

Indices d'un fonctionnement compensatoire du cycle glyoxylique lors de la différenciation mâle chez *Allomyces* et *Neurospora*

Autor(en): **Turian, G.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **70 (1960)**

PDF erstellt am: **26.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-49495>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Indices d'un fonctionnement compensatoire du cycle glyoxylique lors de la différenciation mâle chez *Allomyces* et *Neurospora*

Par G. Turian

Institut de Botanique générale, Université de Genève

Manuscrit reçu le 19 novembre 1960

Nous avons récemment démontré que la souche hybride mâle d'*Allomyces* présente une déficience de fonctionnement de son cycle de Krebs au niveau de l' α -cétoglutarate oxydase (Turian, 1960_a). De même, chez *Neurospora* masculinisé (cultures conidiogènes à 37° C), le cycle de Krebs est bloqué au niveau de la succino-deshydrogénase (Turian, 1960_b). Mais l'existence même de telles déficiences métaboliques oblige à admettre que, tant dans le cytoplasme à orientation mâle d'*Allomyces* que dans celui de *Neurospora*, une voie oxydative de compensation doit nécessairement fonctionner afin de pourvoir aux besoins accrus d'énergie requis par les biosynthèses associées à la morphogenèse des organes mâles dont la caractéristique biologique essentielle est d'être le siège d'une multiplication nucléaire accélérée.

Notre observation antérieure selon laquelle l'acétate fourni comme seule source de carbone à des cultures bisexuées d'*Allomyces macrogynus* tendait à les masculiniser (ad 70 % mâles; Turian, 1958) nous a livré le premier indice en faveur de l'existence d'une telle voie compensatoire. On sait, en effet, que le métabolisme de l'acétate peut emprunter des voies évitant le cycle de Krebs, en particulier par l'intermédiaire de l'acide glyoxylique (cycle glyoxylique de Kornberg-Krebs, 1957).

Nous avons pu confirmer l'effet masculinisant de l'acétate chez *Allomyces* en observant une faible réversion de la souche hybride femelle (*A. macrogynus* \times *A. arbuscula* du Prof. R. Emerson, 1955) cultivée 12 j. sur milieu synthétique agarisé de Machlis (1953) additionné d'acétate à 0,5 % comme source de C. Nous avons noté une accentuation de l'effet à la suite de subcultures successives d'*Allomyces* en présence d'acétate. De plus et fait significatif, l'action androgène de l'acétate est considérablement renforcée en présence de traces de coenzyme A (CoA) ajouté après

filtration stérile. Aucun effet notoire n'a été relevé avec le même milieu synthétique glucosé 0,5 % additionné de CoA. Seule l'introduction du couple glycine - acide folique a provoqué une réversion masculine de la souche femelle d'*Allomyces* cultivée sur milieu glucosé. Cette dernière observation revêt toutefois une importance particulière pour l'interprétation des voies du métabolisme morphogène initié par l'acétate et aboutissant aux acides nucléiques en passant par le glyoxylate et la glycine (voir fig. 1). Nous avons en effet observé une incorporation de la glycine-2-C¹⁴ dans l'acide désoxyribonucléique (ADN) d'*Allomyces* (Cantino et Turian, 1960) et l'effet androgène de l'acide folique peut s'expliquer par son rôle connu de cofacteur dans cette biosynthèse.

Voici un résumé de l'ensemble de ces résultats, obtenus par dénombrement microscopique de plusieurs séries de cultures (moyenne de 4 tubes par série):

Souche <i>Allomyces</i> femelle (98 %) sur milieu synthétique de Machlis agarisé (2 %, lavé)	Proportion gamétanges mâles
+ glucose 0,5 %	2 %
+ glucose 0,5 % + CoA 5.10 ⁻⁵ M	2-5 %
+ acétate Na 0,5 %	25 %
+ acétate Na 0,5 % + CoA 5.10 ⁻⁵ M	40 %
+ glucose 0,5 % + glycine 10 ⁻² M	20-25 %
+ glucose 0,5 % + glycine 10 ⁻² M + acide folique ¹ 10 ⁻⁵ M ..	40 %

¹ Stérilisé par filtration sur Berkefeld, à l'abri de la lumière.

En présence d'acétate - CoA ou de glycine - acide folique, nous avons fréquemment observé des chaînettes de gamétanges mâles (2-6 mâles successifs).

Les mêmes effets masculinisants ont été vérifiés avec la souche normale, bisexuée d'*Allomyces arbuscula* où le sex-ratio moyen de 1 : 1 (50 % mâles) sur milieu glucosé est passé à plus de 4 : 1 (80 % mâles) en présence de glycine et acide folique ou sur milieu acétate - CoA. Rappelons que nous avons signalé des rapports de cet ordre (plus de 80 % mâles) avec *Allomyces macrogynus* ou *A. arbuscula* cultivés sur milieu glucosé enrichi de thymine (Turian, 1958). Là aussi la relation de ces métabolites morphogènes avec le métabolisme des acides nucléiques dans ses rapports avec la différenciation sexuelle transparait à nouveau (voir discussion dans Cantino et Turian, 1959).

