqués dans la capacité à croître à 37 °C. Cette collection comporte plus de 4700 souches dont chacune des souches a un gène d'inactivé. Les hybrides mutants seront mis en compétition avec un hybride témoin à 37 °C. Les hybrides qui auront un taux de croissance plus faible que le témoin comporteront des gènes candidats au phénotype, indiquant que le gène seul de *S. paradoxus* ne permet pas la croissance à 37 °C. Puis, pour contre-vérifier, des hybrides réciproques seront construits en inactivant l'allèle de *S. paradoxus* aux différents gènes dans certaines souches et en inactivant l'allèle de *S. cerevisiae* aux mêmes gènes dans d'autres souches. Le taux de croissance à 37 °C sera comparé entre les hybrides. Une perte du taux de croissance seulement dans la souche ayant le gène de *S. cerevisiae* inactivé indiquera que ce gène complète celui de *S. paradoxus*, permettant à l'hybride de croître à 37 °C. La figure 1 illustre l'approche générale.



**Figure 1.** Approche générale de la méthodologie à faible et à haute résolution par test de complémentation. D'abord, ce sont les chromosomes de *S. cerevisiae* qui sont enlevés de l'hybride afin d'identifier les chromosomes de *S. paradoxus* qui ne peuvent pas compléter la perte de ceux de *S. cerevisiae*. Puis, ce sont les gènes de *S. cerevisiae* qui sont inactivés de l'hybride afin d'identifier ceux de *S. paradoxus* qui ne complètent pas ceux de *S. cerevisiae*.

## 2.2-Test de croissance avec perte des chromosomes

### 2.2.1-Souches de levures

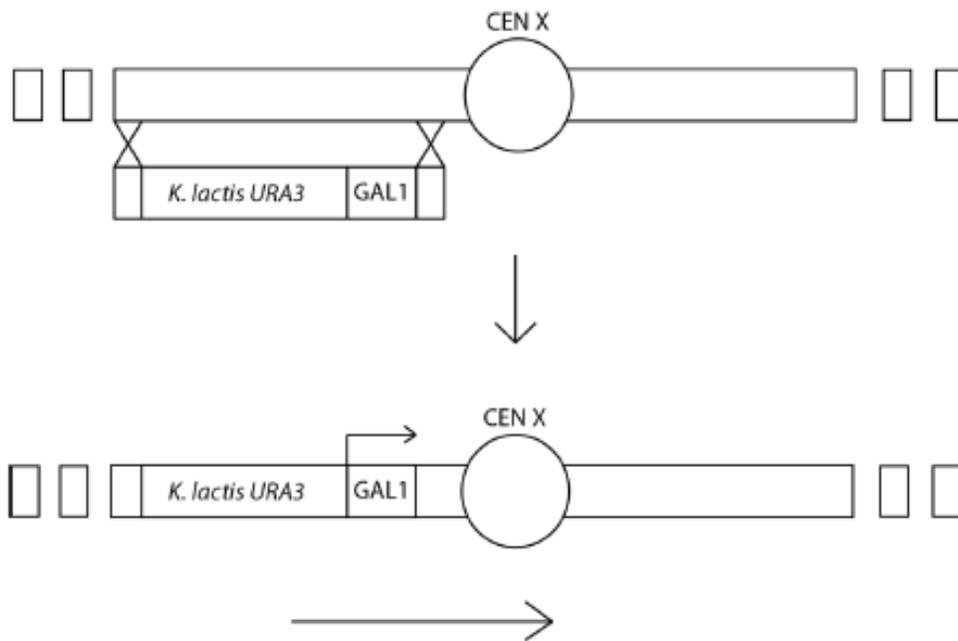
Les souches qui ont été utilisées sont énumérées dans le tableau 1. Les souches de *S. cerevisiae* proviennent des travaux de Reid *et al.* (2008). Il s'agit de seize souches haploïdes *MAT $\alpha$* , construites sous le profil génétique W303. Chaque souche possède un centromère conditionnel sur l'un des seize chromosomes, qui a été engendré par l'intégration du promoteur inductible *GALI* en amont de la séquence consensus du centromère. Le promoteur *GALI* a été cloné dans un plasmide pCEN-UG avec le gène *Kluyveromyces lactis URA3* comme marqueur de sélection. La figure 2 illustre la construction du plasmide pCEN-UG et le centromère conditionnel. Les hybrides ont été obtenus en croisant cet ensemble de 16 souches conditionnelles contre une souche *MAT $\alpha$*  de *S. paradoxus* (MG001). Le croisement s'est fait dans du YPD liquide (extrait de levure 1 %, tryptone 2 %, glucose 2 %), incubé à 30 °C pendant 24 h avec agitation. La sélection des diploïdes a été faite sur milieu sélectif solide, soit un milieu synthétique complet sans uracile, sans leucine et avec l'antibiotique cloNAT (100 µg/ml). Les souches parentales ont été étalées sur les milieux comme témoins. Les croisements ont été incubés pendant deux jours à 30 °C.

### 2.2.2-Induction de la perte des chromosomes

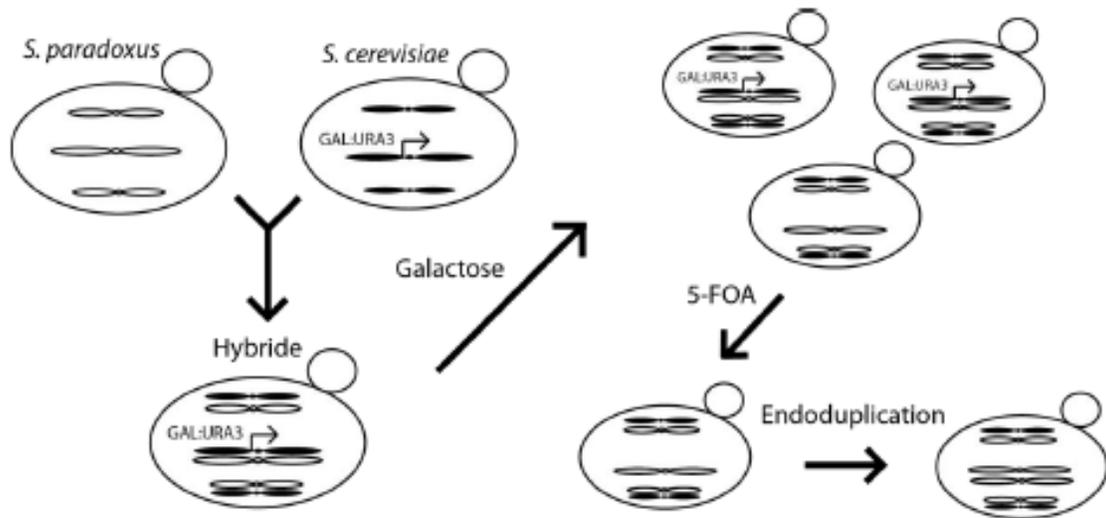
L'induction de la perte des chromosomes est basée sur la méthode d'Alvaro *et al.* (2006) (figure 3). Les hybrides ont été étalés à deux reprises à l'aide de billes de verre sur milieu riche avec comme source de carbone le galactose (YPGal; extrait de levure 1 %, tryptone 2 %, galactose 2 %). Le galactose active le promoteur inductible entraînant la transcription active du centromère, ce qui déstabilise le chromosome et permet ainsi sa perte lors de la ségrégation. L'endoduplication du chromosome restant suit rapidement la perte. Les diploïdes ont été incubés à 30 °C pendant 24 h.

**Tableau 1.** Souches utilisées dans l'expérimentation sur la perte des chromosomes.

<b>Souches</b>	<b>MAT</b>	<b>Génotype</b>	<b>Source</b>
MG001	A	<i>ho::NAT lys2 his3 ura3</i>	Cette étude
MG020	a/α	<i>ho::NAT his3/HIS3 lys2/lys2 URA3/ura3</i>	Cette étude
MG013	a/α	<i>HO/ho::NAT his2/HIS3 leu2/LEU2 ura3/ura3 met15/MET15 LYS2/lys2</i>	Cette étude
MG009	a/α	<i>leu2/leu2 ura3/ura3 met15/MET15 lys2/LYS2</i>	Cette étude
DY6297	A	<i>CEN1::pGal1-CEN1-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
W3616-3A	A	<i>CEN2::pGal1-CEN2-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 RAD5</i>	Reid et al. (2008)
DY6296	A	<i>CEN3::pGal1-CEN3-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6298	A	<i>CEN4::pGal1-CEN4-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6299	A	<i>CEN5::pGal1-CEN5-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6300	A	<i>CEN6::pGal1-CEN6-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6301	A	<i>CEN7::pGal1-CEN7-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6302	A	<i>CEN8::pGal1-CEN8-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6303	A	<i>CEN9::pGal1-CEN9-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6304	A	<i>CEN10::pGal1-CEN10-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6305	A	<i>CEN11::pGal1-CEN11-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6306	A	<i>CEN12::pGal1-CEN12-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6307	A	<i>CEN13::pGal1-CEN13-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
W3617-1B	A	<i>CEN14::pGal1-CEN14-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 RAD5</i>	Reid et al. (2008)
DY6309	A	<i>CEN15::pGal1-CEN15-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)
DY6310	A	<i>CEN16::pGal1-CEN16-URA3KI ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 lys2 met17 trp1-1 ura3-1 rad5-535</i>	Reid et al. (2008)



**Figure 2.** Construction de la collection de souches de *S. cerevisiae* avec chromosomes conditionnels par Reid et al. (2008). La cassette intégrée dans *S. cerevisiae* résulte de la fusion entre l'amplification par PCR des régions proximales de CEN X et l'amplification du promoteur *GAL1* et du gène *K. lactis URA3* (marqueur de sélection). La cassette est insérée dans le génome en amont du centromère par recombinaison homologue. Lorsque le promoteur *GAL1* est activé, le centromère est transcrit et le chromosome déstabilisé.



**Figure 3.** Méthode utilisée pour éliminer les chromosomes de *S. cerevisiae* à l'hybride. *S. paradoxus* est croisé avec la collection de souches de *S. cerevisiae* avec chromosomes conditionnels. Les hybrides obtenus sont étalés sur galactose pour faire perdre le chromosome conditionnel puis sur 5-FOA pour sélectionner les colonies ayant perdu le chromosome. Les hybrides ayant perdu leur chromosome vont répliquer celui restant par endoduplication (Alvaro *et al.*, 2006).

### 2.2.3-Sélection des hybrides ayant perdu un chromosome

La sélection négative par l'utilisation du 5-FOA (5-fluoroorotic acid) a été utilisée pour sélectionner les hybrides ayant perdu un chromosome (figure 3). Le 5-FOA sélectionne les diploïdes qui ont perdu le gène *K. lactis URA3*. Le gène *URA3* code pour l'enzyme orotidine 5-phosphate décarboxylase (ODCase). L'activité de l'ODCase convertit le 5-FOA en 5-fluorouracil, un composé toxique pour la levure (Boeke *et al.*, 1987). La sélection négative correspond donc à la mort des cellules en présence de 5-FOA dans le milieu. Les diploïdes sur YPGal ont été répliqués à l'aide de velours sur milieu synthétique sans uracile contenant du 5-FOA (1 mg/ml) une première fois et incubés à 30 °C pendant 2 jours. Certaines colonies qui semblaient avoir mieux poussé ont été repiquées une deuxième fois sur milieu avec 5-FOA et incubé à 30 °C pendant deux jours à nouveau. Ainsi, les colonies ayant poussé sur ce milieu devraient avoir perdu le chromosome conditionnel.

### 2.2.4-Confirmation de la perte des chromosomes

La confirmation des hybrides ayant perdu les chromosomes de *S. cerevisiae* a été faite par PCR sur colonie et par digestion d'ADN. Ce type de PCR consiste à toucher légèrement la colonie à tester avec un embout stérile et de la resuspendre dans du NaOH 20 mM. L'échantillon est chauffé dans un thermocycleur pour lyser les cellules et extraire l'ADN qui servira de matrice pour la PCR habituelle. Des paires d'amorces ont été construites pour chaque chromosome, soit 16 paires, de façon à amplifier un fragment d'environ 500 pb pour chaque chromosome (tableau 2). Elles ont été utilisées pour les deux espèces et construites également de façon à amplifier une section d'ADN qui possède un site de restriction EcoRI chez *S. cerevisiae* seulement. Les amorces ont été alignées contre une banque de *S. paradoxus* afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de site EcoRI présent dans l'amplicon issu de la souche utilisée. La perte de chromosomes est donc visible selon le nombre de bandes présentes sur le gel d'agarose suite à la digestion de l'ADN. Puisque le site de restriction se retrouve seulement sur l'allèle de *S. cerevisiae*, il y aura deux bandes visibles sur gel d'agarose correspondant à cette espèce, une bande pour *S. paradoxus* et trois bandes pour l'hybride (figure 4). Les hybrides ayant perdu le chromosome de *S. cerevisiae* vont donc avoir une seule bande visible, correspondant au

chromosome de *S. paradoxus*. Afin de contre-vérifier la perte de chromosome, chaque hybride ayant poussé sur 5-FOA a été testé avec les amorces correspondant au chromosome qu'il doit avoir perdu, mais aussi avec toutes les autres paires d'amorces. Ainsi, suite à la digestion par EcoRI, une seule bande devrait apparaître sur le gel pour le chromosome perdu, tandis que dans tous les autres puits, il devrait y avoir trois bandes puisque les chromosomes ne devraient pas être perdus. Les produits PCR digérés ont été visualisés sur gel d'agarose 2 % suite à une électrophorèse d'une durée de 30 min à 110 V et 400 mA.

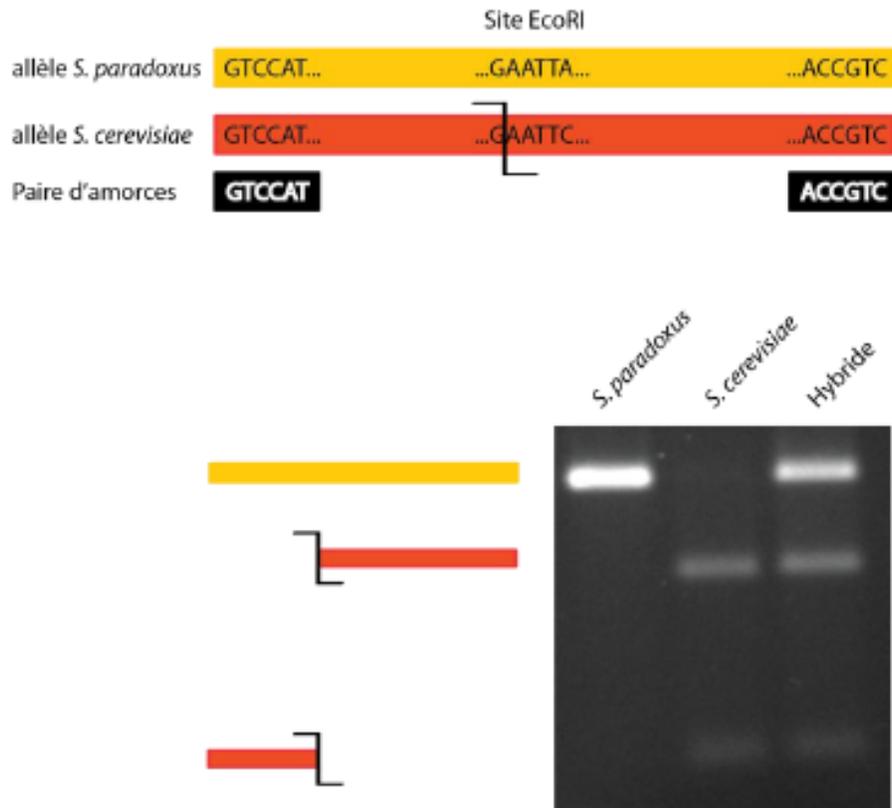
#### 2.2.5-Mesure du taux de croissance sur milieu solide

Des tests de croissance sur milieu solide ont été effectués afin de visualiser la différence entre les hybrides normaux et ceux ayant perdu un chromosome. Des précultures ont été faites des hybrides normaux et déstabilisés ainsi que des parents diploïdes dans 3 ml d'YPD à l'aide de plaques 24 puits profonds. Les souches ont poussé toute la nuit à 30 °C avec agitation. Le lendemain matin, les cultures ont été ramenées à une même densité optique de 0,1. Puis, des séries de 8 dilutions 1/4 ont été effectuées et 3 µl de culture ont été déposés sur les plaques. Chaque série a été répliquée sur deux plaques d'YPD, l'une incubée à 30 °C et l'autre à 37 °C pendant une journée. De plus, les souches ont été répliquées sur une plaque d'YPD contenant 10 mM de CuSO<sub>4</sub>. La croissance des souches a été testée sur ce milieu afin de vérifier si la méthode permet de voir l'effet d'un gène important sur un phénotype. La capacité de croître sur un milieu avec du cuivre provient de la duplication du gène *CUPI* sur le chromosome 8 chez *S. cerevisiae* (Fogel et Welch, 1982). Ainsi, l'implication d'un gène dans la capacité à croître à 37 °C pourrait être visualisée par test de croissance sur milieu solide. Cette plaque a été incubée à 30 °C pendant une journée.

**Tableau 2.** Amorces de vérification de la perte des chromosomes de *S. cerevisiae*.

Chromosome/Gène	Aval (5'-3')	Amont (5'-3')	Longueur Sc* (pb)	Longueur Sp* (pb)	Position EcoRI (pb)
Chr1/YAL012W	AGACCTTATCAA GAAGCACG	ACCACCCTTG ATTCTGAAGG	463	463	322
Chr2/YBR267W	AATGGCGGAAA GAGTAATGC	CCAACCTTTGAT GCCTGTCCG	513	513	334
Chr3/YCR034W	TCACTCGTTACT CAATATGC	TAGCGAAGTA TAACCCGTGC	400	400	156
Chr4/YDR127W	ATGGATGAATTG ACTGATGC	GCGGCTTCCA ATAAGGTTGG	470	470	288
Chr5/YER141W	GGTATTGTTGTT CTTGGTGG	AACCAGTCCA GAGCATAACC	487	487	155
Chr6/YFL036W	TCAGAATTAGAG TTTGACCC	AGGCTTCAAAA AGCATCGAGC	381	381	206
Chr7/YGL197W	ACAAAATGTCAAT GGCATAACC	ACAAAATACCC TCCAGAATCG	440	440	155
Chr8/YHR035W	TGAAAGCATGA GACAAAACC	GACAATAGCG TTCTTTGCGG	322	322	121
Chr9/YIR027C	CAAGTCTCTGTT GTGACTGG	CGCTAAATGC TATTCCTCCC	517	517	320
Chr10/YJL106W	TGAAAACACCGT GGCATCCC	CATCCTTTTCA GGAATTTC	509	509	247
Chr11/YKL124W	TCTTTTCATTGG AATTGGCG	GAGATCTTTC ATACGTCCC	477	477	284
Chr12/YLR056W	CTTGTACGCTAA AGTTCTGC	GCCAACTTGA TTTCCATTGC	381	381	229
Chr13/YML048W	ATTGATTCCTGT AGCCAAGC	CCAGCCACAA GTTGGATACC	441	447	237
Chr14/YNL021W	ATACTATCCTGG GACCATCC	TAGTTCATCAG GAGGCTCCC	385	385	151
Chr15/YOL027C	TGTTATCGTTAC CAAATGGC	TTCGCTTTGAA ACTCTTCCC	367	367	256
Chr16/YPL188W	GTACGTTGGATT CACATTCC	AAGTATATGA GGTCGGTTGG	335	335	206

\*Sc = *Saccharomyces cerevisiae*Sp = *Saccharomyces paradoxus*



**Figure 4.** Méthode de confirmation de la perte des chromosomes. Les paires d'amorces s'apparient 2 allèles, mais il y a un site de restriction EcoRI seulement dans l'allèle de *S. cerevisiae*. Après digestion par EcoRI, il y aura une bande pour *S. paradoxus*, deux bandes pour *S. cerevisiae* et trois bandes pour l'hybride parental.

### 2.2.6-Mesure du taux de croissance en milieu liquide

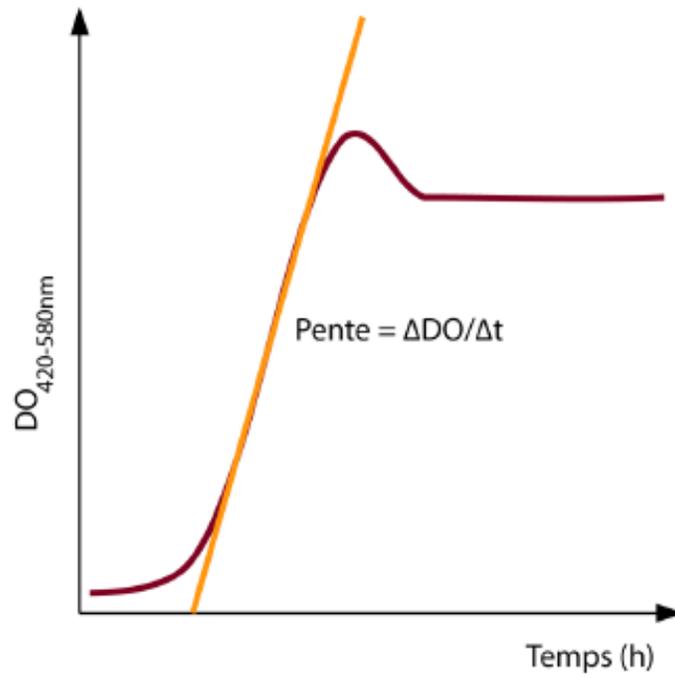
Les tests de croissance en milieu liquide ont été effectués à l'aide du Bioscreen C, un appareil de mesure de densités optiques. Le taux de croissance des souches a été mesuré à 30 °C et 37 °C à deux reprises. Des précultures ont été faites des souches déstabilisées et parentales ainsi que des parents haploïdes (quatre réplicats) dans 600 µl d'YPD à l'aide de plaques 96 puits. Les souches ont poussé toute la nuit à 30 °C avec agitation. Le lendemain, les densités optiques des cultures ont été mesurées à 600 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Infinite f200 PRO, TECAN) et ramenées à une densité de 0,1 pour un volume final de 150 µl. La position des souches dans la plaque de lecture a été faite de façon à ce que chaque souche déstabilisée soit directement comparée avec la souche normale. Ainsi, les deux souches avaient réellement la même densité optique et celle-ci n'a pas été modifiée par le temps de manipulation. Les mesures ont été prises à 420-580 nm aux 15 minutes et sans agitation. Les tests ont duré 2 jours chacun. Les témoins utilisés sont les souches MG020, MG009 et MG013 (tableau 1). Le taux de croissance a été estimé par la pente de la courbe de croissance. Les pentes des différentes courbes ont été comparées entre elles. Les courbes obtenues ont été analysées selon la méthode décrite par Hill et Otto (2007) avec le logiciel R (R Development Core Team, 2008). La figure 5 montre la courbe de croissance avec le paramètre utilisé, soit la pente. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée pour chaque chromosome (Annexe 1). Le premier facteur est l'effet de la perte du chromosome sur le taux de croissance (effet du chromosome). Le deuxième facteur de l'ANOVA est l'effet des deux températures sur le taux de croissance (effet de la température). Il a fallu prendre en considération les deux effets, c'est-à-dire d'aller vérifier si le fait de perdre le chromosome engendre une plus grande diminution du taux de croissance à 37 °C comparativement aux hybrides normaux (interaction entre chromosome et température).