Ajoutons encore, pour compléter les données expérimentales qui précèdent, qu'un agent antifolique, la sulfanilamide, ajoutée à 1 : 10 000 au milieu glucosé, tend à féminiser les souches bisexuées d'*Allomyces*. Par contre, en accord avec nos résultats sur les blocages enzymatiques (Turian, 1960_{a et b}), les inhibiteurs classiques du cycle de Krebs, malonate 0,05 M et arsénite 10^{-4} M masculinisent nettement ces souches tout en réduisant leur fertilité.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus, concernant l'imposition biochimique de l'orientation de la différenciation sexuelle chez *Allomyces*, suscite la question suivante: quelle est, dans les cultures à masculinisation provoquée, la nature de la voie métabolique, favorisée voire induite par l'acétate (acétyl-CoA) et génératrice de la glycine garante de la synthèse accrue d'acide désoxyribonucléique exigée par la différenciation mâle? Dans les cultures à sex-ratio normal (sur glucose), cette voie doit d'ailleurs être aussi l'alternative métabolique fonctionnelle dans les zones cytoplasmiques hyphales à lésion du cycle de Krebs génétiquement localisée (apicale chez *A. macrogynus*, subapicale chez *A. arbuscula*, généralisée à l'ensemble de l'apex chez les «mutants» mâles hybrides ou polyploïdes) et vraisemblablement déterminante pour leur différenciation dans le sens mâle.

La Biochimie comparée nous a suggéré la voie de l'acide glyoxylique dont la formation de l'enzyme-clef, l'isocitratase, est une réponse adaptative à l'offre d'acétate chez les *Pseudomonas* (Smith et Gunsalus, 1955; Kornberg et coll., 1958). L'isocitratase a été étudiée chez la levure (Wong et Ajl, 1956; Barnett et Kornberg, 1960) et chez quelques Moisissures dont *Penicillium chrysogenum* (Olson, 1954) et un Phycomycète aquatique, proche parent d'*Allomyces*, *Blastocladiella emersonii* (McCurdy et Cantino, 1960).

Dans la première phase de nos recherches, nous avons procédé à un examen comparatif de l'activité isocitratasique d'homogénats d'*Allomyces*, mâles et femelles, préparés à partir de cultures sur milieu synthétique liquide de Machlis soit glucosé, soit à l'acétate. Avec ces cultures, choisies à l'âge optimal (7-9 j. à 25° C), les homogénats ont été préparés selon notre technique habituelle de broyage en tampon phosphates suivi de centrifugation (Turian, 1960_{a et b}). L'activité isocitratasique a été estimée, d'après la technique de Kornberg et Madsen (1957), basée sur la scission enzymatique de l'isocitrate (40 μ M dans 3,1 ml mélange homogénat-cystéine-MgCl₂-tampon phosphates pH 7,4 selon McCurdy et Cantino, 1960; incubé 1 h. à 30° C). L'identification des produits cétoniques formés, en particulier du glyoxylate, a été réalisée par chromatographie sur papier (solvant: butanol-éthanol-NH₃ selon El Hawary et Thompson, 1953) de leurs 2,4-dinitrophénylhydrazones préparées selon

Cavallini et Frontali (1954). Des témoins endogènes (stoppés au temps 0 par addition d'HCl 2 N) ont toujours été analysés simultanément. Pour l'estimation quantitative des dinitrophénylhydrazones, les taches jaunes (2 isomères pour glyoxylate et pyruvate) ont été éluées au bicarbonate 10% et l'extinction des solutions mesurée à 365 et 380 m μ par comparaison avec celle de concentrations connues de standards glyoxyliques ou pyruviques. Pour nos buts comparatifs, les homogénats ont été uniformisés sur la base d'une égalité de teneur en protéines, préalablement mesurée avec le Biuret (Turian, 1960_b). Nous avons généralement introduit 2 mg de protéines mâles ou femelles dans le mélange d'incubation enzymatique.