### 2.3-Tests de croissance avec perte de gènes

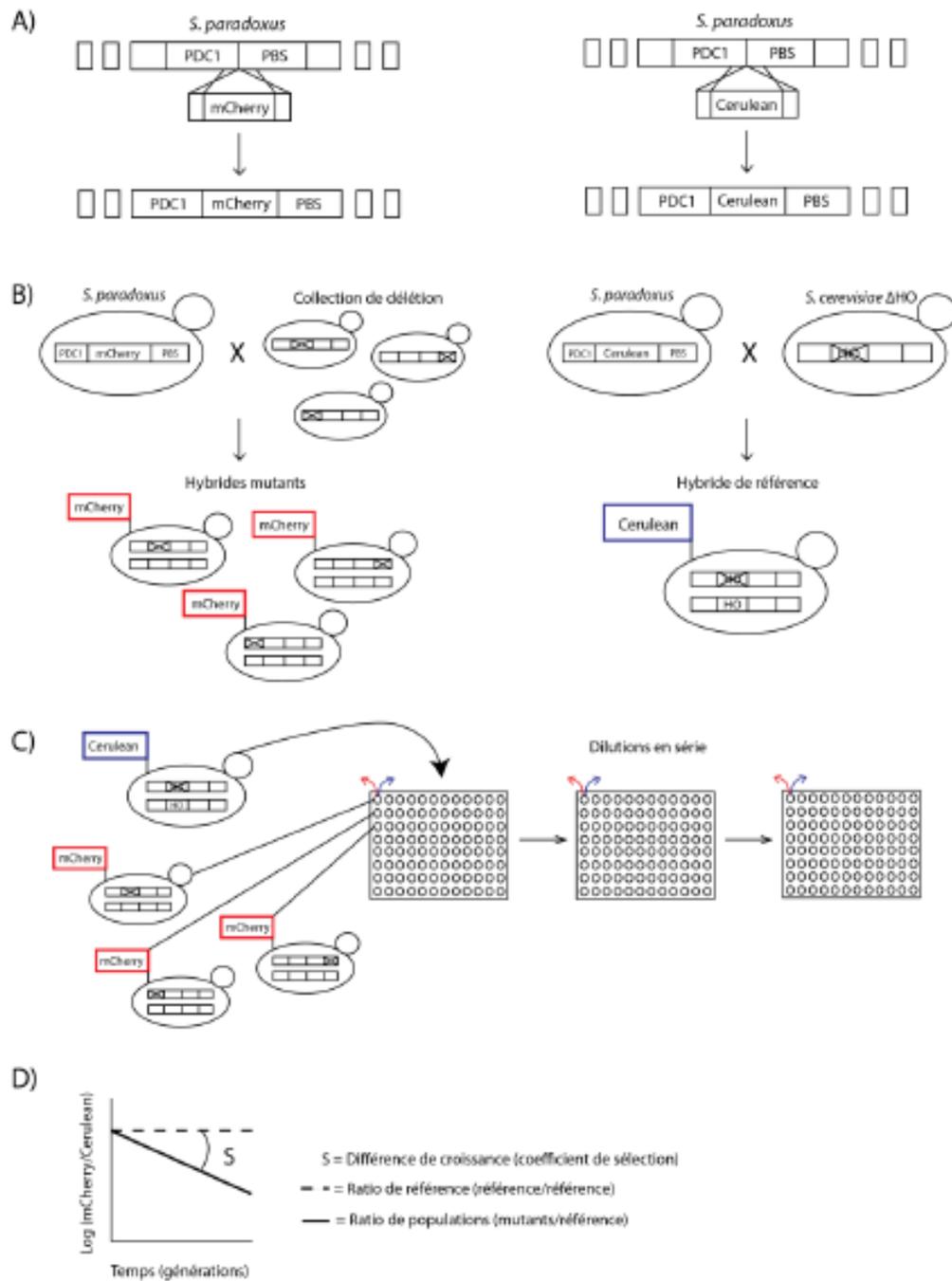
#### 2.3.1-Croissance en milieu liquide avec fluorescence

La mesure de la comparaison de croissance à 30 °C et 37 °C a été établie selon la méthode de DeLuna *et al.* (2008). Le résumé de la méthode est illustré à la figure 6. Tous les gènes non essentiels ont été testés grâce à une collection de délétion de *S. cerevisiae*.

Cette dernière contient 4700 souches haploïdes *MATa* réparties sur des plaques de 96 puits. Chaque souche possède un gène remplacé par une cassette KanMX (Giaever *et al.*, 2002). Cette cassette permet aux levures de croître en présence de l'antibiotique G418 (200 µg/ml).



**Figure 5.** Courbe de croissance illustrant la pente qui a été utilisée comme taux de croissance.



**Figure 6.** Sommaire de la méthode pour la mesure du taux de croissance des hybrides en compétition. A) Insertion des cassettes de fluorescence dans le génome de *S. paradoxus* par recombinaison homologue à la suite du locus *PDC1*. B) Croisements de *S. paradoxus*-mCherry (MG070) avec la collection de délétion de *S. cerevisiae* et *S. paradoxus*-Cerulean (MG071) avec *S. cerevisiae*  $\Delta$ HO. C) Dilutions en série et mesures du taux de fluorescence. D) Détermination des gènes candidats par la différence de croissance entre la souche de référence et les hybrides mutants.

### 2.3.2-Construction des souches

Les souches de levures dans lesquelles ont été intégrées les cassettes de fluorescence (mCherry et Cerulean) sont la souche de *S. cerevisiae* BY4742 (*ura3 leu2 his3 lys2*) et la souche de *S. paradoxus* JRY9134 (*ho::NAT lys2 ura3*). Les deux souches sont de type *MATa*. Toutefois, les souches de *S. cerevisiae* ont été construites dans l'éventualité d'expérimentations futures où elles seraient nécessaires, mais elles n'ont pas été utilisées dans la mesure du taux de croissance à haute température.

Les plasmides mCherry (pBS35) et Cerulean (pBS10) ont été extraites d'*E. coli* par Miniprep (GEN Elute Plasmid Miniprep Kit, Sigma), puis amplifiées par PCR. Des amorces spécifiques pour *S. cerevisiae* et *S. paradoxus* ont été construites (tableau 3). Les amorces en amont, CLO3-79 pour *S. paradoxus* et CLO3-77 pour *S. cerevisiae*, sont composée de 43 nucléotides homologues à la fin du gène *PDC1* et de 17 nucléotides en amont des cassettes (même séquence pour les deux plasmides). Les amorces en aval, CLO3-80 pour *S. paradoxus* et CLO3-78 pour *S. cerevisiae* sont composées de 43 nucléotides homologues à la séquence qui suit la fin du gène *PDC1* ainsi que 17 nucléotides homologues à la fin des cassettes. Ainsi, les cassettes sont intégrées par recombinaison homologue après le gène *PDC1* dans les deux espèces. L'amplification a été vérifiée sur gel d'agarose 1 % à 110 V, 400 mA pendant 50 minutes. Les cassettes mCherry et Cerulean amplifiées par PCR ont été purifiées et concentrées sur colonne (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen).

Afin d'intégrer les cassettes dans le génome, les cellules de *S. paradoxus* et de *S. cerevisiae* ont été rendues compétentes en rendant la membrane cellulaire plus perméable afin de faciliter le passage d'ADN à l'intérieur de la cellule. Le protocole est basé sur celui de Gietz et Woods (2002). Une culture de 50 ml de chaque espèce a été incubée jusqu'à une densité optique entre 0,5 et 0,7, puis a été centrifugée pendant 5 min à 500 g. Les cellules sont lavées avec 5 ml d'eau stérile, centrifugées à nouveau et lavées avec 5 ml SORB stérile (100 mM LiOAc, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA et 1 M sorbitol). Le SORB est retiré par aspiration et les cellules sont resuspendues dans 360 µl de SORB et

dans 40 µl de « carrier DNA » bouilli et refroidi sur glace (sperme de saumon à 10 mg/ml).

Des aliquotes de 20 µl ont été préparés et congelés à -80 °C. Les cassettes ont été intégrées dans le génome de *S. paradoxus* et de *S. cerevisiae* par transformation selon le protocole de Rose M. (1990). D'abord, 5,5 µg de cassettes mCherry et Cerulean ont été ajouté à des aliquotes de cellules compétentes de *S. paradoxus* et 2 µg pour *S. cerevisiae*. Puis, les souches ont été mélangées à 100µl de « plate mixture » (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA/NaOH pH 8, 40 % PEG3350). Les cellules ont été incubées pendant 30 min. Puis, 15 µl de DMSO a été ajouté à *S. cerevisiae*, mais seulement 7,5 µl pour *S. paradoxus*. En effet, des tests ont montré que ce volume est optimal pour *S. paradoxus*, puisque plus de colonies transformées sont obtenues. Les cellules ont été à nouveau incubées, mais à 37 °C pendant 20 min pour *S. paradoxus* et à 42 °C pendant 15 min pour *S. cerevisiae*. Elles ont par la suite été centrifugées (2000 rpm, 3 min) et le surnageant a été aspiré. Du YPD a été ajouté (100 µl) à chaque tube et *S. paradoxus* a été incubé à 25 °C et *S. cerevisiae* à 30 °C pendant 4 h. Par la suite, les cellules ont été étalées sur milieu sélectif YPD avec hygromycine (250 µg/ml), le marqueur HPH (résistance à l'hygromycine) étant présent dans les deux cassettes. Les souches de *S. paradoxus* ont été incubées à 25 °C pendant 3 jours tandis que celles de *S. cerevisiae* ont été incubées à 30 °C pendant 3 jours.

La confirmation de l'intégration des cassettes au locus *PDC1* des deux espèces s'est faite par PCR sur colonie. L'amorce diagnostique Tefterm\_F a été utilisée en amont et correspond à la séquence finale des deux cassettes. L'amorce diagnostique utilisée en aval est CLOP19-G2 et correspond à une séquence suivant le gène *PDC1* dans une souche normale. Les amorces diagnostiques ont servi pour les deux espèces et les deux cassettes (tableau 2). L'amplification a été visualisée sur gel d'agarose 1,25 %, 110V, 400 mA pendant 50 minutes.

**Tableau 3.** Amorces utilisées pour l'intégration des cassettes Cerulean et mCherry dans le génome de *S. paradoxus*.

Nom	Séquence (5'- 3')	Description
CLO3-77	ttggttgaacaagctaagttgactgctgctaccaacgct aagcaaggtgacacggatccccggg	S'apparie à la fin du gène <i>PDC1</i> de <i>S. cerevisiae</i> et le début de la cassette Cerulean ou mCherry
CLO3-78	aaaaatgctataaaaactttaactaataattagagattaa tcgcatcgatgaattcgagctcg	S'apparie à la séquence qui suit le gène <i>PDC1</i> de <i>S. cerevisiae</i> et la fin de la cassette Cerulean ou mCherry
CLO3-79	ttggttgaacaagctaagttgactgctgctaccaacgcc aagcaaggtcgacggatccccggg	S'apparie à la fin du gène <i>PDC1</i> de <i>S. paradoxus</i> et le début de la cassette Cerulean ou mCherry
CLO3-80	cataaaaatgctataaaaactttaactaataagagattaa atagcatcgatgaattcgagctcg	S'apparie à la séquence qui suit le gène <i>PDC1</i> de <i>S. paradoxus</i> et la fin de la cassette Cerulean ou mCherry
Tefterm_F	ccagatgcgaagttaagtgc	Diagnostic la présence de n'importe quelle cassette avec terminateur TEF en 3'
CLOP19-G2	cttgagcaattgcagagtcg	Diagnostic la cassette mCherry/Cerulean pour <i>S. cerevisiae</i> et <i>S. paradoxus</i>

L'intégration des deux cassettes a également été confirmée par microscopie à fluorescence. D'abord, des précultures des souches à tester ont été faites dans 5 ml d'YPD dans des tubes en verre de 10 ml. Les souches ont poussé à 30 °C pendant la nuit avec agitation. Le lendemain, 500 µl des cultures ont été centrifugées puis resuspendues dans 100 µl de milieu à basse fluorescence (sans riboflavine et acide folique). Une quantité de 5 µl de cette culture a été déposée sur une lame puis scellée avec une lamelle et du vernis à ongles. L'observation de fluorescence s'est faite avec un microscope optique à fluorescence/Apotome Zeiss Observer Z1 avec filtres. Le filtre utilisé pour observer la fluorescence des souches avec la cassette Cerulean d'intégrée dans le génome est le filtre 436/480 nm et celui utilisé pour les souches avec la cassette mCherry d'intégrée dans le génome est le filtre 560/630 nm.

### 2.3.3-Croisements

L'hybride de référence a été obtenu en croisant la nouvelle souche de *S. paradoxus* MG071 (*ho::NAT lys2 ura3 PDC1::Cerulean-HPH*) avec la souche de *S. cerevisiae* BY4741 ayant le gène *HO* inactivé (*ho::KanMX ura3 leu2 his3 met15*) afin d'obtenir l'hybride de référence. L'hybride MG075 ainsi construit a servi de témoin puisque le gène *HO* sert à changer de type sexuel et n'interfère pas avec la croissance. Le croisement a été fait dans 5 ml d'YPD liquide et incubé à 30 °C pendant une journée avec agitation. Le croisement a par la suite été étalé sur un milieu sélectif, soit YPD avec hygromycine (250 µg/ml) et G418 (200 µg/ml). La sélection s'est faite à 30 °C pendant 2 jours. Les souches parentales ont également été étalées sur le milieu sélectif comme témoins.

La souche de *S. paradoxus* MG070 (*ho::NAT lys2 ura3 PDC1::mCherry-HPH*) a été croisée contre la collection de délétion de *S. cerevisiae*. Pour ce faire, une préculture de MG070 a été faite dans 15 ml d'YPD dans un tube de 25 ml, incubée à 30 °C pendant la nuit avec agitation. Le lendemain, la culture a été centrifugée et resuspendue dans 5 ml, puis 800 µl ont été étalés sur une plaque d'YPD avec hygromycine (250 µg/ml) pour faire un tapis. La plaque a été incubée à 30 °C pendant 2 jours. Par la suite, à partir de cette plaque, la souche MG070 a été croisée contre la collection de délétion sur une

plaque d'YPD à l'aide d'outils de repiquage. L'un d'eux possède 96 tiges de métal permettant ainsi de croiser 96 souches à la fois. Un guide permet d'avoir quatre positions sur la plaque cible. Cela permet donc de condenser 4 plaques de la collection de délétion sur une plaque, obtenant ainsi 384 souches. Les croisements se sont faits avec un autre outil de repiquage, celui-ci ayant 384 tiges de métal. Il a d'abord été déposé sur le tapis de *S. paradoxus* et ensuite sur la plaque d'YPD cible. L'outil est stérilisé en le trempant dans une série de bains, c'est-à-dire un bain d'eau de javel avec des billes de verre, un bain d'eau stérile et un bain d'éthanol. Puis, l'outil est déposé sur la plaque des 384 souches condensées de *S. cerevisiae* de la collection de délétion et est déposé à nouveau sur la plaque cible. Toutes les plaques ont été croisées ainsi. Les plaques ont été incubées à 30 °C pendant une journée. La sélection des hybrides s'est faite également avec l'outil de repiquage 384. Les plaques de croisements ont été répliquées sur un milieu de sélection d'YPD avec hygromycine (250 µg/ml) et G418 (200 µg/ml) puis incubées à 30 °C pendant 2 jours. Une deuxième sélection a été faite avec la même méthode.

#### 2.3.4-Mesure des taux de croissance des souches en compétition

Les hybrides mutants (mCherry) ont été incubés dans 150 µl d'YPD dans des plaques 96 puits tandis que l'hybride de référence (Cerulean) a été incubée dans 500 µl d'YPD jusqu'à saturation. Les cultures saturées des hybrides mutants ainsi que celle de référence ont été mélangées avec un ratio 1:1 dans un volume final de 150 µl dans des plaques 96 puits. Le jour suivant, les cultures en compétition ont été diluées 32 fois (5 µl dans 155 µl) avec du milieu de culture à basse fluorescence frais et incubées pendant 16h jusqu'à saturation. Les cellules ont été à nouveau diluées dans une nouvelle plaque avec du milieu à basse fluorescence. Les cultures ont étéensemencées en parallèle à travers 6 cycles de dilution à l'aide d'un système robotique automatique (Freedom EVO, TECAN) consistant en un agitateur de microplaques, un manipulateur de liquide un lecteur de plaques et un incubateur. La fluorescence et l'absorbance ont été mesurées à 600nm aux 2 heures. Les cultures témoins ont été incubées à 30 °C tandis que celles pour l'expérience à 37 °C. Un total de 4032 cultures en compétition a été effectué, représentant 42 plaques de la collection de délétion de *S. cerevisiae* croisées avec la souche de *S. paradoxus* MG070. Les échantillons ont été divisés en deux groupes de 22 plaques,

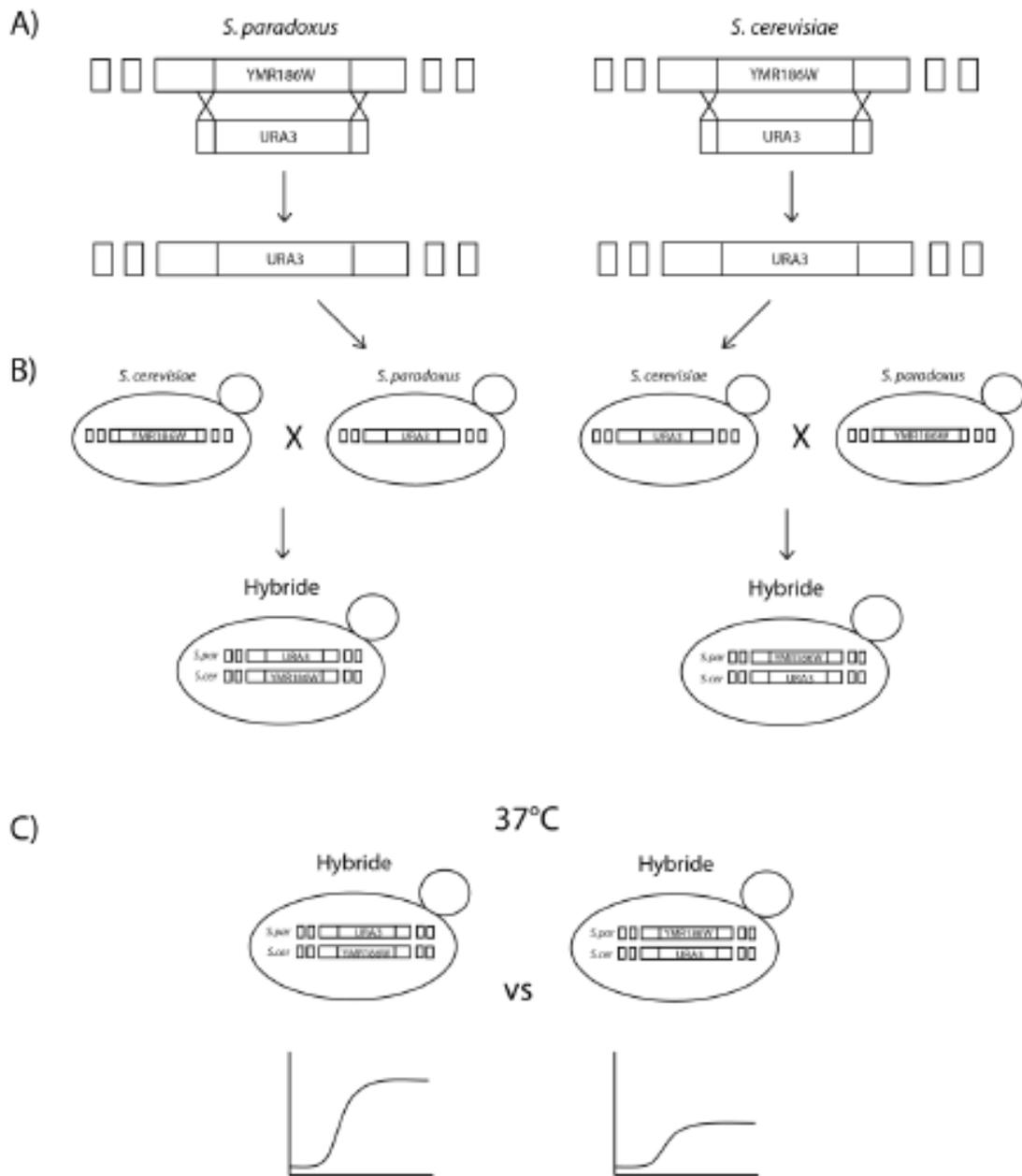
consistant en 21 plaques d'hybrides à tester et une plaque témoin. Les deux groupes ont été espacés d'un cycle de 16h, un groupe étant mesuré pendant que l'autre poussait jusqu'à saturation. Le coefficient de sélection, la différence du taux de croissance entre les deux hybrides, est déterminé par la méthode des moindres carrés du ratio de fluorescence sur plusieurs cycles de dilutions. L'équation pour le calculer est donc:  $s = d/dt[(\log(N_{mCherry}/N_{Cerulean})/\log 2)$ , où t est mesuré en générations (5 par cycles) (DeLuna *et al.*, 2008).

#### 2.4-Comparaison de la croissance entre hybrides réciproques

Afin de vérifier l'effet des gènes de *S. paradoxus* sur la capacité à croître à 37 °C, la comparaison entre l'hybride dont l'allèle de *S. paradoxus* est inactivé et l'hybride dont l'allèle de *S. cerevisiae* est inactivé a été effectuée (figure 7).

##### 2.4.1-Construction des souches

Des amorces ont été conçues de façon à amplifier la cassette de remplacement *URA3*, en utilisant le plasmide pUG72 (Gueldener *et al.*, 2002), par PCR ainsi que les régions en amont et en aval des 30 gènes ayant le coefficient de sélection le plus négatif. Toutefois, les gènes YPR195C et YNL171C n'ont pas d'orthologues chez *S. paradoxus* et des amorces n'ont donc pas été construites. Les gènes ainsi que les amorces utilisées sont énumérés dans les tableaux 4 et 5. La souche de *S. cerevisiae* utilisée est BY4741 (*MATa ura3 leu2 his3 met15*) et la souche de *S. paradoxus* utilisée est JRY9134 (*MATa ho::NAT lys2 ura3*). Chaque gène de *S. cerevisiae* et de *S. paradoxus* a été inactivé par transformation à l'aide de cellules compétentes. Les deux souches ont été transformées avec 5 µg de cassette *URA3*. Elles ont été étalées sur milieu sélectif sans uracile à l'aide de billes de verres et incubées à 30 °C pour *S. cerevisiae* et à 25 °C pour *S. paradoxus* pendant 4 jours. La souche témoin MG149 a été construite à partir de la souche BY4741 de *S. cerevisiae* avec le même protocole, soit en intégrant la cassette de sélection *URA3* au locus *HO* (*MATa ho::URA3 ura3 leu2 his3 met15*). L'insertion de cette cassette permet d'avoir une souche avec le même profil génétique que les autres, mais sans délétions de gènes candidats. Les souches haploïdes avec délétion sont énumérées dans les tableaux 6 et 7.



**Figure 7.** Construction des hybrides réciproques. A) Délétion des gènes par insertion du marqueur *URA3* chez les deux espèces. B) Croisements des nouvelles souches contre l'autre espèce sans délétion. C) Comparaison du taux de croissance à 37 °C entre les deux hybrides mutés pour un allèle différent.

**Tableau 4.** Amorces utilisées pour la délétion des gènes de *S. cerevisiae*.

Gènes	Amorces		
	Amont (5'-3')	Aval (5'-3')	Diagnostique (5'-3')
YDR076W	ataagaaaagaacttattaataatataatataatga aaatcagctgaagcttcgtacgc	Tttttattgtttcggtttcggttttttatttactagc ataggccaactagtgatctg	ctgtattgaagatagacgac
YOR344C	acaataacacactatcaaatcttcaagtttaac aattcagctgaagcttcgtacgc	atcgtaatttataatattggtgtttaagcaagcgtg cttgcatagggcactagtggatctg	ggctatgaaccacgcgtc
YDR123C	gacgtgcaataaataatacatggaacagcaaaag gagaacacgtgaagcttcgtacgc	caacgggagggccattttcactactaatagctt gagcgcataaggccactagtggatctg	ggatcgagtgcccttccat
YHR073W	gtagtaaaacgaactggaatgacagcctgcgaat cgaattcagctgaagcttcgtacgc	caaaggggggaaaaaagttcactgatgcatca aggcatgcatagggcactagtggatctg	gacacgtaacctggcacc
YDR127W	ctagtga gaaatccctacgtaagataattgtatatt acgcagctgaagcttcgtacgc	aagcattgtaaaatataaaaaaggatagatata ttgtgcataggccactagtggatctg	agacctgccgactggc
YPR128C	ccctggaagcctagggcaagattgttacgagcatat catcacagctgaagcttcgtacgc	tctaaacgcaatgtgcttattcaataatgtaagg attgcataggccactagtggatctg	ccggaatacagtgccgcc
YMR284W	tgtaagtgacttaagcctgattttaaaggga tattcagctgaagcttcgtacgc	ttgatgtaacgttatagatgaagattcaatc tctgcataggccactagtggatctg	ccgtttgacaacaggctc
YOR297C	atcgaggtgcaacaactgagtaatttaaccttt ggtagcgtgaagcttcgtacgc	aatctgaagaatgcaaaaaaaagaaatg ggtaggcatagggcactagtggatctg	ctgtttgaaactggaccctag
YBL072C	tactacaagcgtcattaattttctattacagttaca aacagctgaagcttcgtacgc	aggagaagaaagaaaaaattgtagtatttcat ttcatgcatagggcactagtggatctg	cagcagacaccgcctgtg
YMR164C	taaactgcagtgaaataagaaaaaggatgat aaagatcagctgaagcttcgtacgc	gaagaatgacgatgaacacttttggtttaata gtgcatagggccactagtggatctg	gatgattgtacgtaccaag
YMR215W	tcgatcaaaagcagcagctcctcaaaagctg agcgcagctgaagcttcgtacgc	aaacaagtcctggatgttcaaaaaatacatga gcagcgcataggccactagtggatctg	ctgatgcaagtgctgg
YBR224W	tctattctcactcaaatctgttctgattagtaa atcagctgaagcttcgtacgc	gttaaccccctatcattctactcaatgtttt gcatagggcactagtggatctg	gcttatctgaatgatggc
YIL007C	gagtaaaaaggagcaagaattagaataagaacg aactacacagctgaagcttcgtacgc	agtaataactgattgttttttagtacatgacga agagcataggccactagtggatctg	gcagacggtaggagac
YOR043W	taaagataaagggtgctgagcttacactattataa acacagctgaagcttcgtacgc	cgatcttctcatttcttctataatattatatac catagggcactagtggatctg	tgcaagctgcatcacag
YHR075C	aacaaaactgtagtaacggtaggacattttcaaat ttcacagctgaagcttcgtacgc	attctatcataaataaagataaaagtgatattaa cccgcataggccactagtggatctg	cgaagaagttttacaaagg
YIL065C	catagaagcacagatcagacacagccatacaa cataagtcagctgaagcttcgtacgc	tcttatgtagtacgatgtgctgatttttagtgc gcatagggcactagtggatctg	cgctaaaccaacagctccc
YBL058W	agaaactgcgtagcacaacaattaactcattatt aggtagcgtgaagcttcgtacgc	gtfgaatctttccctgtttttagtattatgc gcatagggcactagtggatctg	ggcacaatgctgcacgc
YER090W	ataatagcactgataattctgattgaaaaaggca aaaacagctgaagcttcgtacgc	aaaatgctcgttaagggaaaaaaagagaatg cccttgcataggccactagtggatctg	gtgtagttttattccgtg
YIL077C	gttttaaggagcgcctaatttcaagcgtagaaca aggtagcagctgaagcttcgtacgc	tatacaaaatagtgaccatacgtattactccgt cgtgcataggccactagtggatctg	tggtgttcaccggcagtg
YIL028W	gcattaaagaggctgctgctggtgtaaaaaaggc aataaccagctgaagcttcgtacgc	cacacaccgcagctggtgctgacgacgttac ccaatggcatagggcactagtggatctg	cctatttctgaatcatgg
YIL005W	aaaaatactatctataaaaactgctgtaaggcag cagcccaagctgaagcttcgtacgc	agatacagcattcttttttataactacttaagc tgcataggccactagtggatctg	ggattgcatcgaacagccc
YOR347C	cctctacgtcattgtaagattacaacaaaagcact atcgagctgaagcttcgtacgc	aaataaaaatgtaaaaaaaataaggacttaatt ttagcatagggcactagtggatctg	caggatcattcaggcttc
YIL042C	ataactggagacgtggtatcaagacgccttac ggtagcagctgaagcttcgtacgc	agccctaatgtgaccgctttacgaggaatttag actggcataggccactagtggatctg	gggagatgctcgtcacctg
YMR077C	ctgctgaattaacctcacttggctttgtatatac gacagctgaagcttcgtacgc	cattcccttatttttaatttgaagctacatacagac atgcatagggcactagtggatctg	tgaaggctacgatgctgtg
YOR096W	tttaagaaagctgaaaggaa gaaa gatcatcac aacaaaccagctgaagcttcgtacgc	ttactaactaataaataagattatgatattatatta agcatagggccactagtggatctg	ggcaatcatacggcgtg
YIL038C	ttagattttgaaagattcattgtattgtagcagcga ccagctgaagcttcgtacgc	tgtttaaaaggatgacacattttttttattgattag catagggcactagtggatctg	gtattatgctcacctccac
YFL034W	cagagftaaaagaagattaaacattacagact aaaagcagctgaagcttcgtacgc	atgtgctcatgatagatcatttataaataaaaa catgcatagggccactagtggatctg	catccattcgctcgcgtg
YMR186W	acgctacagaaccaatagaaaaataaatcattct gaaatcagctgaagcttcgtacgc	aattatataatataaaaacatgaagggcaaaaa gagagcatagggccactagtggatctg	tggacgccgaattgctcc

**Tableau 5.** Amorces utilisées pour les délétions des gènes de *S. paradoxus*.

Gènes	Amorces		
	Amont (5'-3')	Aval (5'-3')	Diagnostique (aval)
YDR076W	tgagtgaagaggactcttagtaataagtaatatgg aaaacagctgaagcttcgtacgc	atttcttattgtttcgggttccggtttcactctgcca gcataggccactagtggatctg	cgatggtgattagtacag
YOR344C	acaacaacataccatcatatctattcaagttaac aattcagctgaagcttcgtacgc	taicgtaattttataatattggcgftaaagcaggcttt ctgcataggccactagtggatctg	ccttctctggtggaggg
YDR123C	gacgtgcaataaataatacatggaacagcagaga gaaaaaca gctgaagcttcgtacgc	taaagtgatgaaattgctattactgtggctcccgtt atcgcataggccactagtggatctg	cacaaacctatctactttg
YHR073W	atagtaaatcga gcttgagtagcagcctgcgattc aaattcagctgaagcttcgtacgc	ggtaaaaaagtaacaagaacagttgatatcatcgt ggcgtgcataggccactagtggatctg	tacaagattcgtgtgacg
YDR127W	ctagtga gaaatccctacgtaagataattgtataft acgcagctgaagcttcgtacgc	aattattgtaagatggtgaaaggataggtatacta tctgcataggccactagtggatctg	ctatctgtaaccgtacc
YPR128C	ttttaaagctaggttgagattgttacgaacgcatc atcacagctgaagcttcgtacgc	tctaaacgcaatgtgccttattttagtaggatgatt ttcgcataggccactagtggatctg	tTctggctactttccacac
YMR284W	ttgataaatcgttaaacctaaagtttaagacggga tattcagctgaagcttcgtacgc	ttttatgtaaccgatgtaggagcgggatttactc gtctgcataggccactagtggatctg	cggctattcaticatatttc
YOR297C	gacgtgagttgcaacaactaggcaattggaacttg tggtagcagctgaagcttcgtacgc	aaggccttgaaaatgcaaaa caagaatgcatg gataaggcataggccactagtggatctg	gcaatcttgggtcagggctc
YBL072C	tactaactagcgtcattgataattttgtacagttaca aa cagctgaagcttcgtacgc	agatgagaagagaaaaacattcatagattttcattt catgcataggccactagtggatctg	gtagggtagctgtctcc
YMR164C	tagactgcagtgaaataaggaaaaaggtgcatgat aaagatcagctgaagcttcgtacgc	acggagagaataacgatgaaaattt gctgcttatta atgtgcataggccactagtggatctg	gctatac gatgacgttacg
YMR215W	gtctcctaaagattagacttaaaagctgtgaaact gacgcagctgaagcttcgtacgc	gaaaaataactccatggatgtttcaaaa gttcatgga catgcataggccactagtggatctg	cctctgattgtccactgc
YBR224W	cggtgcatctaaatctttctccgatcagcaaatca att cagctgaagcttcgtacgc	ggccgactaaactgcgaaaatggtgacttaata aaaggtgcataggccactagtggatctg	ctttctccgtagctgctg
YIL007C	aagtaaacggagcaggattagaataggaacc gaccgtacagctgaagcttcgtacgc	aataactaataattagattgatttttagtacagcaga agagcataggccactagtggatctg	cggtgcacggtggctaaag
YOR043W	aaagatagagggtatttgagcttacactattataaa acgcagctgaagcttcgtacgc	cctctctttctattttcttctataatattatatacacg cataggccactagtggatctg	gaaggaaatcaagacac
YHR075C	taaacgtcactgacagtaggaacatttccagatttt tcacagctgaagcttcgtacgc	cataaaaacgatataaaaagt gatatcaacgttcgt acatgcataggccactagtggatctg	ccgggcaatgggatacaca
YIL065C	ataaaaaagcagatcagacacaacca gaagaa cacaagacagctgaagcttcgtacgc	tcttatgtatgcatatgtgccacttttatgtcctt ggcataggccactagtggatctg	catctctgttcagcatcgc
YBL058W	aaggacgtcagtaacatagcaattaactcatcattt agggtcagctgaagcttcgtacgc	aaaattgagggtccccgattctgtttatacaataat gpcataggccactagtggatctg	gggacctgtccaaaagcg
YER090W	gtaattagcactgataattcgattggaaagaa gata aaaacagctgaagcttcgtacgc	taaaaacgataagcagga ggaaaaaaaga ggat gcccttgcataggccactagtggatctg	gtgaa gctctttccgtgg
YIL077C	ttcagaagcagctaaagtcaactagaagataaag tctgca gctgaagcttcgtacgc	tttcttcaattaccaatgtgtattattacctgtca cgcataggccactagtggatctg	gatgcgatgtgcgcgaac
YIL028W	atttaactagggtacctatattatcgcaaggcattcg aagcagctgaagcttcgtacgc	ctgcatactgtaaaacaactgacgtgattagat gaatgcataggccactagtggatctg	ggcagtatattctgtatgcc
YIL005W	aagaaaactaatac caataaaaacaaatcataag gcagcccagctgaagcttcgtacgc	gatatcgacattctttttataactacctaataa tgcataggccactagtggatctg	atcaaacagcccaataatg
YOR347C	cctctacattcattgtaaaaffacaacaaaagcattg tcgcagctgaagcttcgtacgc	aagtaaaaataagtaaaaacaaaata ag gactttaatt ttcagcataggccactagtggatctg	ggtgcgtaaaactgacatg
YIL042C	ccacaacaggaggac gatac caaaggctacctca cgatagcagctgaagcttcgtacgc	agtacttaatggtactgtttacgggaaaaccagca cctcgcataggccactagtggatctg	gcaccaagctgggcaattcc
YMR077C	ccgctgaaactaactcaactcgggtgtttgtatata cgacagctgaagcttcgtacgc	tgctctcatttcttattttgaaagctacatagat gcataggccactagtggatctg	cacgttccggttaactc
YOR096W	tttaagaaagt gaaaggaa gaaagatcatcacg aacaaccagctgaagcttcgtacgc	ttggtttaccgttcataatgcaactgttttctttg gcataggccactagtggatctg	gtaaggctcagggatag
YIL038C	cagattttggagattcagttgtatgtagtgatcgc accagctgaagcttcgtacgc	tttttttctaagggttgcgtatftttctatgctattag cataggccactagtggatctg	cgctgagtgaaaaactgtg
YFL034W	aaagttgaaaaga gaa gattaaagttatggtacta gaaacagctgaagcttcgtacgc	atgcgtatacaataaatcttttaataagaataaaaag acatgcataggccactagtggatctg	gtcagctcgcgctgtcctg
YMR186W	ccttagaaaactaata gaaaaata gaatcattctg aaatcagctgaagcttcgtacgc	aattatataatataagacatgaagacgaacaaa gagagcataggccactagtggatctg	cggtcttcca gtagcgc

**Tableau 6.** Souches haploïdes de *S. paradoxus* ayant les gènes candidats inactivés.

<b>Souches</b>	<b>MAT</b>	<b>Génotype</b>	<b>Référence</b>
MG153	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yil005w::URA3</i>	LP21 A1
MG154	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ydr123c::URA3</i>	LP21 B1
MG155	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ydr297c::URA3</i>	LP21 C1
MG156	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yfl034w::URA3</i>	LP21 D1
MG157	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yer090w::URA3</i>	LP21 E1
MG158	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ypr128c::URA3</i>	LP21 F1
MG159	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ymr077c::URA3</i>	LP21 G1
MG160	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ybr224w::URA3</i>	LP21 H1
MG161	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yil007c::URA3</i>	LP21 A2
MG162	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yhr073w::URA3</i>	LP21 B2
MG163	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yil077c::URA3</i>	LP21 C2
MG164	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yor344c::URA3</i>	LP21 D2
MG165	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yor347c::URA3</i>	LP21 E2
MG166	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ymr215w::URA3</i>	LP21 F2
MG167	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ybl058w::URA3</i>	LP21 G2
MG168	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ydr127w::URA3</i>	LP21 H2
MG169	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yor043w::URA3</i>	LP21 A3
MG170	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yor096w::URA3</i>	LP21 B3
MG171	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ybl072c::URA3</i>	LP21 C3
MG172	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ymr164c::URA3</i>	LP21 D3
MG173	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yil065c::URA3</i>	LP21 E3
MG174	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yil028w::URA3</i>	LP21 F3
MG175	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 ymr284w::URA3</i>	LP21 G3
MG176	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yil042c::URA3</i>	LP21 H3
MG177	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yil038c::URA3</i>	LP21 A4
MG178	$\alpha$	<i>ho::NAT lys2 ura3 yhr075c::URA3</i>	LP21 B4

**Tableau 7.** Souches haploïdes de *S. cerevisiae* ayant les gènes candidats inactivés.

<b>Souches</b>	<b>MAT</b>	<b>Génotype</b>	<b>Référence</b>
MG179	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 ypr128c::URA3</i>	LP21 A7
MG180	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 ymr077c::URA3</i>	LP21 B7
MG181	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 ybr224w::URA3</i>	LP21 C7
MG182	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yil007c::URA3</i>	LP21 D7
MG183	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yhr073w::URA3</i>	LP21 E7
MG184	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yil077c::URA3</i>	LP21 F7
MG185	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yor344c::URA3</i>	LP21 G7
MG186	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yor347c::URA3</i>	LP21 H7
MG187	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 ymr215w::URA3</i>	LP21 A8
MG188	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 ybl058w::URA3</i>	LP21 B8
MG189	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 ydr127w::URA3</i>	LP21 C8
MG190	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yor043w::URA3</i>	LP21 D8
MG191	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yor096w::URA3</i>	LP21 E8
MG192	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 ybl072c::URA3</i>	LP21 F8
MG193	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 ymr164c::URA3</i>	LP21 G8
MG194	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yil065c::URA3</i>	LP21 H8
MG195	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yil028w::URA3</i>	LP21 A9
MG196	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 ymr284w::URA3</i>	LP21 B9
MG197	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yil042c::URA3</i>	LP21 C9
MG198	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 yil038c::URA3</i>	LP21 D9
MG199	a	<i>ura3 leu2 his3 met15 ymr186w::URA3</i>	LP21 E9

La délétion des gènes a été vérifiée par PCR sur colonie à l'aide d'amorces diagnostiques en aval de chaque gène (tableaux 4 et 5). L'amorce URA\_B (Gueldener *et al.*, 2002) située en aval à l'intérieur de la cassette a été utilisée pour toutes les souches. Le résultat de la PCR a été visualisé sur gel d'agarose 1,5 % à 110 V, 400 mA après 35 minutes. Les colonies positives de *S. cerevisiae* ont été croisées avec la souche JRY9134 afin d'obtenir l'hybride ayant perdu les gènes que pour l'allèle de *S. cerevisiae*. Les souches ont été croisées en milieu liquide (YPD) à 30 °C pendant une journée. La sélection des hybrides a été effectuée par l'étalement des croisements sur milieu synthétique sans lysine, sans histidine et avec l'antibiotique cloNAT (100 µg/ml). Les souches parentales ont aussi été étalées comme témoins. Les souches ont été incubées à 30 °C pendant deux jours. L'obtention des hybrides avec délétion des gènes pour l'allèle de *S. paradoxus* s'est faite en croisant les colonies positives de *S. paradoxus* avec la souche BY4741. La souche témoin de *S. cerevisiae* MG149 a été croisée avec la souche JRY9134 afin d'avoir un hybride témoin avec le même profil génétique que les hybrides réciproques (MG150; *ho::URA3/ho::NAT his3/HIS3 leu2/LEU2 ura3/ura3 met15/MET15 LYS2/lys2*), c'est-à-dire avec le marqueur *URA3* intégré dans le génome. Les croisements ont également été effectués en milieu liquide (YPD) et incubés à 30 °C pendant une journée. La sélection s'est aussi faite sur un milieu synthétique sans lysine, sans histidine et avec l'antibiotique cloNAT (100 µg/ml). Les souches parentales ont aussi été étalées comme témoin. Les pétris ont été incubés pendant deux jours à 30 °C. Les hybrides construits sont énumérés dans les tableaux 8 et 9.

**Tableau 8.** Hybrides ayant l'allèle de *S. cerevisiae* inactivé aux gènes candidats.

Souches	MAT	Génotype					Référence
MG200	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 49
		YBL058W/ybl058w:: <i>URA3</i>					
MG201	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 50
		YBL072C/ybl072c:: <i>URA3</i>					
MG202	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 51
		YDR127W/ydr217w:: <i>URA3</i>					
MG203	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 52
		YOR043W/yor043w:: <i>URA3</i>					
MG204	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 53
		YOR096W/yor096w:: <i>URA3</i>					
MG205	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 54
		YMR215W/ymr215w:: <i>URA3</i>					
MG206	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 55
		YBR224W/ybr224w:: <i>URA3</i>					
MG207	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 56
		YHR073W/yhr073w:: <i>URA3</i>					
MG208	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 57
		YPR128C/ypr128c:: <i>URA3</i>					
MG209	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 58
		YIL007C/yil007c:: <i>URA3</i>					
MG210	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 59
		YMR077C/ymr077c:: <i>URA3</i>					
MG211	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 60
		YOR347C/yor347c:: <i>URA3</i>					
MG212	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 61
		YIL077C/yil077c:: <i>URA3</i>					
MG213	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 62
		YOR344C/yor344c:: <i>URA3</i>					
MG214	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 61
		YIL028W/yil028w:: <i>URA3</i>					
MG215	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 62
		YIL038C/yil038c:: <i>URA3</i>					
MG216	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 63
		YIL042C/yil042c:: <i>URA3</i>					
MG217	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 64
		YIL065C/yil065c:: <i>URA3</i>					
MG218	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 65
		YMR164C/ymr164c:: <i>URA3</i>					
MG219	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 66
		YMR282W/ymr284w:: <i>URA3</i>					

**Tableau 9.** Hybrides ayant l'allèle de *S. paradoxus* inactivé aux gènes candidats.

Souches	MAT	Génotype					Référence
MG220	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 80
		<i>ybl058w::URA3/YBL058W</i>					
MG221	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 68
		<i>ybl072c::URA3/YBL072C</i>					
MG222	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 73
		<i>ydr217w::URA3/YDR127W</i>					
MG223	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 70
		<i>yor043w::URA3/YOR043W</i>					
MG224	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 76
		<i>yor096w::URA3/YOR096W</i>					
MG225	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 67
		<i>yml215w::URA3/YMR215W</i>					
MG226	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 74
		<i>ybr224w::URA3/YBR224W</i>					
MG227	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 75
		<i>yhr073w::URA3/YHR073W</i>					
MG228	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 63
		<i>ypr128c::URA3/YPR128C</i>					
MG229	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 64
		<i>yil007c::URA3/YIL007C</i>					
MG230	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 65
		<i>yml077c::URA3/YMR077C</i>					
MG231	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 66
		<i>yor347c::URA3/YOR347C</i>					
MG232	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 72
		<i>yil077c::URA3/YIL077C</i>					
MG233	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L5 69
		<i>yor344c::URA3/YOR344C</i>					
MG234	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 67
		<i>yil028w::URA3/YIL028W</i>					
MG235	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 68
		<i>yil038c::URA3/YIL038C</i>					
MG236	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 69
		<i>yil042c::URA3/YIL042C</i>					
MG237	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 70
		<i>yil065c::URA3/YIL065C</i>					
MG238	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 71
		<i>yml164c::URA3/YMR164C</i>					
MG239	a/α	<i>his3/HIS3</i>	<i>leu2/LEU2</i>	<i>ura3/ura3</i>	<i>met15/MET15</i>	<i>LYS2/lys2</i>	L7 72
		<i>yml284w::URA3/YMR284W</i>					

#### 2.4.2-Mesure du taux de croissance en milieu liquide

La mesure du taux de croissance des hybrides s'est faite à l'aide du Bioscreen C à 37 °C et à 30 °C à deux reprises. Pour chacune des souches, 6 réplicats ont été faits à partir de colonies différentes et mises en préculture dans des plaques 96 puits avec 600 µl d'YPD. Les souches ont été incubées à 30 °C pendant la nuit avec agitation. Les densités optiques des cultures ont été prises le lendemain à l'aide du lecteur de plaque (Infinite f200 PRO, TECAN) et ramenées à une même densité optique de 0,01, pour un total de 150 µl. Les hybrides pour chaque gène inactivés ont été positionnés les uns après les autres dans la plaque de lecture. Les mesures ont été prises à 600 nm aux 15 minutes et sans agitation. Les tests ont duré 2 jours chacun. Le témoin utilisé est la souche MG013, soit l'hybride sans délétion, mais ayant la cassette *URA3* au locus *HO* de l'allèle de *S. cerevisiae*. La comparaison du taux de croissance a été établie et mesurée de la même façon qu'au test de croissance avec perte de chromosome mentionné plus haut. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée pour chaque hybride. (Annexe 1). Le premier facteur est l'effet du gène perdu sur le taux de croissance (effet du gène). Le deuxième facteur de l'ANOVA est l'effet des deux températures sur le taux de croissance (effet de la température). Il a fallu prendre en considération les deux effets, c'est-à-dire vérifier si le fait de perdre le gène dans l'un ou l'autre des allèles des deux espèces engendre une plus grande diminution du taux de croissance à 37 °C (interaction entre gène et température).

### **3-Résultats**

#### 3.1-Test de croissance avec perte des chromosomes

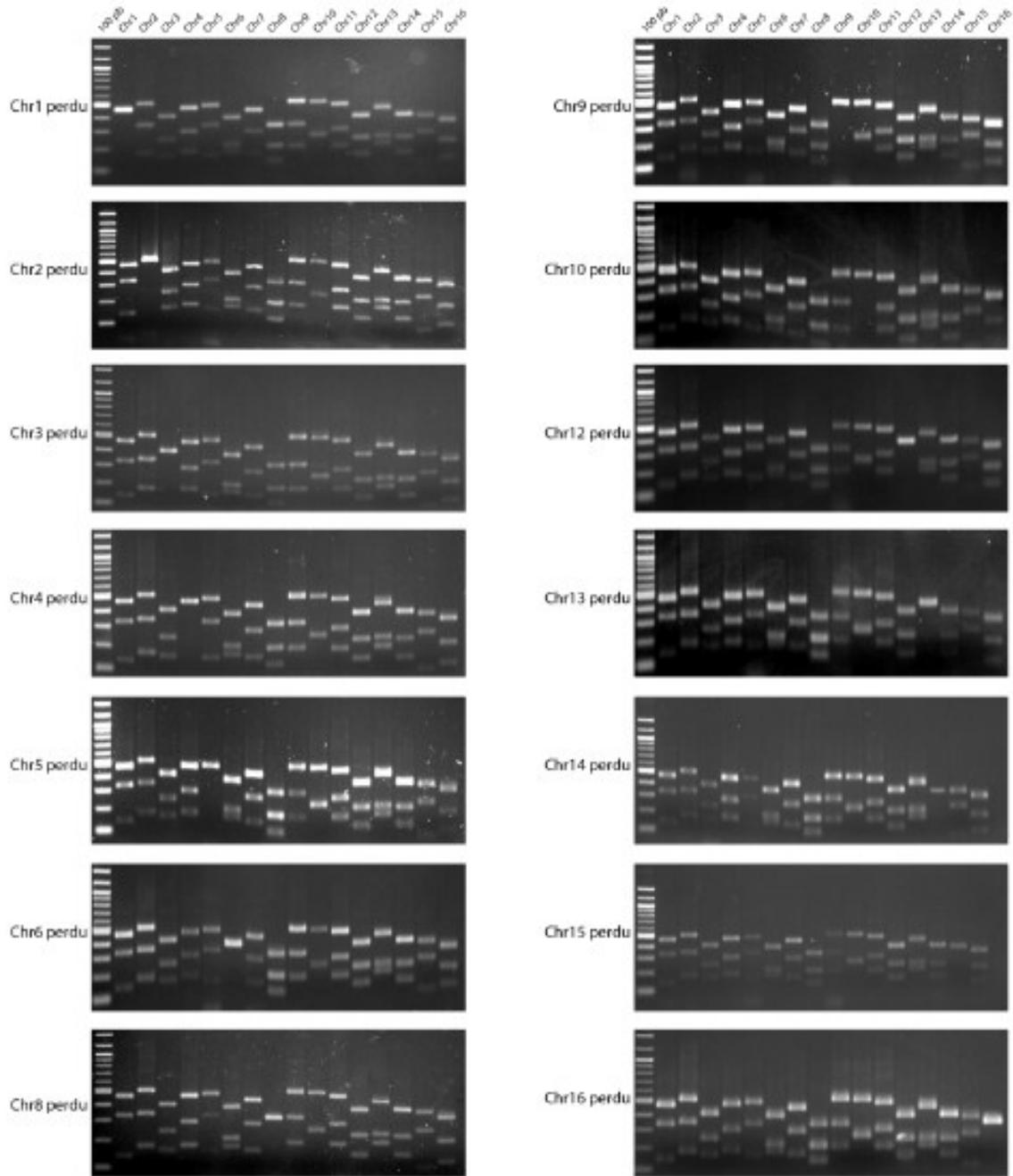
##### 3.1.1-Souches de levures

Cette partie de l'expérimentation visait à identifier quel(s) chromosome(s) de *S. paradoxus* n'était pas capable de compléter ceux de *S. cerevisiae*, empêchant l'hybride de croître à 37 °C. Pour ce faire, la souche MG001 de *S. paradoxus* a été croisée avec la collection de *S. cerevisiae* avec centromères inductibles, c'est-à-dire avec chromosomes pouvant être perdus par déstabilisation. Les croisements ont fonctionné correctement, les souches parentales n'ayant pas poussé sur les milieux sélectifs. Les répliques sur YPGal ont également bien fonctionné, toutes les colonies répliquées ayant poussé. Pour la sélection des hybrides ayant perdu le chromosome de *S. cerevisiae* sur 5-

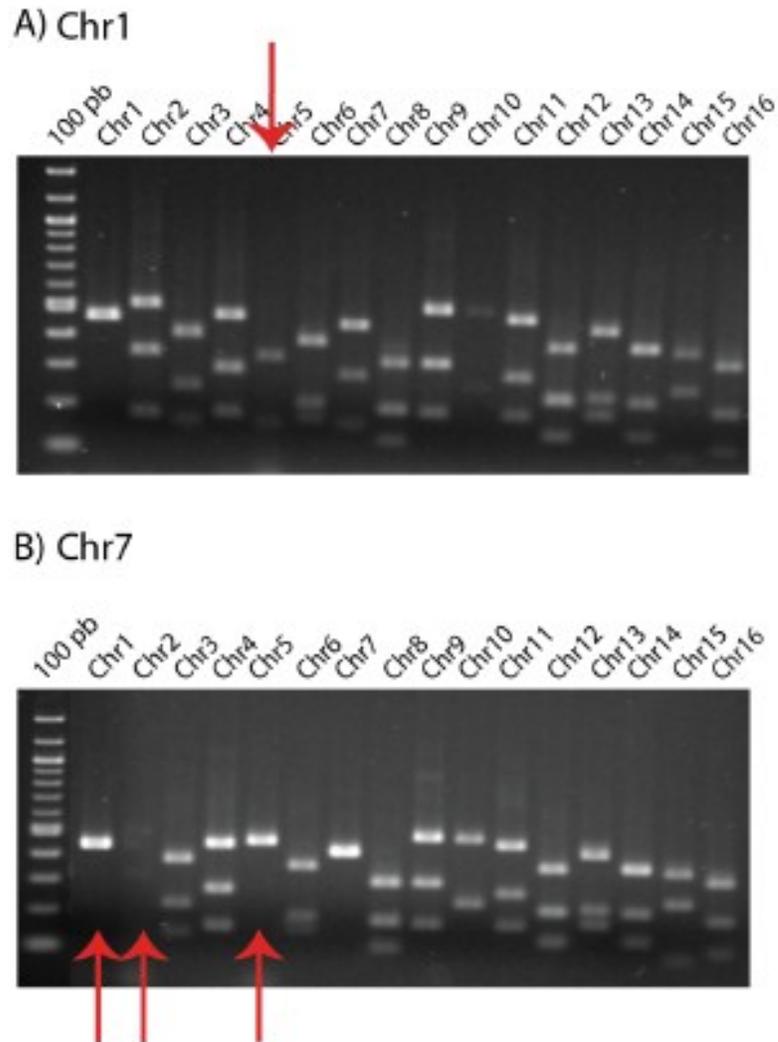
FOA, certaines colonies ont poussé mieux que d'autres et certaines n'ont pas poussé. La deuxième réplique a permis d'éliminer les petites colonies qui ont poussé et d'augmenter la probabilité que les colonies qui ont mieux poussé aient perdu leur chromosome.

### 3.1.2-Confirmation de la perte des chromosomes

La confirmation de la perte de chromosomes des colonies ayant le mieux poussé sur 5-FOA a été effectuée par PCR et par digestion d'ADN à l'aide de l'enzyme EcoRI. La figure 8 illustre les résultats obtenus. La taille des bandes obtenues correspond à la taille théorique mentionnée dans le tableau 2. La plupart des hybrides ont perdu les chromosomes voulus. Les gels d'agarose démontrent trois bandes dans chaque puits, correspondant à l'allèle de *S. paradoxus* et à celui de *S. cerevisiae* coupé en deux, sauf pour le chromosome perdu, où seulement la bande correspondant à l'allèle de *S. paradoxus* est observée. Toutefois, le chromosome 10 présente seulement 2 bandes. Ceci s'explique par le fait que la coupure de l'allèle de *S. cerevisiae* donne deux bandes d'environ la même taille (262 pb et 247 pb). Les deux bandes ne peuvent donc pas être discernées. Plusieurs colonies sur les milieux 5-FOA ont dû être testées afin de trouver une colonie ayant perdu le chromosome voulu. En effet, il y a eu beaucoup de faux positifs sur les milieux. Seuls les chromosomes 7 et 11 n'ont pas été perdus. Dans ces cas, les hybrides ont soit perdu des chromosomes autres que celui désiré, soit n'ont pas perdu aucun chromosome ou encore ont perdu le chromosome 5 de *S. paradoxus* (figure 9). Ce chromosome a également été perdu par d'autres souches, mais d'autres colonies sur le même pétri ne l'avaient pas perdu.



**Figure 8.** Confirmation de la perte des chromosomes. Résultats de la digestion par EcoRI des produits PCR pour les 14 souches déstabilisées. Chacun des gels correspond à un hybride et chacun des puits correspond à un chromosome. Il y a une bande pour le chromosome perdu et trois bandes pour les chromosomes toujours présents.



**Figure 9.** Exemples de problèmes rencontrés (flèches) pour la perte des chromosomes. A) Vérification de la perte du chromosome 1, mais le chromosome 5 de *S. paradoxus* a été perdu. B) Vérification de la perte du chromosome 7; la PCR et la digestion du chromosome 2 n'ont pas fonctionné et les chromosomes 1 et 5 de *S. cerevisiae* ont été perdus.

### 3.1.3-Mesure du taux de croissance sur milieu solide

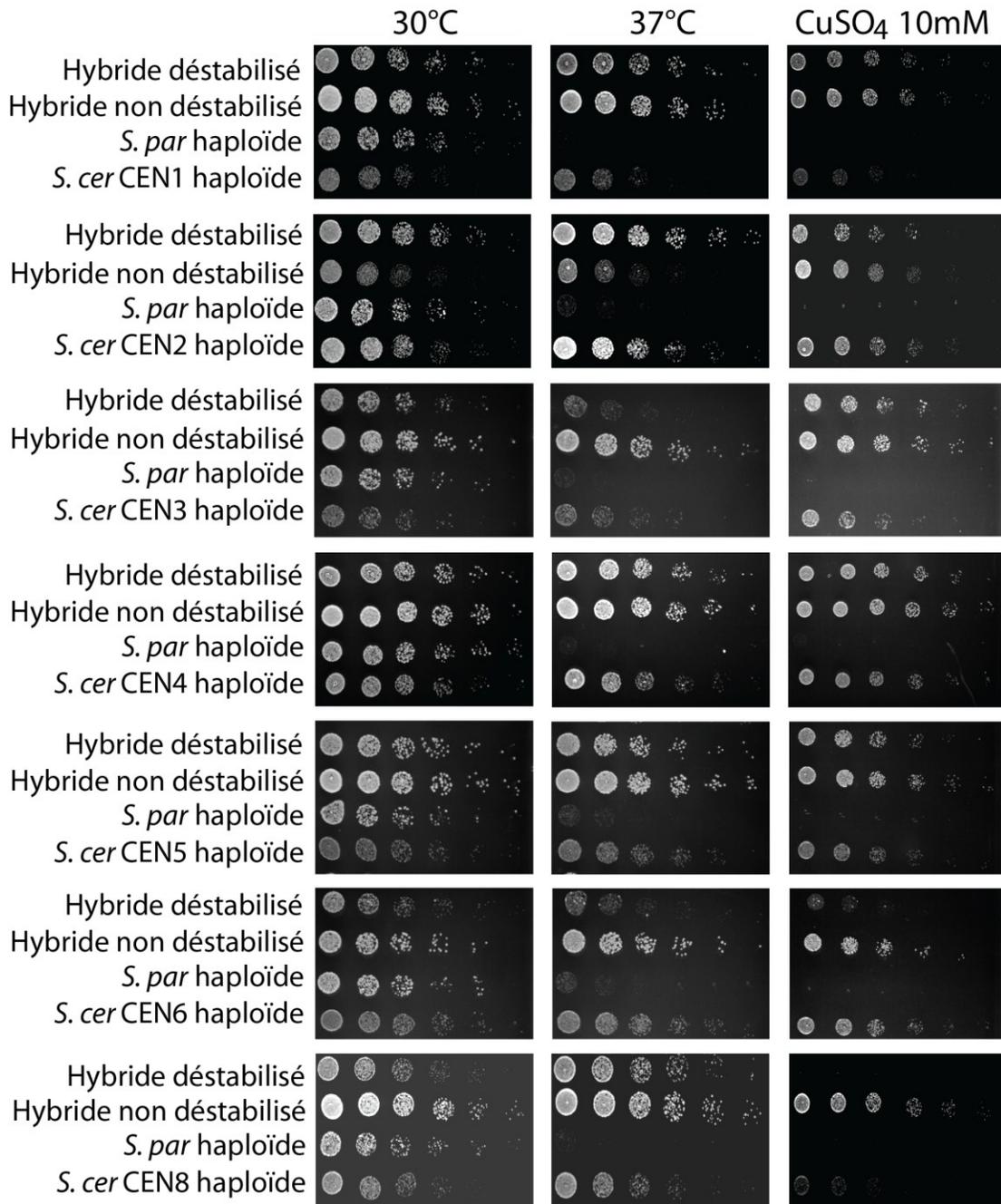
Afin d'estimer l'effet de la perte d'un chromosome de *S. cerevisiae* dans l'hybride, des tests de croissance sur milieux solides ont été réalisés. Chaque test de croissance a été réalisé sur trois milieux YPD solides, dont un avec 10 mM de sulfate de cuivre. Les souches ont été incubées à 30 °C et à 37 °C. Les résultats obtenus sont illustrés aux figures 10 et 11.

Pour le test à 30 °C, les souches haploïdes de *S. paradoxus* ont poussé de façon comparable à celles de *S. cerevisiae*. Les souches de *S. cerevisiae* semblent parfois démontrer une croissance plus faible, mais cela est causé par leur coloration rougeâtre. La plupart des hybrides normaux ont eu une meilleure croissance comparativement aux autres souches, sauf pour CEN2. Les hybrides déstabilisés et non déstabilisés CEN10 et CEN12 ne montrent pas une différence notable de croissance.

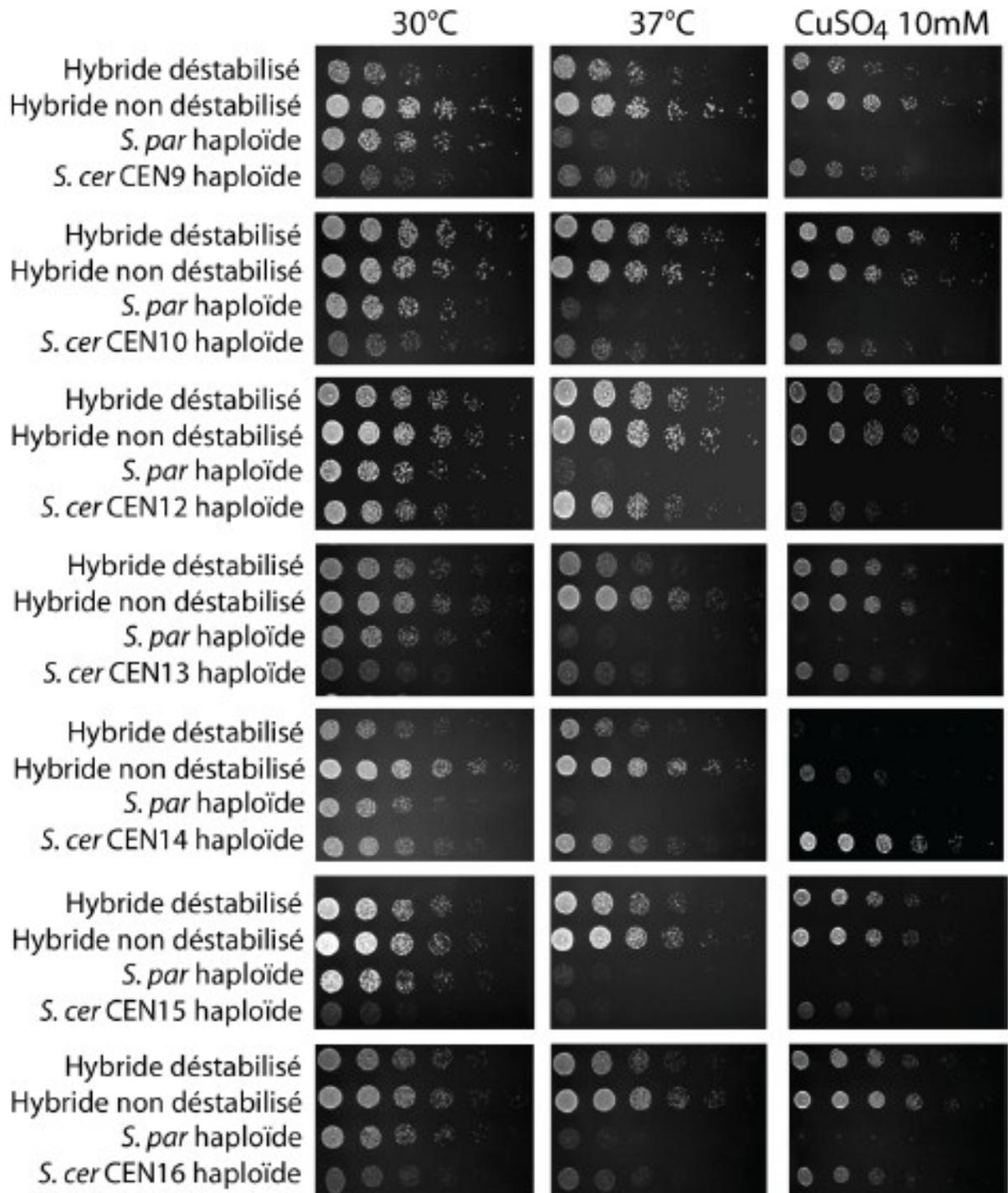
La plupart des souches déstabilisées ont montré une plus faible capacité à croître à 37 °C que les souches non déstabilisées, excepté l'hybride CEN2. La différence de croissance est variable, parfois très légère et parfois très grande. Les hybrides déstabilisés démontrant le plus grand écart sont CEN3, CEN6, CEN13 et CEN14. Quant aux hybrides CEN10 et CEN12, il n'y a pas de différence remarquable entre la souche déstabilisée et non déstabilisée. Les souches parentales ont poussé comme à l'attendu, *S. paradoxus* n'a pas ou que très peu poussé et *S. cerevisiae* a poussé sensiblement comme à 30 °C.

*S. paradoxus* n'a pas poussé sur le cuivre comme prévu tandis que la souche haploïde de *S. cerevisiae* n'a pas eu de difficulté à croître. La plupart des hybrides normaux ont obtenu une meilleure croissance que les hybrides déstabilisés, mais également que *S. cerevisiae* comme observé précédemment (Greig, *et al.*, 2002). Les hybrides CEN10, CEN12, CEN15 ont obtenu une croissance similaire. La différence de croissance entre les autres hybrides est tout de même minime. Les hybrides déstabilisés CEN6 et CEN14 ont poussé beaucoup moins que les hybrides normaux, ce qui laisse croire qu'il y aurait d'autres gènes impliqués dans la capacité de croître sur un milieu avec cuivre. De plus,

l'hybride déstabilisé CEN8 n'a pas poussé comme à l'attendu en raison de la perte du gène *CUPI* de *S. cerevisiae*.



**Figure 10.** Test de croissance sur milieux solides des hybrides CEN1 à CEN8 avec leurs souches parentales. Trois tests de croissance : 30 °C, 37 °C et sur CuSO<sub>4</sub> 10 mM (30 °C). Séries de 6 dilutions 1/4.

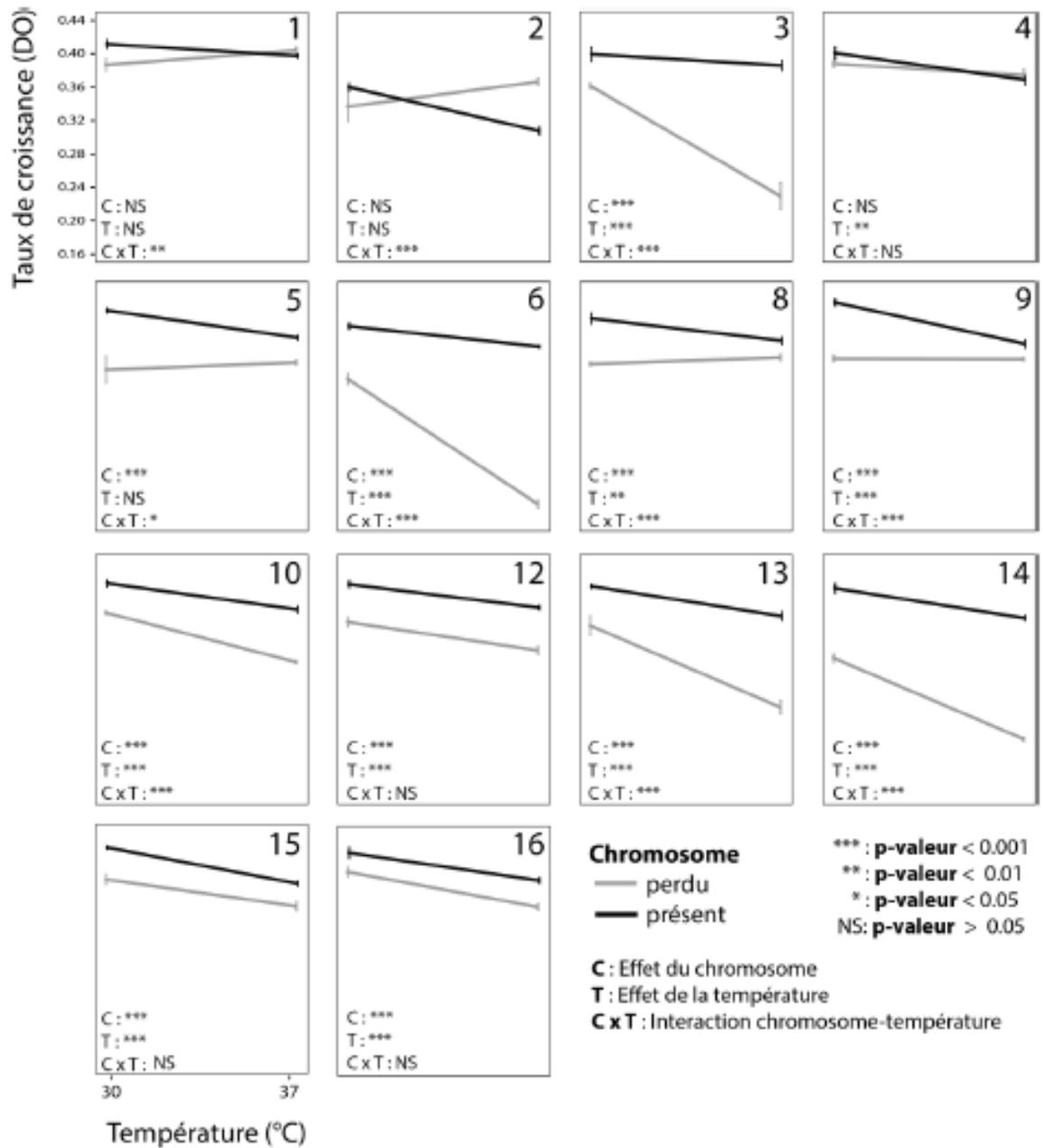


**Figure 11.** Test de croissance sur milieux solides des hybrides CEN9 à CEN16 avec leurs souches parentales. Trois tests de croissance : 30 °C, 37 °C et sur CuSO<sub>4</sub> 10 mM (30 °C). Séries de 6 dilutions 1/4.

#### 3.1.4-Test de croissance en milieu liquide

Afin de compléter les tests de croissance sur milieu solide, la comparaison du taux de croissance des hybrides déstabilisés et normaux a été réalisée en milieu liquide à 30 °C et 37 °C. Chaque température a été testée deux fois. Le coefficient de Pearson obtenu entre les deux tests est 0,92 avec une p-valeur  $< 2,2 \times 10^{-16}$ , signifiant que les résultats obtenus ne se produisent par hasard et que l'expérience est reproductible. La figure 12 illustre la différence de croissance entre les hybrides ayant perdu l'un des quatorze chromosomes de *S. cerevisiae* et ceux qui les possèdent toujours.

Dans ce test, l'effet recherché est une baisse significative du taux de croissance des hybrides déstabilisés à 37 °C par rapport aux hybrides normaux. Pour vérifier cet effet, une ANOVA à deux facteurs a été réalisée pour chaque chromosome (Annexe 1). Le premier facteur est l'effet de la perte du chromosome sur le taux de croissance (effet du chromosome). Les résultats obtenus ont montré que la perte d'un chromosome a engendré une baisse significative de croissance aux deux températures (p-valeur  $< 0,001$  sauf chromosomes 1, 2 et 4). Le deuxième facteur de l'ANOVA est l'effet des deux températures sur le taux de croissance (effet de la température). Les résultats ont montré une baisse du taux de croissance à 37 °C chez les hybrides déstabilisés et normaux (p-valeur  $< 0,01$ , sauf chromosomes 1, 2 et 5). Il a donc fallu prendre en considération les deux effets, c'est-à-dire d'aller vérifier si le fait de perdre le chromosome engendre une plus grande diminution du taux de croissance à 37 °C comparativement aux hybrides normaux (interaction entre chromosome et température). L'ANOVA a donné un résultat significatif pour la plupart des chromosomes (p-value  $< 0,001$ ). Toutefois, malgré ce test significatif, les hybrides qui ont perdu le chromosome 1, 2, 5, 8 et 9 n'ont pas démontré une perte de croissance à 37 °C. Dans ces cas, le fait de perdre le chromosome augmente la croissance à 37 °C, ce qui n'est pas le patron de croissance recherché. De plus, pour les chromosomes 12, 15 et 16, il n'y a eu aucune interaction entre la perte de chromosome et la température. Ainsi, les résultats signifient que les chromosomes 3, 6, 10, 13 et 14 sont impliqués dans la capacité à croître à 37 °C. Ce résultat indique donc que l'incapacité de *S. paradoxus* de croître à haute température est sous l'influence de plusieurs locus ayant un effet mineur sur le phénotype.



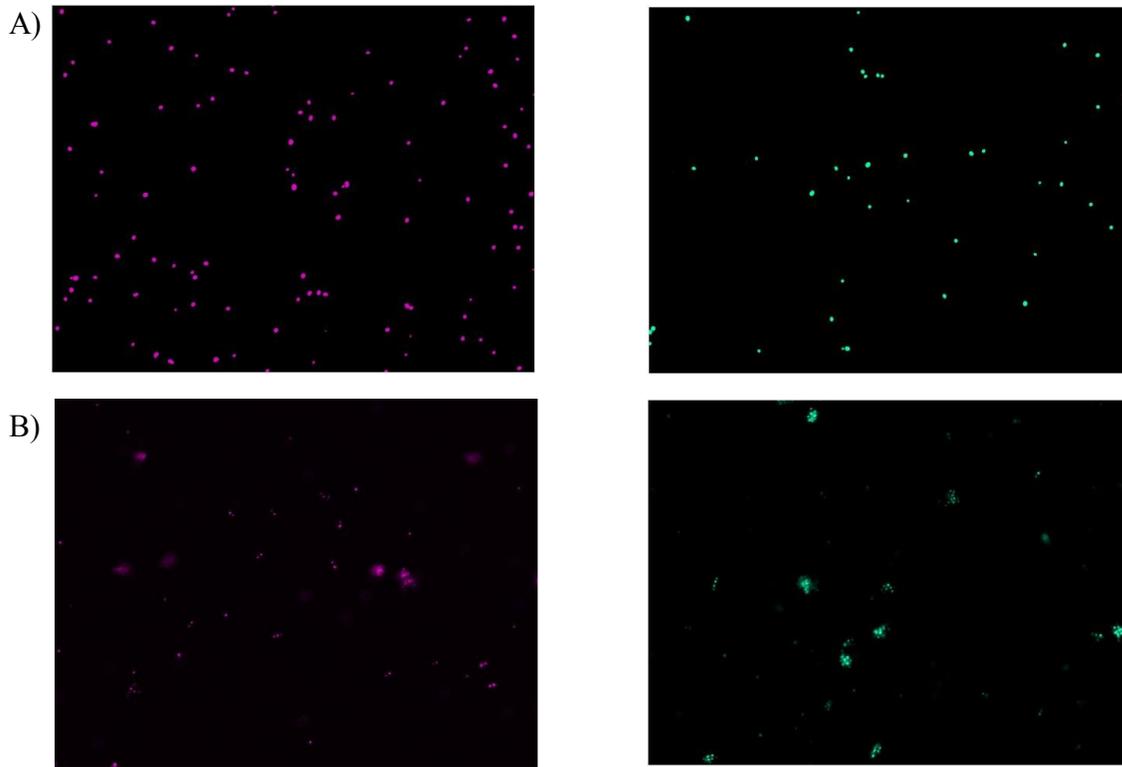
**Figure 12.** Taux de croissance en fonction de la température (30° vs 37°) et du chromosome de *S. cerevisiae* chez les hybrides (présence/absence). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre deux estimations indépendantes.

### 3.2-Test de croissance avec perte de gènes

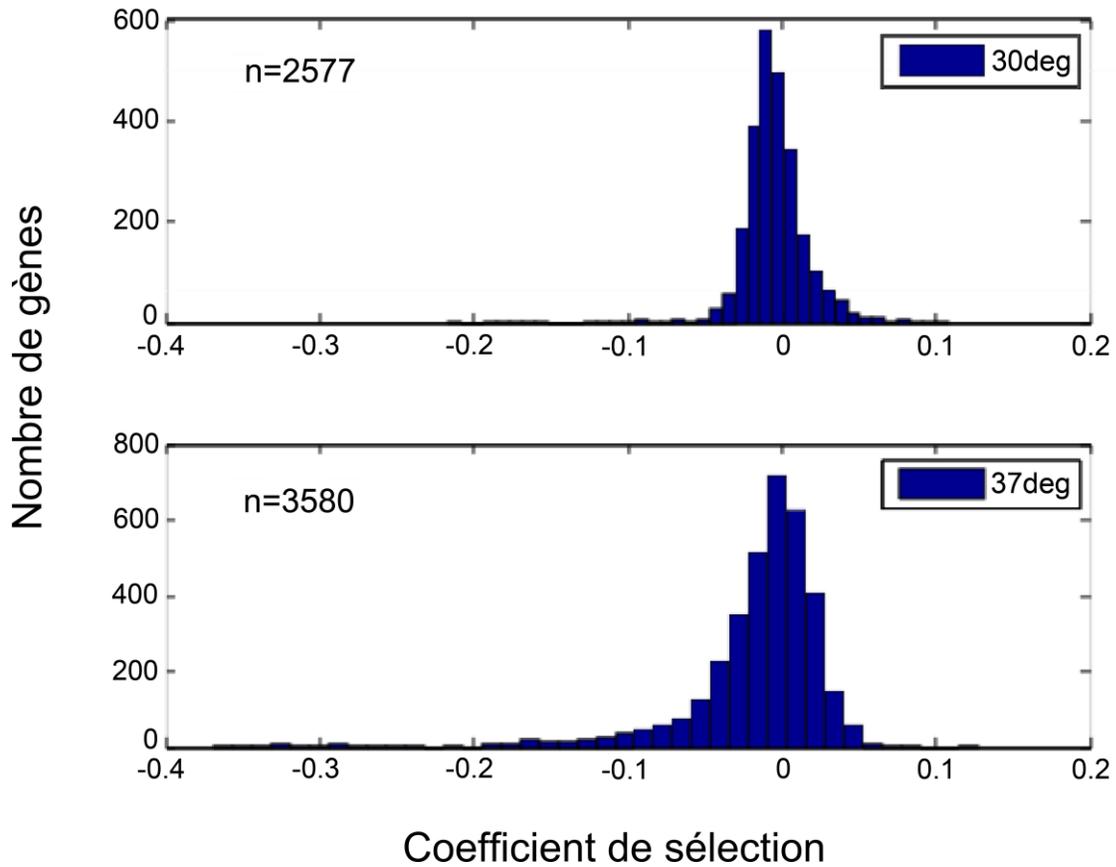
Afin d'identifier de façon plus précise quels sont les gènes responsables de la capacité à croître à 37 °C, l'expérience suivante est allée à plus petite échelle que la précédente, et ce sont les gènes qui ont été enlevés de l'hybride. Pour ce faire, des hybrides fluorescents mutants et témoins ont été construits et leurs taux de croissance ont été comparés.

#### 3.2.1-Mesure des taux de croissance des souches en compétition

La seconde étape a été d'estimer les taux de croissance des hybrides mutants et de l'hybride de référence en compétition. Pour ce faire, la mesure de la fluorescence des hybrides mutants et du témoin s'est faite de façon automatisée sur une période de quelques jours. La distribution des coefficients de sélection à 30 °C et à 37 °C est illustrée à la figure 14. Le nombre de gènes analysés par température est indiqué par la lettre n. Les 4700 gènes n'ont pas été analysés, car certaines plaques n'ont pas pu être utilisées. Les résultats du test à 37 °C démontrent une queue vers la droite, indiquant plusieurs gènes ayant un coefficient de sélection négatif. Les gènes présentant les 30 coefficients de sélection les plus négatifs se retrouvent dans le tableau 10.



**Figure 13.** Fluorescence obtenue pour les souches de *S. cerevisiae* (A) et *S. paradoxus* (B) étiquetées avec mCherry et Cerulean.



**Figure 14.** Distribution des coefficients de sélection en fonction de la température (30 °C vs 37 °C). La lettre n indique le nombre de gènes total analysé par température.

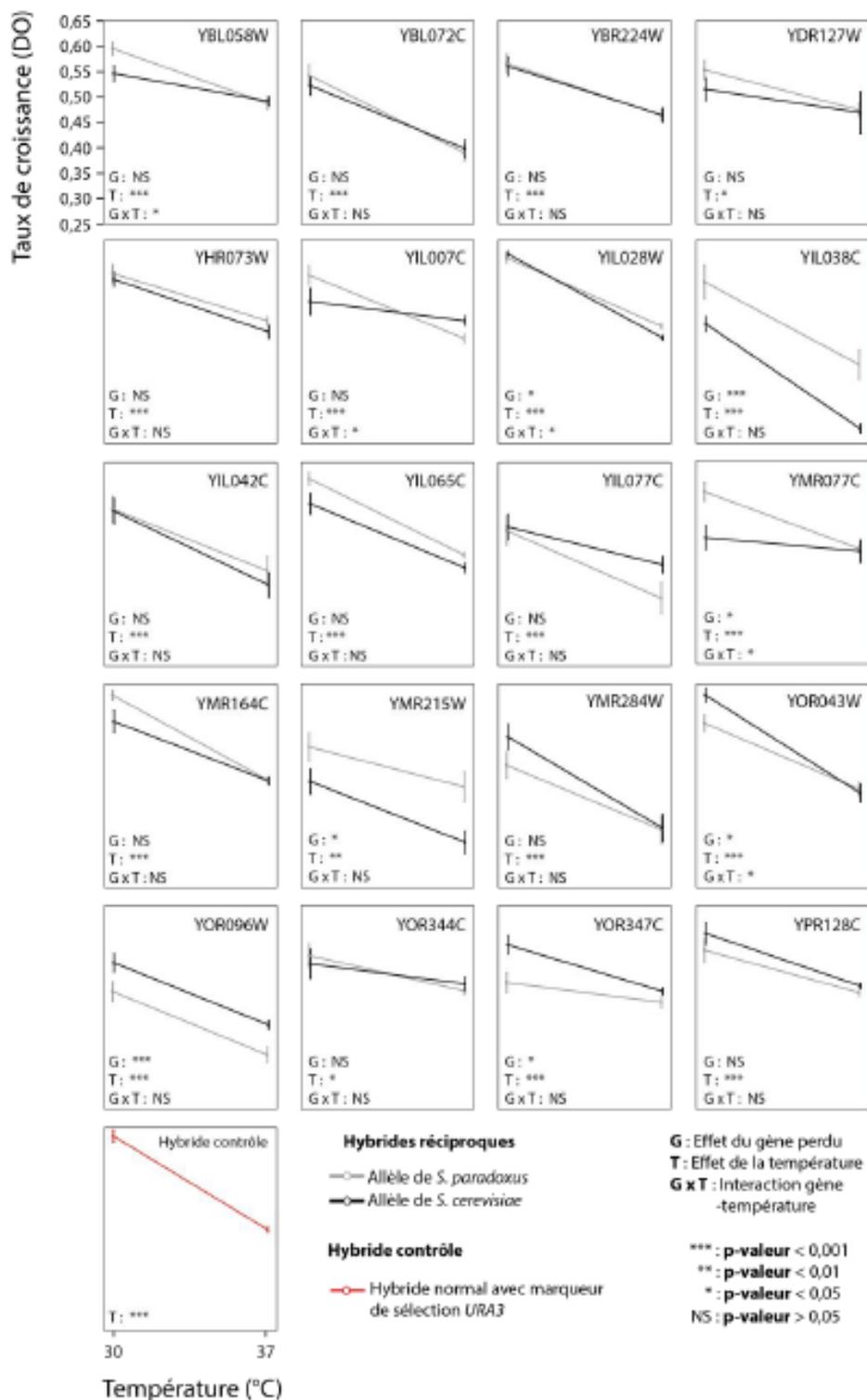
**Tableau 10.** Résultats des 30 gènes dont la délétion chez l'hybride entraîne une diminution du taux de croissance à 37 °C.

Nom systématique	Nom standard	Nom du gène	Chromosome	Coefficient de sélection
YBL058W	<i>SHPI</i>	Suppressor of High-copy PP1	Chr 2	-0,1789
YBL072C	<i>RPS8A</i>	Ribosomal Protein of the Small subunit	Chr 2	-0,2616
YBR224W	<i>ND</i>	ORF incertain	Chr 2	-0,2254
YDR076W	<i>RAD55</i>	RADiation sensitive	Chr 4	-0,3792
YDR123C	<i>INO2</i>	INOsitol requiring	Chr 4	-0,311
YDR127W	<i>ARO1</i>	AROMatic amino acid requiring	Chr 4	-0,2803
YER090W	<i>TRP2</i>	TRyPtophan requiring	Chr 5	-0,1778
YFL034W	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	Chr 6	-0,1736
YHR073W	<i>OSH3</i>	OxySterol binding protein Homolog	Chr 8	-0,2836
YHR075C	<i>PPE1</i>	Phosphoprotein Phosphatase methylEsterase	Chr 8	-0,1899
YIL005W	<i>EPS1</i>	ER protein, member of the protein disulfide isomerase family	Chr 9	-0,176
YIL007C	<i>NAS2</i>	Non-ATPase Subunit	Chr 9	-0,1975
YIL028W	<i>ND</i>	ORF incertain	Chr 9	-0,1764
YIL038C	<i>NOT3</i>	Subunit of the CCR4-NOT complex, transcriptional regulator	Chr 9	-0,1737
YIL042C	<i>PKP1</i>	Protein Kinase of PDH	Chr 9	-0,1743
YIL065C	<i>FIS1</i>	mitochondrial FISsion	Chr 9	-0,1882
YIL077C	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	Chr 9	-0,1769
YMR077C	<i>VPS20</i>	Vacuolar Protein Sorting	Chr 13	-0,1743
YMR164C	<i>MSS11</i>	Multicopy Suppressor of STA genes	Chr 13	-0,2576
YMR186W	<i>HSC82</i>	Heat Shock Cognate	Chr 13	-0,1713
YMR215W	<i>GAS3</i>	Glycophospholipid-Anchored Surface protein	Chr 13	-0,2302
YMR284W	<i>YKU70</i>	Yeast KU protein	Chr 13	-0,2633
YNL171C	<i>ND</i>	ORF incertain	Chr 14	-0,1797
YOR043W	<i>WHI2</i>	WHIskey	Chr 15	-0,1914
YOR096W	<i>RPS7A</i>	Ribosomal Protein of the Small subunit	Chr 15	-0,1738
YOR297C	<i>TIM18</i>	Translocase of the Inner Mitochondrial membrane	Chr 15	-0,2633
YOR344C	<i>TYE7</i>	Ty-mediated Expression	Chr 15	-0,3707
YOR347C	<i>PYK2</i>	PYruvate Kinase	Chr 15	-0,1743
YPR195C	<i>ND</i>	ORF incertain	Chr 15	-0,1988
YPR128C	<i>ANTI</i>	Adenine Nucleotide Transporter	Chr 16	-0,2793

### 3.3-Hybrides réciproques

Les hybrides réciproques ont été construits pour la plupart des gènes candidats. Seulement la délétion des gènes HSC82 et YDR096W n'a pas réussi chez *S. paradoxus* et celle des gènes YDR123C, YDR076W, YER090W, YIL005W, YFL034W, YHR075C et YOR297C chez *S. cerevisiae*. Ainsi, 20 hybrides ont été construits au total. Les délétions ont été vérifiées par PCR.

Les hybrides ont été mis en culture afin de comparer les taux de croissance à 30 °C et 37 °C entre eux à l'aide du Bioscreen C. Le test a été réalisé à deux reprises et le coefficient de corrélation entre les deux tests est de 0,86 (p-valeur < 2,2e-16). L'effet recherché était d'avoir une croissance plus faible de l'hybride ayant le gène de *S. paradoxus* à 37 °C comparativement à son hybride réciproque, soit ayant seulement le gène de *S. cerevisiae*. La figure 15 montre les taux de croissance obtenus à 30 °C et 37 °C. Dans un premier temps, l'hybride témoin montre une diminution significative du taux de croissance à 37 °C (p-valeur < 2.2e-16). Les hybrides montrent également tous une diminution significative du taux de croissance à 37 °C. Dans certains cas, il y a une interaction significative entre l'effet de la température et l'allèle restant. Pour le gène YIL007C, l'hybride ayant l'allèle de *S. paradoxus* a le taux de croissance le plus élevé à 30 °C, mais plus le bas à 37 °C (p-valeur < 0,05). Ce patron d'interaction est présent chez les gènes YBL058W et YMR077C (p-valeur < 0,05). Toutefois, l'inverse est observable chez les gènes YIL028W et YOR043W (p-valeur < 0,05). De plus, certains patrons de croissance entre les gènes candidats se ressemblent tandis que d'autres montrent un patron complètement à l'inverse. Par exemple, les hybrides pour les gènes YBL072C et YBR224W montrent un taux de croissance similaire aux deux températures. Toutefois, l'hybride qui a toujours l'allèle d'YMR215W de *S. paradoxus* a un taux de croissance plus élevé que son hybride réciproque aux deux températures et c'est complètement l'inverse qui se produit pour le gène YOR096W. De plus, pour certains gènes, l'allèle restant a eu un effet significatif sur le taux de croissance, peu importe la température. Par exemple, pour le gène YIL038C, l'hybride ayant l'allèle de *S. paradoxus* montre un taux de croissance plus élevé à 30 °C et 37 °C que son hybride réciproque (p-valeur < 0,001).



**Figure 15.** Taux de croissance en fonction de la température (30 °C et 37 °C) et de l'allèle présent chez les hybrides (*S. cerevisiae* ou *S. paradoxus*) pour 20 gènes candidats.

#### 4-Discussion

Le but principal de cette étude a été d'identifier les bases moléculaires de la différence de croissance à 37 °C entre *S. cerevisiae* et *S. paradoxus*. Pour ce faire, les gènes de *S. cerevisiae* ont été délétés un à un de l'hybride et le taux de croissance de ces hybrides mutants a été comparé à celui d'un hybride de référence. Par la suite, la construction d'hybrides réciproques a permis de vérifier les gènes candidats pour s'assurer qu'un effet de dosage n'était pas en cause.

Dans un premier temps, les tests de croissance réalisés à 30 °C et 37 °C en milieu liquide et solide entre les hybrides normaux et déstabilisés ont démontré plusieurs choses. D'abord, la perte de chromosome de *S. cerevisiae* du génome de l'hybride a engendré une diminution de la croissance toutes températures confondues dans la plupart des cas (excepté pour les chromosomes 1, 2 et 4 en milieu liquide et 2 et 4 sur milieu solide). Cette perte de fitness pourrait s'expliquer par le fait qu'il n'y ait pas eu d'endoduplication suite à la déstabilisation des hybrides, résultant en la présence d'une seule copie du chromosome de *S. paradoxus* chez les hybrides déstabilisés contrairement aux hybrides normaux. Une façon de vérifier si l'endoduplication a eu lieu serait par qPCR en mesurant la quantité d'ADN produit par les hybrides déstabilisés, ceux normaux, la souche haploïde et celle diploïde de *S. paradoxus*. Ensuite, les tests de croissance ont permis de voir qu'à 37 °C, il y a en général une perte de croissance pour les hybrides normaux et ceux déstabilisés. La température optimale de croissance des espèces vient expliquer ce résultat. En effet, *S. cerevisiae* a le meilleur taux de croissance à 32,27 °C et *S. paradoxus* à 29,92 °C (Salvado *et al.*, 2011). C'est pourquoi la croissance à 37 °C est plus faible qu'à 30 °C. Puis, les tests réalisés ont permis de trouver 5 chromosomes de *S. cerevisiae* qui diminuent le taux de croissance de l'hybride à 37 °C lorsqu'ils sont perdus, soit les chromosomes 3, 6, 10, 13 et 14. Ce résultat suggère donc que la capacité de croître à 37 °C est contrôlée par plusieurs gènes ayant un petit effet sur le phénotype. Dans le cas où elle aurait été sous le contrôle d'un gène, on aurait observé dans le test de croissance sur milieu solide et en milieu liquide seulement un hybride déstabilisé n'ayant pas poussé à 37 °C. En effet, l'utilisation de cuivre dans le test de croissance sur milieu solide démontre ce point. La capacité de croître de *S. cerevisiae* sur le cuivre provient de

la duplication du gène *CUPI* situé sur le chromosome 8. Seul l'hybride déstabilisé ayant perdu ce chromosome n'est plus capable de croître sur du milieu contenant du cuivre. Il est à noter que la perte du chromosome 14 diminue grandement la croissance de l'hybride. Il se peut donc qu'il y ait un ou plusieurs autres gènes non connus sur ce chromosome ayant un impact sur ce phénotype.

Dans un deuxième temps, plusieurs expériences ont été effectuées afin d'identifier les gènes de *S. cerevisiae* qui complètent ceux de *S. paradoxus*, permettant à l'hybride de croître à 37 °C. D'abord, la différence entre les taux de croissance entre les hybrides en compétition, soient les hybrides formés par *S. paradoxus* et la collection de délétion de *S. cerevisiae* et l'hybride de référence formé par *S. paradoxus* et *S. cerevisiae* avec le gène *HO* inactivé, a été mesurée par fluorescence. Grâce aux ratios de populations obtenus, plus de 100 gènes candidats potentiellement impliqués dans l'incapacité de croître à 37 °C chez *S. paradoxus* ont été identifiés. Il est possible que les gènes ayant les coefficients de sélection les plus négatifs soient des faux positifs. En effet, il se peut qu'il s'agisse de souches ayant subi des mutations aléatoires réduisant leur taux de croissance.

Les 28 gènes ayant les coefficients de sélection les plus négatifs ont été utilisés afin de construire des hybrides réciproques, c'est-à-dire des hybrides identiques excepté que pour un, la délétion du gène se situe au niveau de l'allèle de *S. paradoxus* et que pour l'autre, elle est au niveau de l'allèle de *S. cerevisiae*. Ces hybrides ont permis de vérifier la présence de faux positifs. La croissance de l'hybride ayant les deux allèles de *S. paradoxus* a pu être comparée avec celle d'un hybride contrôle. Il n'y a que les gènes YIL028W et YMR164C qui ont le même patron de croissance à 30°C et à 37 °C que l'hybride témoin. Il pourrait donc s'agir de faux positifs. Quant aux autres gènes, les hybrides montrent une croissance plus faible aux deux températures. La construction de ces hybrides a également permis de vérifier l'effet de dosage (haploinsuffisance). Leur croissance a été comparée à 37 °C et à 30 °C à deux reprises. Ce test a permis de faire ressortir certains gènes qui semblent être impliqués dans l'incapacité de croître à haute température chez *S. paradoxus*. D'abord, l'hybride ayant le gène YIL007C présent seulement pour l'allèle de *S. paradoxus* montre un taux de croissance plus élevé à 30 °C

que son hybride réciproque, mais plus bas à 37 °C. Ce patron concorde avec celui de la croissance qu'a la souche parentale de *S. paradoxus*. En effet, cette dernière montre une croissance plus élevée à 30 °C et plus faible à 37 °C que la souche parentale de *S. cerevisiae*. De plus, la fonction de ce gène est en lien avec la température. Il code pour une protéine du protéasome qui est impliqué dans la dégradation des protéines mal repliées ou dénaturées par la chaleur (Saeki *et al.*, 2009). Il se pourrait donc que ce gène soit moins adapté à haute température chez *S. paradoxus* ce qui entraînerait une accumulation de protéines dénaturées par la chaleur et qui causerait un effet toxique pour la cellule. Une autre hypothèse serait que la reconnaissance des protéines à dégrader se fait de façon moins efficace et qu'il ait des protéines normales qui soient dégradées à haute température. L'autre gène qui semble impliqué dans l'incapacité à croître chez *S. paradoxus* est le gène YMR077C. En effet, l'hybride ayant seulement l'allèle chez *S. paradoxus* montre une diminution de croissance à 37 °C plus importante que son hybride réciproque. Ce gène code pour une protéine faisant partie du complexe ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Il fait partie des quatre complexes qui dirigent le transport endolysosomal dans les cellules eucaryotes. Plus précisément, le complexe ESCRT-III participe à la déformation et à la vésiculation des membranes cellulaires pour le transport des protéines à être dégradées (Babst *et al.*, 2002). De plus, la protéine Vps20p est importante pour l'interaction entre trois des quatre complexes et semble impliquée dans la régulation de la protéine Vps4p, étant nécessaire à la dissociation du complexe ESCRT-II (Yeo *et al.*, 2003). Une hypothèse expliquant la perte de croissance à 37 °C de l'hybride n'ayant que l'allèle de *S. paradoxus* est qu'il est possible que cette protéine fonctionne moins bien à haute température entraînant un problème dans l'assemblage des complexes ESCRT. Ainsi, les protéines à dégrader par la chaleur ne peuvent être déplacées vers le lysosome et il y aurait une accumulation de protéines créant un effet toxique pour la cellule. Ce gène se situe sur le chromosome 13, l'un des chromosomes de *S. cerevisiae* qui diminue de façon significative le taux de croissance lorsqu'il est perdu chez l'hybride. Ces deux résultats indiquent donc que le gène YMR077C pourrait être un bon gène candidat dans l'adaptation à une température élevée. Il est d'ailleurs le seul gène qui ressort significatif dans l'expérimentation avec les hybrides réciproques qui se situe sur un des chromosomes trouvés dans l'expérience sur

la perte de chromosome. Compte tenu de son effet fort comparativement aux autres gènes, il pourrait être considéré comme un gène majeur.

Les résultats entre l'expérience de complémentation par perte de chromosomes et celle par perte de gènes ne concordent que très peu. Il n'y a que le gène obtenu YMR077C qui se retrouve sur le chromosome 13, l'un des chromosomes de *S. paradoxus* qui ne complémente pas la perte de celui de *S. cerevisiae* à 37 °C. La différence des résultats pourrait provenir des méthodes qui n'ont pas été les mêmes dans les deux cas. La première méthode consistait à enlever tout un chromosome de *S. cerevisiae* tandis que dans l'autre il n'y avait qu'un gène qui était inactivé. Dans le premier cas, il y a des souches de la collection de levures avec chromosome conditionnel qui n'ont pas bien réussi à perdre leur chromosome. Les chromosomes 7 et 11 n'ont pas pu être enlevés. Dans l'autre expérience, il n'y a que les 30 premiers gènes avec les coefficients de sélection les plus négatifs qui ont été utilisés. Il peut s'agir d'une combinaison de plusieurs gènes avec un effet plus faible situés sur les chromosomes trouvés. Une autre explication serait qu'en enlevant un chromosome complet, il y a des gènes qui ont été enlevés qui codaient pour des protéines interagissant avec des protéines codées par d'autres gènes situés sur les chromosomes toujours présents. Ces pertes d'interactions ont pu causer diverses réactions entraînant une perte de croissance. Toutefois, cette perte de croissance n'est pas causée par la température.

L'incapacité à croître à haute température chez *S. paradoxus* provient donc de nombreux gènes et non seulement d'un seul gène majeur. D'autres études illustrent également le fait qu'un phénotype complexe peut être sous le contrôle de plusieurs gènes. L'équipe de Saxena *et al.* (2011) ont étudié la résistance à la sécheresse chez le pois d'Angole (*Cajanus cajan*) en utilisant une espèce proche, le soja (*Glycine max*). En utilisant des puces d'hybridation génomique du soja sur de l'ARNc de six génotypes parentaux du pois d'Angole, ils ont trouvé 5 692 SFPs (« single feature polymorphisms »). De plus, ils ont trouvé 139 gènes candidats pouvant être associés à la résistance à la sécheresse en se basant sur une analyse de l'ontologie génétique des gènes du pois d'Angole homologues aux gènes du soja présentant des SFPs. L'équipe de Sinha *et al.* (2008) a également tenté

de comprendre les bases moléculaires derrière la capacité de croissance à haute température chez la levure, plus précisément *S. cerevisiae*. Ils ont utilisé une souche clinique, la souche de laboratoire S288c et l'hybride entre les deux. La souche clinique et l'hybride ont le meilleur taux de croissance à 41 °C. En utilisant une approche de cartographie par rétrocroisement, ils ont réussi à trouver trois nouveaux lieux de caractères quantitatifs (QTL) impliqués dans ce phénotype. Ces derniers se situent sur les chromosomes 4, 14 et 15. Leur approche a permis d'éliminer les effets d'épistasie, de liaison génétique et la taille de l'échantillon. Un total de 934 gènes qui causent une réduction du fitness à 37 °C a été trouvé. Certains de ces gènes sont les mêmes que ceux trouvés de *S. cerevisiae*, qui une fois inactivé, diminuent la capacité de croître de l'hybride à 37 °C. Il y a parmi ces gènes YBL058W, YIL038C, YMR077C et YPR096W qui sont en commun avec les hybrides qui sont réciproques pour les délétions. Il y a un total de 17 gènes en commun avec ceux trouvés par la comparaison des taux de croissance des hybrides fluorescents. La liste complète se retrouve à l'Annexe 5. Tirosh *et al.* (2006) ont également étudié la diversité phénotypique de quatre espèces proches de levure en décrivant la différence dans la réponse transcriptionnelle face à divers stress environnementaux, dont le choc thermique (30 °C et 37 °C), par hybridation sur puce à ADN de *S. cerevisiae*. Ils ont quantifié la variation d'expression des gènes entre les espèces et ont défini une mesure de divergence d'expression (ED). Cette mesure est basée sur les corrélations inter-espèces dans les patrons d'expression génique. Leur base de données est d'ailleurs disponible sur le Gene Expression Omnibus (GEO). Ils ont trouvé que les gènes qui contenaient une boîte TATA dans leurs promoteurs montraient une augmentation dans la variabilité d'expression entre les espèces. En utilisant leur résultats, il serait possible de mesurer la différence d'expression des gènes à 30 °C et à 37 °C entre *S. cerevisiae* et *S. paradoxus*. Les gènes qui ont une plus grande variation d'expression pourraient être comparés avec les gènes de *S. paradoxus* étant possiblement impliqués dans l'incapacité de croître à haute température. Une autre étude d'Howe *et al.* (2003) ont à l'inverse étudié l'adaptation au froid hivernal chez les arbres des régions boréales et tempérées. Encore une fois, par des analyses de QTL, ils ont démontré que les caractères d'adaptation au froid sont majoritairement contrôlés par des gènes multiples ayant des

effets faibles. Leurs résultats vont donc dans le même sens que ceux trouvés dans cette étude.

Dans le but de continuer ce projet, il y a certaines expérimentations qui pourraient être réalisées. D'abord, dans l'expérience visant à trouver les gènes impliqués dans la capacité à croître à 37 °C, il n'y a que les gènes non essentiels qui ont été testés. Il serait avantageux d'aller voir les gènes essentiels afin de vérifier l'effet du plus de gènes sur la capacité à croître à haute température. Cette expérience pourrait être faite grâce à une collection de *S. cerevisiae* haploïde dont chacune des souches a un gène essentiel conditionnel (Li *et al.*, 2011). En jouant avec la température, il est possible d'inactiver ce gène. Cette collection pourrait donc être croisée de la même façon que la collection de délétion qui a été utilisée dans le projet.

De plus, il serait avantageux de vérifier si la mutation qui cause l'incapacité de *S. paradoxus* se situe dans le promoteur ou dans la séquence codante des gènes candidats. En effet, le résultat obtenu pourrait venir contribuer au débat sur la vraie cause de la différenciation phénotypique entre espèces proches (Hoekstra et Coyne, 2007). Pour vérifier si l'incapacité de croître à 37 °C de *S. paradoxus* provient d'une mutation dans le promoteur ou dans la séquence codante des gènes candidats, le promoteur et la séquence codante de *S. cerevisiae* devraient être intégrés séparément dans *S. paradoxus*. La croissance à 37 °C sur milieu solide pourrait être comparée entre les deux souches de *S. paradoxus*. Une absence de croissance chez la souche avec le promoteur, mais la présence de croissance chez la souche ayant la séquence codante de *S. cerevisiae*, indiquerait que la mutation se retrouve dans la séquence codante de *S. paradoxus* et que c'est la fonction ou la structure de la protéine qui serait en cause dans la différence de phénotype. À l'inverse, si la souche ayant le promoteur croît, mais que celle avec la séquence codante est incapable, cela indiquerait que la mutation se situe dans le promoteur du gène de *S. paradoxus*, impliquant que la régulation du gène est responsable de la différence de phénotype. L'alignement entre *S. cerevisiae* et *S. paradoxus* pour les gènes YIL007C et YMR077C se retrouve en annexe 6. Le pourcentage moyen d'identité nucléotidique moyenne entre *S. cerevisiae* et *S. paradoxus* est de 90% (Kellis *et al.*,

2003), ce qui correspond aux alignements des gènes YIL007C et YMR077C. Les mutations se situent de façon aléatoire dans les gènes et ne se concentrent pas au niveau du promoteur ou de la séquence codante.

D'autres phénotypes pourraient être utilisés avec l'approche utilisée dans cette étude. La résistance à certaines drogues ou à certains métaux pourrait être étudiée. À l'inverse d'étudier la capacité à croître à haute température, la capacité à croître à basse température pourrait être examinée. Dans ce cas, il serait préférable d'utiliser une espèce de levure cryotolérante comme *S. kudriavzevii* ou *S. bayanus* var *uvarum* qui montrent une température de croissance optimale plus basse. La même méthodologie pourrait être appliquée, mais à l'inverse de trouver les chromosomes de *S. paradoxus* qui complètent ceux de *S. cerevisiae* et permettent à l'hybride de croître à plus haute température, ce sont les chromosomes de l'espèce cryotolérante qui complètent ceux de *S. cerevisiae*, permettant à l'hybride de croître à basse température, qui seraient identifiés.

Bref, la capacité de croître à haute température est un trait complexe qui doit être encore étudié afin de bien comprendre ces bases moléculaires. En effet, dans ce genre de phénotype, il est difficile de faire une correspondance directe entre le génotype et le phénotype en raison des effets pléiotropiques, des interactions génotype-environnement et de l'épistasie. Toutefois, cette étude a permis de démontrer que ce trait phénotypique, séparant *S. cerevisiae* et *S. paradoxus*, est sous le contrôle de plusieurs gènes ayant un effet mineur.

La base génétique de la variation inter-espèces demeure encore largement méconnue (Tirosch *et al.*, 2010). Plusieurs approches sont utilisées afin d'en connaître davantage. L'une d'entre elles est la génomique comparative, soit l'étude comparative de la structure et de la fonction des génomes de différentes espèces. Cette approche a permis d'en apprendre plus sur l'évolution de la régulation par l'étude individuelle des gènes. Des changements dans les séquences génomiques entraînent des différences de régulation qui vont avoir une influence sur l'expression des gènes (Wray, 2007). L'étude des locus de caractères quantitatifs (QTL) permet également de localiser un des gènes impliqués dans

l'expression d'un trait quantitatif. La présence d'un QTL est déduite de la cartographie génétique. Il est possible de faire une cartographie fine de QTL combinée à une étude d'expression quantitative, par exemple à l'aide d'une puce à ADN, afin de trouver une dizaine de gènes candidats pour le caractère (Wayne et McIntyre, 2002).

## Bibliographie

- Abzhanov, A., W.P. Kuo, C. Hartmann, B.R. Grant, P.R. Grant, et C.J. Tabin. 2006. The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches. *Nature*. 442:563-567.
- Alvaro, D., I. Sunjevaric, R.J. Reid, M. Lisby, D.J. Stillman, et R. Rothstein. 2006. Systematic hybrid LOH: a new method to reduce false positives and negatives during screening of yeast gene deletion libraries. *In Yeast*. Vol. 23. 1097-1106.
- Babst, M., D.J. Katzmann, W.B. Snyder, B. Wendland, et S.D. Emr. 2002. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Developmental cell*. 3:283-289.
- Boeke, J.D., J. Trueheart, G. Natsoulis, et G.R. Fink. 1987. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in enzymology*. 154:164-175.
- Bradshaw, H.D., et D.W. Schemske. 2003. Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature*. 426:176-178.
- Coyne, J.A et H.A. Orr. 1992. The genetics of adaptation: a reassessment. *The American naturalist*. 140(5):725-42.
- Cubillos, F.A., E.J. Louis, et G. Liti. 2009. Generation of a large set of genetically tractable haploid and diploid *Saccharomyces* strains. *FEMS yeast research*. 9:1217-1225.
- DeLuna, A., K. Vetsigian, N. Shores, M. Hegreness, M. Colon-Gonzalez, S. Chao, et R. Kishony. 2008. Exposing the fitness contribution of duplicated genes. *Nature genetics*. 40:676-681.
- Fogel, S., et J.W. Welch. 1982. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79:5342-5346.
- Gause, G.F. 1934. Experimental analysis of vito volterra's mathematical theory of the struggle for existence. *Science*. 79:16-17.
- Giaever, G., A.M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A.P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K.D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D.J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J.H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D.F. Jaramillo, D.E. Kelly, S.L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D.C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S.L. Ooi, J.L. Revuelta, C.J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D.D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, J.N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C.Y. Wang, T.R. Ward, J. Wilhelmy, E.A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J.D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R.W. Davis, et M. Johnston. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*. 418:387-391.
- Gietz, R.D., et R.A. Woods. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology*. 350:87-96.
- Goddard, M.R. 2008. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology*. 89:2077-2082.

- Greig D., E.J. Louis, R.H. Borts et M. Travisano. 2002. Hybrid speciation in experimental populations of yeast. *Science*. 298(5599):1773-5.
- Gueldener, U., J. Heinisch, G.J. Koehler, D. Voss, et J.H. Hegemann. 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic acids research*. 30:e23.
- Hill, J.A., et S.P. Otto. 2007. The role of pleiotropy in the maintenance of sex in yeast. *Genetics*. 175:1419-1427.
- Hoekstra, H.E. et J.A. Coyne. 2007. The locus of evolution: evo devo and the genetics of adaptation. *Evolution*. 61:995-1016.
- Hoekstra, H.E., R.J. Hirschmann, R.A. Bunday, P.A. Insel, et J.P. Crossland. 2006. A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern. *Science*. 313:101-104.
- Howe, G.T., S.N. Aitken, D.B. Neale, K.D. Jermstad, N.C. Wheeler, et T.H.H. Chen. 2003. From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Can J Bot*. 81:1247-1266.
- Kao, K.C., K. Schwartz, et G. Sherlock. 2010. A genome-wide analysis reveals no nuclear dobzhansky-muller pairs of determinants of speciation between *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*, but suggests more complex incompatibilities. *PLoS genetics*. 6:e1001038.
- Keller, I., et O. Seehausen. 2012. Thermal adaptation and ecological speciation. *Molecular ecology*. 21:782-799.
- Kellis, M., N. Patterson, M. Endrizzi, B. Birren, et E.S. Lander. 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*. 423:241-254.
- Kingsolver, J.G. 2009. The well-temperated biologist. (American Society of Naturalists Presidential Address). *The American naturalist*. 174:755-768.
- Landry, C.R., J.P. Townsend, D.L. Hartl, et D. Cavalieri. 2006. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular ecology*. 15:575-591.
- Li, Z., F.J. Vizeacoumar, S. Bahr, J. Li, J. Warringer, F.S. Vizeacoumar, R. Min, B. Vandersluis, J. Bellay, M. Devit, J.A. Fleming, A. Stephens, J. Haase, Z.Y. Lin, A. Baryshnikova, H. Lu, Z. Yan, K. Jin, S. Barker, A. Datti, G. Giaever, C. Nislow, C. Bulawa, C.L. Myers, M. Costanzo, A.C. Gingras, Z. Zhang, A. Blomberg, K. Bloom, B. Andrews, et C. Boone. 2011. Systematic exploration of essential yeast gene function with temperature-sensitive mutants. *Nature biotechnology*. 29:361-367.
- Liti, G., D.M. Carter, A.M. Moses, J. Warringer, L. Parts, S.A. James, R.P. Davey, I.N. Roberts, A. Burt, V. Koufopanou, I.J. Tsai, C.M. Bergman, D. Bensasson, M.J. O'Kelly, A. van Oudenaarden, D.B. Barton, E. Bailes, A.N. Nguyen, M. Jones, M.A. Quail, I. Goodhead, S. Sims, F. Smith, A. Blomberg, R. Durbin, et E.J. Louis. 2009. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*. 458:337-341.
- Liti, G., D.B.H. Barton, et E.J. Louis. 2006. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics*. 174:839-850.

- Matute, D.R., C.J. Novak, et J.A. Coyne. 2009. Temperature-based extrinsic reproductive isolation in two species of *Drosophila*. *Evolution; international journal of organic evolution*. 63:595-612.
- Mundy, N.I., N.S. Badcock, T. Hart, K. Scribner, K. Janssen, et N.J. Nadeau. 2004. Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice. *Science*. 303:1870-1873.
- Naumov, G.I., E.S. Naumova, et P.D. Sniegowski. 1998. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. *Canadian journal of microbiology*. 44:1045-1050.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Reid, R.J., I. Sunjevaric, W.P. Voth, S. Ciccone, W. Du, A.E. Olsen, D.J. Stillman, et R. Rothstein. 2008. Chromosome-scale genetic mapping using a set of 16 conditionally stable *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. *Genetics*. 180:1799-1808.
- Replansky, T., V. Koufopanou, D. Greig, et G. Bell. 2008. *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology. *Trends in ecology & evolution*. 23:494-501.
- Rose M., F.W., P. Hieter. 1990. Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 198 pp.
- Saeki, Y., E.A. Toh, T. Kudo, H. Kawamura, et K. Tanaka. 2009. Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. *Cell*. 137:900-913.
- Salvado, Z., F.N. Arroyo-Lopez, J.M. Guillamon, G. Salazar, A. Querol, et E. Barrio. 2011. Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Applied and environmental microbiology*. 77:2292-2302.
- Sampaio, J.P., et P. Goncalves. 2008. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied and environmental microbiology*. 74:2144-2152.
- Saxena, R.K., X. Cui, V. Thakur, B. Walter, T.J. Close, et R.K. Varshney. 2011. Single feature polymorphisms (SFPs) for drought tolerance in pigeonpea (*Cajanus spp.*). *Functional & integrative genomics*. 11:651-657.
- Shapiro, M.D., M.E. Marks, C.L. Peichel, B.K. Blackman, K.S. Nereng, B. Jonsson, D. Schluter, et D.M. Kingsley. 2004. Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature*. 428:717-723.
- Sinha, H., L. David, R.C. Pascon, S. Clauder-Munster, S. Krishnakumar, M. Nguyen, G. Shi, J. Dean, R.W. Davis, P.J. Oefner, J.H. McCusker, et L.M. Steinmetz. 2008. Sequential elimination of major-effect contributors identifies additional quantitative trait loci conditioning high-temperature growth in yeast. *Genetics*. 180:1661-1670.
- Sniegowski, P.D., P.G. Dombrowski, et E. Fingerman. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS yeast research*. 1:299-306.

- Sweeney, J.Y., H.A. Kuehne, et P.D. Sniegowski. 2004. Sympatric natural *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* populations have different thermal growth profiles. *FEMS yeast research*. 4:521-525.
- Tirosh, I., N. Sigal, et N. Barkai. 2010. Divergence of nucleosome positioning between two closely related yeast species: genetic basis and functional consequences. *Molecular systems biology*. 6:365.
- Tirosh, I., A. Weinberger, M. Carmi, et N. Barkai. 2006. A genetic signature of interspecies variations in gene expression. *Nature genetics*. 38:830-834.
- Wayne, M.L., et L.M. McIntyre. 2002. Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:14903-14906.
- Wray, G.A. 2007. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nature reviews. Genetics*. 8:206-216.
- Yeo, S.C., L. Xu, J. Ren, V.J. Boulton, M.D. Wagle, C. Liu, G. Ren, P. Wong, R. Zahn, P. Sasajala, H. Yang, R.C. Piper, et A.L. Munn. 2003. Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*. 116:3957-3970.

## Annexe 1. Tables d'ANOVA pour la perte des chromosomes

### Chromosome 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,00058516	0,00058516	3,08682916	0,08986039	.
temp	1	1,64E-05	1,64E-05	0,08674994	0,77052298	
chromo:temp	1	0,00169702	0,00169702	8,95205261	0,00572966	**
Residuals	28	0,00530789	0,00018957	NA	NA	

### Chromosome 2

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,00221599	0,00221599	3,54153586	0,07028283	.
temp	1	0,00089762	0,00089762	1,43455617	0,24106344	
chromo:temp	1	0,01179437	0,01179437	18,8494295	0,00016714	***
Residuals	28	0,01752001	0,00062572	NA	NA	

### Chromosome 3

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,06595725	0,06595725	101,91944	7,80E-11	***
temp	1	0,03699387	0,03699387	57,1642211	3,10E-08	***
chromo:temp	1	0,02459975	0,02459975	38,0123982	1,17E-06	***
Residuals	28	0,01812022	0,00064715	NA	NA	

### Chromosome 4

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	9,13E-05	9,13E-05	0,33985613	0,56457842	
temp	1	0,00362046	0,00362046	13,4705237	0,00100975	**
chromo:temp	1	0,00059288	0,00059288	2,20591624	0,14865489	
Residuals	28	0,00752553	0,00026877	NA	NA	

### Chromosome 5

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,0175965	0,0175965	37,1769306	1,41E-06	***
temp	1	0,00101115	0,00101115	2,1363056	0,15498106	
chromo:temp	1	0,00296435	0,00296435	6,26292687	0,01844118	*
Residuals	28	0,01325289	0,00047332	NA	NA	

### Chromosome 6

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,11094338	0,11094338	807,975711	3,40E-22	***
temp	1	0,05302149	0,05302149	386,14362	6,44E-18	***
chromo:temp	1	0,02741517	0,02741517	199,658491	2,88E-14	***
Residuals	28	0,00384469	0,00013731	NA	NA	

### Chromosome 8

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,00972915	0,00972915	68,7975982	5,02E-09	***
temp	1	0,00062955	0,00062955	4,45172917	0,04393183	*
chromo:temp	1	0,00205287	0,00205287	14,5163951	0,00069765	***
Residuals	28	0,00395968	0,00014142	NA	NA	

### Chromosome 9

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,01280175	0,01280175	130,670215	4,64E-12	***
temp	1	0,00441164	0,00441164	45,0305761	2,77E-07	***
chromo:temp	1	0,00422567	0,00422567	43,1322828	4,03E-07	***
Residuals	28	0,00274316	9,80E-05	NA	NA	

#### Chromosome 10

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,0168326	0,0168326	223,829863	6,97E-15	***
temp	1	0,01433377	0,01433377	190,601933	5,10E-14	***
chromo:temp	1	0,00135555	0,00135555	18,0252603	0,00021679	***
Residuals	28	0,00210568	7,52E-05	NA	NA	

#### Chromosome 12

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,01627134	0,01627134	129,561311	5,13E-12	***
temp	1	0,00665639	0,00665639	53,0018087	6,32E-08	***
chromo:temp	1	6,06E-05	6,06E-05	0,48280774	0,49287946	
Residuals	28	0,00351646	0,00012559	NA	NA	

#### Chromosome 13

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,04271683	0,04271683	102,286308	7,50E-11	***
temp	1	0,03111723	0,03111723	74,5108364	2,23E-09	***
chromo:temp	1	0,00674043	0,00674043	16,1401011	0,00040097	***
Residuals	28	0,01169337	0,00041762	NA	NA	

#### Chromosome 14

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,09116942	0,09116942	738,524171	1,15E-21	***
temp	1	0,03075379	0,03075379	249,123176	1,81E-15	***
chromo:temp	1	0,00656994	0,00656994	53,220283	6,08E-08	***
Residuals	28	0,00345655	0,00012345	NA	NA	

#### Chromosome 15

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,00745617	0,00745617	55,0617992	4,42E-08	***
temp	1	0,00991417	0,00991417	73,2134826	2,67E-09	***
chromo:temp	1	0,00021501	0,00021501	1,58776533	0,21804688	
Residuals	28	0,00379161	0,00013542	NA	NA	

#### Chromosome 16

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
chromo	1	0,00521367	0,00521367	32,0161671	4,61E-06	***
temp	1	0,00986144	0,00986144	60,557195	1,78E-08	***
chromo:temp	1	0,00013903	0,00013903	0,8537482	0,36338894	
Residuals	28	0,00455966	0,00016285	NA	NA	

## Annexe 2. Tables d'ANOVA pour la comparaison des hybrides réciproques

Signification des codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1

### YBL058W

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,00374937	0,00374937	2,10510834	0,15460556
temp	1	0,06969735	0,06969735	39,1319907	2,07E-07 ***
gene:temp	1	0,00764259	0,00764259	4,29097984	0,04480757 *
Residuals	40	0,07124334	0,00178108	NA	NA

### YBL072C

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,00048816	0,00048816	0,11679311	0,73416589
temp	1	0,22655533	0,22655533	54,2039008	3,38E-09 ***
gene:temp	1	0,00235084	0,00235084	0,56244443	0,45726857
Residuals	44	0,18390622	0,00417969	NA	NA

### YBR224W

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,00092513	0,00092513	0,35443516	0,55544337
temp	1	0,09228291	0,09228291	35,3554326	9,09E-07 ***
gene:temp	1	8,37E-05	8,37E-05	0,03207397	0,85889815
Residuals	35	0,09135517	0,00261015	NA	NA

### YDR127W

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,00496854	0,00496854	0,67778628	0,41489279
temp	1	0,04580788	0,04580788	6,24890704	0,01632185 *
gene:temp	1	0,00318906	0,00318906	0,43503708	0,51304492
Residuals	43	0,31521333	0,00733054	NA	NA

### YHR073W

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,00388242	0,00388242	1,73388858	0,19522813
temp	1	0,10699723	0,10699723	47,7849746	2,19E-08 ***
gene:temp	1	0,00027585	0,00027585	0,12319352	0,72739353
Residuals	41	0,09180472	0,00223914	NA	NA

### YIL007C

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,00023531	0,00023531	0,0637436	0,80196688
temp	1	0,07896033	0,07896033	21,3898054	3,88E-05 ***
gene:temp	1	0,01976254	0,01976254	5,35353497	0,02590128 *
Residuals	40	0,14765974	0,00369149	NA	NA

### YIL028W

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,00215724	0,00215724	4,47072849	0,04045784 *
temp	1	0,25727497	0,25727497	533,185496	1,72E-25 ***
gene:temp	1	0,00260838	0,00260838	5,40570421	0,02497668 *
Residuals	42	0,02026602	0,00048252	NA	NA

## YIL038C

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
gene	1	0,12921178	0,12921178	19,183174	7,24E-05	***
temp	1	0,40660981	0,40660981	60,366532	8,66E-10	***
gene:temp	1	0,00570696	0,00570696	0,84727193	0,36234456	
Residuals	44	0,29637005	0,00673568	NA	NA	

## YIL042C

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
gene	1	0,0029724	0,0029724	0,37729417	0,54221814	
temp	1	0,21216176	0,21216176	26,9302588	5,15E-06	***
gene:temp	1	0,00165124	0,00165124	0,20959674	0,64933657	
Residuals	44	0,34664046	0,00787819	NA	NA	

## YIL065C

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
gene	1	0,00673118	0,00673118	3,35315375	0,07453221	.
temp	1	0,20845887	0,20845887	103,844267	1,12E-12	***
gene:temp	1	0,00151248	0,00151248	0,75344358	0,39056618	
Residuals	40	0,08029673	0,00200742	NA	NA	

## YIL077C

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
gene	1	0,01681073	0,01681073	2,35703239	0,13259212	
temp	1	0,11625766	0,11625766	16,3004873	0,00023755	***
gene:temp	1	0,00925832	0,00925832	1,29810843	0,26133623	
Residuals	40	0,28528633	0,00713216	NA	NA	

## YMR077C

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
gene	1	0,02045183	0,02045183	5,42983007	0,02506219	*
temp	1	0,0597808	0,0597808	15,8714221	0,00028736	***
gene:temp	1	0,01841042	0,01841042	4,88785001	0,0329787	*
Residuals	39	0,14689618	0,00376657	NA	NA	

## YMR164C

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
gene	1	0,00246099	0,00246099	1,24728167	0,27073606	
temp	1	0,22355736	0,22355736	113,303501	3,09E-13	***
gene:temp	1	0,00658889	0,00658889	3,3393876	0,07510692	.
Residuals	40	0,07892337	0,00197308	NA	NA	

## YMR215W

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
gene	1	0,05598349	0,05598349	6,89355304	0,01229374	*
temp	1	0,09503429	0,09503429	11,7020913	0,00147761	**
gene:temp	1	0,00434802	0,00434802	0,5353951	0,46872164	
Residuals	39	0,31672436	0,00812114	NA	NA	

## YMR284W

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,01041009	0,01041009	1,26610839	0,26659862
temp	1	0,27964864	0,27964864	34,011758	5,96E-07 ***
gene:temp	1	0,00840711	0,00840711	1,02249981	0,31745535
Residuals	44	0,36177314	0,00822212	NA	NA

## YOR043W

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,01189789	0,01189789	4,50783314	0,0396754 *
temp	1	0,2905005	0,2905005	110,063913	2,63E-13 ***
gene:temp	1	0,01135438	0,01135438	4,30191289	0,04423664 *
Residuals	42	0,11085396	0,00263938	NA	NA

## YOR096W

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,03980608	0,03980608	13,6443199	0,00060737 ***
temp	1	0,18147004	0,18147004	62,2024423	5,87E-10 ***
gene:temp	1	1,35E-05	1,35E-05	0,00462823	0,94606912
Residuals	44	0,12836605	0,00291741	NA	NA

## YOR344C

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	9,66E-05	9,66E-05	0,02125253	0,88484401
temp	1	0,0309543	0,0309543	6,8128382	0,01277354 *
gene:temp	1	0,0023818	0,0023818	0,52421882	0,47336863
Residuals	39	0,17719747	0,00454353	NA	NA

## YOR347C

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,01747734	0,01747734	6,37031207	0,01590422 *
temp	1	0,04879747	0,04879747	17,7861835	0,0001474 ***
gene:temp	1	0,00656281	0,00656281	2,39207638	0,13024021
Residuals	38	0,10425529	0,00274356	NA	NA

## YPR128W

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gene	1	0,00392686	0,00392686	1,10680444	0,29942194
temp	1	0,08985501	0,08985501	25,3260788	1,20E-05 ***
gene:temp	1	0,00101369	0,00101369	0,28571272	0,59609496
Residuals	38	0,13482112	0,00354792	NA	NA

## Hybride témoin

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
temp	1	0,20205365	0,20205365	247,012551	1,91E-13 ***
Residuals	22	0,01799577	0,00081799	NA	NA

### **Annexe 3.** Description de l'organisation des données dans les dossiers informatiques

Les données obtenues dans ce projet ont été réparties dans des dossiers séparés pour chaque expérimentation :

#### Dossier « Chromosome »

Il s'agit du dossier pour l'expérience sur la perte des chromosomes. Il contient les sous-dossiers suivant :

**Bioscreen :** Ce dossier contient les données obtenus par le Bioscreen C et analysées. Le dossier « final » contient les données utilisées dans ce projet. Il y a les deux tests (Test1 et Test2) qui ont été fait et les deux températures testées (30 °C et 37 °C) pour chacun d'eux. Il y a aussi un dossier pour les ANOVA réalisées ainsi qu'un dossier pour la corrélation entre les tests. Le dossier « Vieux tests » sont les différents tests qui ont été effectués afin d'optimiser l'expérience. Les différents scripts utilisés pour calculer les taux de croissance, les ANOVA, les corrélations ainsi que pour faire les graphiques se retrouvent dans le dossier « Scripts ».

**Croisements diploïdes :** Il contient les photos des sélections des croisements entre la souche MG001 et les différentes souches de la collection de *S. cerevisiae* avec chromosomes conditionnels.

**Réplique YPGal :** Il contient les photos des hybrides étalés sur du milieu YPGal.

**Réplique FOA :** Il contient les photos des hybrides étalés sur du milieu contenant du 5-FOA.

**Confirmation FOA :** Il contient les photos de la deuxième sélection sur 5-FOA de certaines colonies de la première sélection.

**Vérification perte chromosome :** Il contient les photos des gels d'agarose pour vérifier la perte des chromosomes. Le dossier « Gels divers » contient les photos des souches testées. Le dossier « Bonnes photos » contient les gels qui présentent une souche qui a perdu le bon chromosome uniquement. Puis, le dossier « Photos coupées » contient les gels des hybrides utilisés dans le projet et qui ont servis à faire la figure 7.

**Spot :** Ce dossier contient les résultats des tests de croissance sur milieu solide. Le dossier « Photo » contient les photos originales et le dossier « Figures Photos » contient les photos coupées pour chacun des chromosomes.

**Oligos :** Il contient les amorces utilisées pour vérifier la perte de chromosome et un fichier des diverses amorces possibles à utiliser.

Figures : Il contient les figures pour l'expérience sur la perte de chromosome, soit la méthode de vérification de la perte, des résultats obtenus pour la vérification, le test de croissance sur milieu solide et le test en milieu liquide.

#### Dossier « Alex Deluna »

Il s'agit du dossier pour l'expérience sur l'identification des gènes impliqués dans le phénotype qui a été fait en collaboration avec Alexander Deluna.

Oligos : Il contient la liste des amorces utilisées pour intégrer les cassettes mCherry et Cerulean dans *S. paradoxus* et *S. cerevisiae*.

Transformations : Il contient les photos des transformations de *S. paradoxus* et *S. cerevisiae* avec les cassettes mCherry et Cerulean.

Fluorescence : Il contient les photos prises pour vérifier l'intégration des cassettes en visualisant la fluorescence de *S. paradoxus* et *S. cerevisiae*.

Croisements : Il contient les photos des plaques de sélection des croisements entre *S. par-mCherry* et la collection de délétion de *S. cerevisiae*. Il y a également les photos de la sélection entre *S. par-Cerulean* et *S. cerevisiae*  $\Delta$ HO. Il y a aussi un fichier qui décrit les positions manquantes sur les plaques de croisement.

Ratios : Il contient les graphiques des ratios de populations entre *S. par-mCherry* et *S. par-Cerulean*, ainsi que le graphique de la fréquence des gènes en fonction du coefficient de sélection.

Spot : Il contient les photos des tests de croissance de *S. cerevisiae* avec la délétion pour les 30 gènes ayant le coefficient de sélection les plus négatifs à 30 °C et 37 °C.

Résultat : Il contient le fichier contenant les gènes candidats obtenus par le test de compétition avec leur coefficient de sélection.

Bioscreen : Il contient un dossier qui décrit les résultats obtenus pour un test qui était destiné à mesurer l'effet de dosage, mais qui n'a pas servi dans ce projet. L'autre sous-dossier contient les tests préliminaires pour mesurer l'effet de dosage.

#### Dossier « Hybrides réciproques »

Il s'agit du dossier pour l'expérience avec les hybrides réciproques. Il contient les sous-dossiers suivant :

Final août 2012 : Ce dossier contient les données obtenues par Bioscreen C pour les deux tests à 30 °C et 37 °C. Il y a aussi un dossier avec les ANOVA calculées pour chacun des gènes et un dossier pour le calcul du coefficient de corrélation.

Spot : Il contient les photos des tests de croissance des hybrides réciproques à 30 °C et 37 °C.

Oligos : Il contient un tableau avec les différentes amorces afin de faire la délétion des gènes dans *S. paradoxus* et *S. cerevisiae* et construire les hybrides réciproques.

Scripts : Il contient les scripts utilisés pour les différentes analyses, soit pour calculer les taux de croissance, faire les ANOVA, faire les graphiques et calculer le coefficient de corrélation.

Vieux tests : Il contient les résultats des tests préliminaires réalisés avec le Bioscreen C.

#### Dossier « Article Chromo »

Ce dossier contient toutes les données et figures pour l'article soumis sur l'expérience de la perte de chromosome.

Données : Il contient les données utilisées dans l'article. Il s'agit des mêmes données que dans le sous-dossier « Final » dans le dossier « Chromosome ».

Figures : Il contient les différentes figures utilisées dans l'article.

Papier : Il contient les différentes versions écrites de l'article.

Tableaux : Il contient un tableau des souches utilisées dans l'expérimentation et également des amorces utilisées.

#### Dossier « Global »

Il contient un tableau récapitulatif de toutes les expériences mises en commun.

#### Dossier « Références »

Tous les articles en référence dans le mémoire se retrouvent dans ce dossier. Il y a également le dossier EndNote qui a servi à faire la bibliographie.

#### Dossier « Souches »

Il contient un tableau de toutes les souches de levures utilisées avec la position de leurs glycérols dans le congélateur à -80 °C.

**Annexe 4.** Résultats des 120 gènes de *S. cerevisiae* dont la délétion chez l'hybride entraîne une diminution du taux de croissance à 37°C.

<b>Nom systématique</b>	<b>Nom standard</b>	<b>Nom du gène</b>	<b>Chromosome</b>	<b>Coefficient de sélection</b>
YBL001C	<i>ECM15</i>	ExtraCellular Mutant	chrII	-0,1354
YBL017C	<i>PEP1</i>	carboxyPEPTidase Y-deficient	chrII	-0,0942
YBL042C	<i>FUI1</i>	5-FIUorourldine resistance	chrII	-0,1196
YBL058W	<i>SHP1</i>	Suppressor of High-copy PP1 Ribosomal Protein of the Small	chrII	-0,1789 -0,2616
YBL072C	<i>RPS8A</i>	subunit	chrII	
YBR224W	<i>ND</i>	ORF incertain Mitochondrial Genome	chrII	-0,2254 -0,1371
YCL044C	<i>MGR1</i>	Required	chrIII	
YDR072C	<i>IPT1</i>	InositolPhosphoTransferase	chrIV	-0,1111
YDR076W	<i>RAD55</i>	RADIation sensitive	chrIV	-0,3792
YDR123C	<i>INO2</i>	INOsitol requiring	chrIV	-0,311
YDR127W	<i>ARO1</i>	AROmatic amino acid requiring	chrIV	-0,2803
YDR183W	<i>PLP1</i>	Phosducin-Like Protein	chrIV	-0,1013
YDR192C	<i>NUP42</i>	NUclear Pore	chrIV	-0,1157
YDR226W	<i>ADK1</i>	ADenylyate Kinase	chrIV	-0,109
YDR336W	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrIV	-0,1001
YDR389W	<i>SAC7</i>	Suppressor of ACTin	chrIV	-0,0994
YER056C	<i>FCY2</i>	FluoroCYtosine resistance	chrV	-0,109
YER060W-A	<i>FCY22</i>	FluoroCYtosine resistance	chrV	-0,129
YER090W	<i>TRP2</i>	TRyPtophan requiring	chrV	-0,1778
YER096W	<i>SHC1</i>	Sporulation-specific Homolog of CSD4	chrV	-0,14
YFL030W	<i>AGX1</i>	Alanine:Glyoxylate aminotrans(X)ferase	chrVI	-0,0976
YFL034W	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrVI	-0,1736
YFR031C-A	<i>RPL2A</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	chrVI	-0,0966
YGL031C	<i>RPL24A</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	chrVII	-0,0977
YGL090W	<i>LIF1</i>	Ligase Interacting Factor Poly(A)-binding protein-dependent poly(A)	chrVII	-0,1084 -0,1033
YGL094C	<i>PAN2</i>	riboNuclease	chrVII	
YGL096W	<i>TOS8</i>	Target Of Sbf	chrVII	-0,1536
YGL210W	<i>YPT32</i>	Yeast Protein Two	chrVII	-0,1282
YGL215W	<i>CLG1</i>	Cyclin-Like Gene	chrVII	-0,1287
YGR007W	<i>ECT1</i>	Ethanolamine-phosphate CytidylylTransferase	chrVII	-0,0957
YGR019W	<i>UGA1</i>	Utilization of GAba	chrVII	-0,1273
YGR270W	<i>YTA7</i>	Yeast Tat-binding Analog	chrVII	-0,1321
YHL005C	<i>ND</i>	ORF incertain	chrVIII	-0,14
YHR012W	<i>VPS29</i>	Vacuolar Protein Sorting	chrVIII	-0,1232
YHR031C	<i>RRM3</i>	rDNA Recombination Mutation	chrVIII	-0,11
YHR057C	<i>CPR2</i>	Cyclosporin-sensitive Proline Rotamase	chrVIII	-0,1483
YHR066W	<i>SSF1</i>	Suppressor of ste4 (Four)	chrVIII	-0,1001

Suite Annexe 4.

Nom systématique	Nom standard	Nom du gène	Chromosome	Coefficient de sélection
YHR073W	<i>OSH3</i>	OxySterol binding protein Homolog	chrVIII	-0,2836
YHR075C	<i>PPE1</i>	Phosphoprotein Phosphatase methylEsterase	chrVIII	-0,1899
YHR103W	<i>SBE22</i>	similar to SBE2	chrVIII	-0,1337
YHR111W	<i>UBA4</i>	UBiquitin-like protein Activating	chrVIII	-0,1343
YHR130C	<i>ND</i>	ORF incertain	chrVIII	-0,1695
YHR136C	<i>SPL2</i>	Suppressor of PLC1 deletion	chrVIII	-0,1091
YHR203C	<i>RPS4B</i>	Ribosomal Protein of the Small subunit	chrVIII	-0,0962
YIL005W	<i>EPS1</i>	ER protein	chrIX	-0,176
YIL007C	<i>NAS2</i>	Non-ATPase Subunit	chrIX	-0,1975
YIL015C-A	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrIX	-0,1061
YIL015W	<i>BAR1</i>	BARrier to the alpha factor response	chrIX	-0,1105
YIL028W	<i>ND</i>	ORF incertain	chrIX	-0,1764
YIL036W	<i>CST6</i>	Chromosome STability Subunit of the CCR4-NOT complex	chrIX	-0,121
YIL038C	<i>NOT3</i>	complex	chrIX	-0,1737
YIL042C	<i>PKP1</i>	Protein Kinase of PDH Defective for Filamentous Growth	chrIX	-0,1743
YIL049W	<i>DFG10</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	chrIX	-0,1678
YIL052C	<i>RPL34B</i>	subunit	chrIX	-0,1332
YIL053W	<i>RHR2</i>	Related to HoR2 Secretion and Early	chrIX	-0,1596
YIL064W	<i>SEE1</i>	Endocytosis	chrIX	-0,1202
YIL065C	<i>FIS1</i>	mitochondrial FISsion	chrIX	-0,1882
YIL073C	<i>SPO22</i>	SPOrulation	chrIX	-0,095
YIL077C	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrIX	-0,1769
YIL092W	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrIX	-0,1571
YIR024C	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrIX	-0,1022
YKL211C	<i>TRP3</i>	TRyPtophan requiring	chrXI	-0,1417
YKL214C	<i>YRA2</i>	Yeast RNA Annealing protein	chrXI	-0,1599
YKL216W	<i>URA1</i>	URAcil requiring symporter of the plasma membrane	chrXI	-0,102
YKL217W	<i>JEN1</i>	Gea1-6 Membrane-associated	chrXI	-0,1298
YKR030W	<i>GMH1</i>	High-copy suppressor	chrXI	-0,0961
YKR048C	<i>NAP1</i>	Nucleosome Assembly Protein	chrXI	-0,138
YLL047W	<i>ND</i>	ORF incertain late ENdosome and Vacuole interface function	chrXII	-0,1454
YLR065C	<i>ENV10</i>	interface function	chrXII	-0,153
YLR080W	<i>EMP46</i>	Catabolism of Hydroxy Amino acids	chrXII	-0,1288
YLR098C	<i>CHA4</i>	purine nucleoside phosphorylase	chrXII	-0,1118
YLR209C	<i>PNP1</i>	Nonsense-Mediated mRNA Decay	chrXII	-0,099
YLR363C	<i>NMD4</i>	Decay	chrXII	-0,113
YML056C	<i>IMD4</i>	IMP Dehydrogenase	chrXIII	-0,1569

Suite Annexe 4.

Nom systématique	Nom standard	Nom du gène	Chromosome	Coefficient de sélection
YMR077C	<i>VPS20</i>	Vacuolar Protein Sorting Glucose-6-phosphate 1-	chrXIII	-0,1743 -0,1006
YMR099C	<i>ND</i>	epimerase	chrXIII	
YMR106C	<i>YKU80</i>	Yeast KU protein	chrXIII	-0,1147
YMR164C	<i>MSS11</i>	Multicopy Suppressor of STA genes	chrXIII	-0,2576
YMR176W	<i>ECM5</i>	ExtraCellular Mutant	chrXIII	-0,1063
YMR186W	<i>HSC82</i>	Heat Shock Cognate	chrXIII	-0,1713
YMR215W	<i>GAS3</i>	Glycophospholipid-Anchored Surface protein	chrXIII	-0,2302
YMR284W	<i>YKU70</i>	Yeast KU protein	chrXIII	-0,2633
YNL155W	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrXIV	-0,1153
YNL162W	<i>RPL42A</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	chrXIV	-0,1167
YNL165W	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrXIV	-0,093
YNL171C	<i>ND</i>	ORF incertain	chrXIV	-0,1797
YNL190W	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrXIV	-0,1439
YNL212W	<i>VID27</i>	Vacuolar Import and Degradation	chrXIV	-0,0961
YNL238W	<i>KEX2</i>	Killer EXpression defective	chrXIV	-0,1437
YOL101C	<i>IZH4</i>	Implicated in Zinc Homeostasis	chrXV	-0,1144
YOL103W	<i>ITR2</i>	myo-Inositol TRansporter	chrXV	-0,0946
YOL104C	<i>NDJ1</i>	NonDisJunction	chrXV	-0,1115
YOL105C	<i>WSC3</i>	cell Wall integrity and Stress response Component	chrXV	-0,0952
YOR043W	<i>WHI2</i>	WHIskey	chrXV	-0,1914
YOR096W	<i>RPS7A</i>	Ribosomal Protein of the Small subunit	chrXV	-0,1738
YOR293W	<i>RPS10A</i>	Ribosomal Protein of the Small subunit	chrXV	-0,1287
YOR297C	<i>TIM18</i>	Translocase of the Inner Mitochondrial membrane	chrXV	-0,2633
YOR304W	<i>ISW2</i>	Imitation SWitch subfamily	chrXV	-0,118
YOR323C	<i>PRO2</i>	PROline requiring proton-transporting ATPase activity	chrXV	-0,1206 -0,1182
YOR332W	<i>VMA4</i>	activity	chrXV	
YOR344C	<i>TYE7</i>	Ty-mediated Expression	chrXV	-0,3707
YOR347C	<i>PYK2</i>	PYruvate Kinase	chrXV	-0,1743
YPL026C	<i>SKS1</i>	Suppressor Kinase of SNF3	chrXVI	-0,1463
YPL033C	<i>SRL4</i>	Suppressor of Rad53 null Lethality or Suppressor of Rad53 and Lcd1	chrXVI	-0,1495
YPL054W	<i>LEE1</i>	Zinc-finger protein	chrXVI	-0,1649
YPL080C	<i>ND</i>	ORF incertain	chrXVI	-0,0995
YPL147W	<i>PXA1</i>	PeroXisomal ABC-transporter	chrXVI	-0,1221
YPL152W	<i>RRD2</i>	Resistant to Rapamycin Deletion	chrXVI	-0,1015
YPL205C	<i>ND</i>	ORF incertain	chrXVI	-0,1041
YPL212C	<i>PUS1</i>	PseudoUridine Synthase	chrXVI	-0,0941
YPR114W	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrXVI	-0,099

Suite Annexe 4.

<b>Nom systématique</b>	<b>Nom standard</b>	<b>Nom du gène</b>	<b>Chromosome</b>	<b>Coefficient de sélection</b>
YPR115W	<i>RGC1</i>	Regulator of the Glycerol Channel	chrXVI	-0,0962
YPR128C	<i>ANT1</i>	Adenine Nucleotide Transporter	chrXVI	-0,2793
YPR146C	<i>ND</i>	ORF incertain	chrXVI	-0,1219
YPR155C	<i>NCA2</i>	Nuclear Control of ATPase	chrXVI	-0,1334
YPR158W	<i>CUR1</i>	Curing of [URE3]	chrXVI	-0,1476
YPR179C	<i>HDA3</i>	Histone DeAcetylase	chrXVI	-0,1196
YPR193C	<i>HPA2</i>	Histone and other Protein	chrXVI	-0,1127
YPR195C	<i>ND</i>	Acetyltransferase	chrXVI	-0,1988
YPR201W	<i>ARR3</i>	ORF incertain	chrXVI	-0,1159
		ARsenicals Resistance	chrXVI	

**Annexe 5.** Gènes impliqués dans l'incapacité de *S. paradoxus* de croître à 37 °C en commun avec ceux identifiés par Sinha *et. al.* (2008).

<b>Nom systématique</b>	<b>Nom standard</b>	<b>Nom du gène</b>	<b>Chromosome</b>
YBL058W	<i>SHP1</i>	Suppressor of High-copy PP1	chrII
YDR076W	<i>RAD55</i>	RADiation sensitive	chrIV
YDR192C	<i>NUP42</i>	NUclear Pore	chrIV
YDR226W	<i>ADK1</i>	ADenylate Kinase	chrIV
YFR031C-A	<i>RPL2A</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	chrVI
YGL215W	<i>CLG1</i>	Cyclin-Like Gene	chrVII
YHR066W	<i>SSF1</i>	Suppressor of ste4 (Four)	chrVIII
YHR111W	<i>UBA4</i>	UBiquitin-like protein Activating	chrVIII
YHR203C	<i>RPS4B</i>	Ribosomal Protein of the Small subunit	chrVIII
YIL036W	<i>CST6</i>	Chromosome STability	chrIX
YIL038C	<i>NOT3</i>		chrIX
YIL052C	<i>RPL34B</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	chrIX
YIR024C	<i>ND</i>	ORF non caractérisé	chrIX
YMR077C	<i>VPS20</i>	Vacuolar Protein Sorting	chrXIII
YMR106C	<i>YKU80</i>	Yeast KU protein	chrXIII
YMR284W	<i>YKU70</i>	Yeast KU protein	chrXIII
YOR096W	<i>RPS7A</i>	Ribosomal Protein of the Small subunit	chrXV

Annexe 6. Alignement des gènes YIL007C et YMR077C entre *S. cerevisiae* et *S. paradoxus*

YIL007C

Symbols: \* = identical : = strong similarity . = weak similarity

```

SGD_Scer_NAS2/YI 1 ATGGAGGAA GAAGAATTAAGTAAATTGTTGGCCAATGTTAAGATAGATCC
L007C
MIT_Spar_c27_1123 1 ATGGAGGAAAAGAGGTTAAGCAAATTGTTGGCCAATGTTCAAGATAGACCC
3
Symbols
*****
GAGCCTAACATCAAGAATTAGTCAAATAGACAGCTTCAAACGTTCGGAAT
AAGCCTAACGTCAAGAATTAGTCAAATGGACAGCTTCAAACGTTCGGAAT
*****
TGATGGTTC TAAAGACA GATAT T GAGA CACAAC T A GAGGCGTAT TTCAGT
TGATGGTGT TAAAGACG GATAT C GAGG CACAAC T G GAGGCGTAC TTCAGC
*****
GTGCTTGAGCAGCAAGGCATCGGCATGGACTCTGCGTTGGTGACGCCAGA
GTCCTCGAGGAGCAAGGTATCGGAATGGATTCTGCGTTGGTAACGCCGGA
** * * * * *
CGGGTATCCTCGTTCGGATGTCGATGTATTGCAAGTCACTATGATCAGAA
CGGATATCCTCGTTCGGATGTCGACGTATTGCAAGTCACTATGATCAGGA
*** *****
AGAATGTTAATATGCTGAAGAATGATTTAAATCACCTTTTGCAAAGATCA
AGAATGTTAATATGCTAAAGAATGATTTAAATCACCTTTTGCAAAGATCG
*****
CACGTCCTACTAAAC CAGCACTTTGATAAATATGAA C GTTAA GTCA AAC CA
CATGTCCTGCTAAAT CAGCACTTTGATAAATATGAA T GTTAG GTCGAATCA
* * * * *
AGATGCAAGAAGGAATAACGACGATCAAGCTATTTCAGTATACCATCCCTT
AAACACAACCAGGAATAACGACGATCAAGCTATTTCAGTATACCATCCCAT
* * * * *
TTGCATTTATCAGTGAGGTAGTACC CGGTAGCCCTT CAGATAAAGCAGAC
TTGCATTTAT TAGTGAGGTAGTACC TGGTAGCCCTG CAGATAAAGCAGAT
*****
ATAAAGGTTGATGATAAGCTGATTTCTATTGGTAATGTGCATGCGGCAAAA
ATGAAGGTCGATGATAAACTGATTTCTATTGGTAATGTACATGCTGCAAAA
* * * * *
CCACTCTAAACTTCAAAACATTCAGATGGTTGTAATGAAA AATGAAGACA
CCATCTAAACTTCAAAATATTCAGATGGTTGTCATAAAG AATGAAGACA
*** *****
GGCCACTTCCCGTCCTTCTCTTGAGAGAAGGGCAAATCCTAAAGACATCG
AGCCACTTCCCGTCCTTCTGTTGAGGGAAGGGCAAATCCTAAAAACATCG
*****
CTAACACCTTCGAGAAACTGGAATGGTAGAGGTCTTTTGGGTGTGTAGGAT
CTGACGCTTCGAGAAACTGGGAGGGTAGAGGTCTTCTGGGTGTGTAGGAT
* * * * *
ACAAGAGCTATAA 663
ACAAGAGCTGTAA 663
*****

```

YMR077C

Symbols: \* = identical ; = strong similarity . = weak similarity

[SGD\\_Scer\\_VPS20/YMR077C](#)  
[MIT\\_Spar\\_c172\\_17013](#)

```

1 ATGGGCCA AAAAAGTAGTAAAGTGCATATAACCAAACAGATAGGGCGAT
1 ATGGGCCAGAAAAGTAGTAAAGTGCATATAACCAAGACAGGCAGGGCAAT
*****
CCTAGAAGTAAAACGATCTAAAGATGAAATTCATAAGTTTACGAGGAGGA
CCTAGAAGTAAAACGATCTAAAGATGAAATTCATAAATTTACGAGAAAGGA
*****
CAGATAATTTGATTTTGGTAGAGAAGAGTCAACTAAAAGACC TAATACGA
CAGATAATTTGATTTCA GTAGAAAAGG TCAACTGAAAAGATT TAATACGA
*****
AAAAATCCTGAAAATTTAT AAATCTAACATGAAGGTACGATTTCTACTAAA
AAAAATCCTGGAAACCTAC AAATCTAACATGAAGGTACGATTTCTACTGAA
*****
AAGAATT CATTATCAGGAGCATTTGTTGCAGCAGGCTTCG GATCAGCTTA
AAGAATA CATTATCAGGAACATTTGTTGCAGCAGGCTTCAGATCAGCTTG
*****
TTAATTTGGAAAA TATGGTGTCAACACTTGAGTTC AAAATGGTGA AAAAG
TA AATTTGGAAAA CATGGTATCAACACTTGAGTTT AAAATGGTTG AAAAG
*****
CAATTTATT AATGGACTGAAAAATGGAAATGAAATCTTGAAAAAACTAAA
CAATTTGTGAATGGATTGAAAAACGGGAATGAAATCTTGAAAAAACTGAA
*****
CAAGGAATTTAGCAATGTTGATGAAC T GATGGACGATGTACAA GATCAAA
CAAAGAATTTAGGAACTGTTGATGAGTTAATGGACGATGTACAGGATCAAA
*****
TTGCGTATCAAAAATGAAATTAACGAGACATTATCTAGAAGCTTAGTTCGGA
TTGCTTATCAAAAATGAAATCAACGAGATATTATCTAGAAGTGTGTCGGA
*****
ACAAGCAAT TATGAAGACGATCTAGATAAGGAATTGGATGCTCTAGAAAG
ACAAGCAAC TATGAAGATGATCTAGATAAGGAATTGGATGCTCTAGAAAG
*****
TGAAGCTCAATCCA GAGAAGATGAATAACGCAAAAGTAGCTAACATGCCAT
CGAAGCTCGATCCGAA AAGAAGAATAACGCAAGGAGTAGTTAACATGCCGT
*****
CAACA GAA GGGTTT GCCATCATTGCTCTCAAGGAGAACAAACCGAGCAAAAA
CAACGGAGGGTTT ACCATCATTGCTCTCAACGAGAACAAAGCCGAGCAAAAA
*****
GAAAGAGAGGAATTCGCGACG GAGGAGA GATCAGACACTAAGGAACCTTT
GAGAGGAGGAATTCGCGACAGAGGAGAAGT CAGACACTAAGGAACCTTT
*****
651 AGCATTACTATCCTGA 666
651 AGCATTACTGTCCTGA 666

```