Une nette activité isocitratasique a pu être mise en évidence dans tous nos homogénats d'*Allomyces*. Nous ne sommes pas encore en mesure de l'exprimer en unités précises d'activité enzymatique mais, sur la base de nos premières estimations spectrophotométriques du glyoxylate formé, nous pouvons déjà dégager des résultats les faits essentiels, d'ordre comparatif: l'activité isocitratasique des homogénats de cultures sur acétate est nettement plus forte (près de 2 \times plus de glyoxylate formé) que celle des homogénats des cultures sur glucose. D'une manière générale, les homogénats mâles sont plus actifs que leurs correspondants femelles, spécialement avec les cultures sur glucose (mesure des acides cétoniques totaux pour tenir compte de l'activité transaminasique particulièrement forte chez les mâles, voir plus bas). En présence d'acétate, la réversion partielle des femelles, déjà signalée, doit tendre à égaliser (dans le sens mâle) l'activité isocitratasique, par ailleurs élevée, de ces cultures. Il est vrai que la faible activité de l'isocitrate deshydrogénase (mesures inédites) dans les homogénats de cultures mâles sur acétate doit certainement favoriser, dans la cellule intacte tout au moins, la voie isocitratasique (voir fig. 1). Il est important de signaler aussi que la différence sexuelle d'activité enzymatique est certainement plus marquée dans les cytoplasmes intacts en voie de différenciation où le jeu des alternatives métaboliques, au niveau de l'isocitrate en particulier (voir fig. 1), peut se donner libre cours. Dans les systèmes d'homogénats «in vivo», une part de l'activité isocitratasique mesurée est certainement extra-physiologique, spécialement dans les homogénats femelles à cycle de Krebs intact, imposée qu'elle est par l'offre artificiellement accrue de substrat isocitrate.

L'analyse chromatographique des milieux d'incubation isocitratasique n'a pas seulement révélé la présence de quantités dosables d'acide glyoxylique mais aussi d'acide α -cétoglutarique et surtout d'acide pyruvique. Cette production diversifiée d'acides cétoniques trahit, par analogie avec la même situation récemment décrite chez *Blastocladiella* (McCurdy et Cantino, 1960), la présence et l'activité simultanée de transaminases dans nos homogénats d'*Allomyces*, en particulier d'une alanine-glycine

transaminase. Cette dernière apparaît comme particulièrement active dans les extraits mâles (d'après le rapport plus élevé pyruvate/glyoxylate); elle peut y fonctionner aux dépens du pool d'alanine, plus important que dans les extraits femelles (Turian, 1960_a et dosages inédits). Cette activité transaminasique est, en outre, renforcée dans les cultures sur acétate, à forte activité isocitratasique génératrice de glyoxylate, où elle se traduit finalement par la libération d'excédents de glycine dans les filtrats (détection chromatographique). Ces mêmes filtrats contiennent, également, de l'acide succinique (détection chromatographique), second produit de scission de l'isocitrate (fig. 1) et bonne confirmation de la forte activité isocitratasique des cultures sur acétate. En revanche, dans les cultures sur glucose, on peut admettre que l'acide succinique, produit en plus faible quantité par l'activité isocitratasique, est rapidement métabolisé (active deshydrogénase succinique, surtout chez femelle) et qu'en conséquence seuls les acides pyruvique et surtout lactique (fermentation pratiquement homolactique d'Ingraham et Emerson, 1954) ne sont décelables dans leurs filtrats (Turian, 1960_b).

Les homogénats de *Neurospora crassa* (souche + de Baarn) présentent aussi une nette activité isocitratasique, du même ordre d'intensité que celles mesurées en moyenne avec *Allomyces*. Cet Ascomycète a été cultivé 8 j. sur milieu nitrate-sucrose de Westergaard et Mitchell (1947), à 25° C pour obtenir des cultures porteuses de protopérithèces femelles, à 37° C pour produire des hyphes conidiogènes, fonctionnellement mâles (pour détails et fig. ainsi que récolte et homogénéisation, voir Turian, 1960_b).

Chez *Neurospora*, les extraits mâles ont montré une activité isocitratasique 2-3 × plus élevée que les femelles. Cette activité s'est traduite par une forte libération de glyoxylate, substance par ailleurs déjà présente en traces dans les conidies (6 µg/g spores selon Owens et coll., 1958).

La mise en évidence de cette vigoureuse activité isocitratasique chez *Neurospora crassa* mâle autorise à penser que, in vivo, la voie glyoxylique offre la nécessaire alternative au cycle de Krebs, bloqué au niveau de la deshydrogénase succinique dans les extraits mâles. Elle nous permet, en outre, de comprendre enfin la paradoxale libération simultanée, dans les filtrats de cultures mâles à succino-deshydrogénase bloquée, d'acide succinique et d'acide malique (Turian, 1960_b): l'accumulation de l'acide succinique est la double conséquence du blocage sus-mentionné et de l'activité isocitratasique, celle de l'acide malique est l'indice très probable de l'activité d'une malate synthétase devant utiliser, concurremment avec les transaminases déjà suspectées chez *Neurospora* (Wright, 1951), l'acide glyoxylique d'origine isocitratasique (fig. 1).

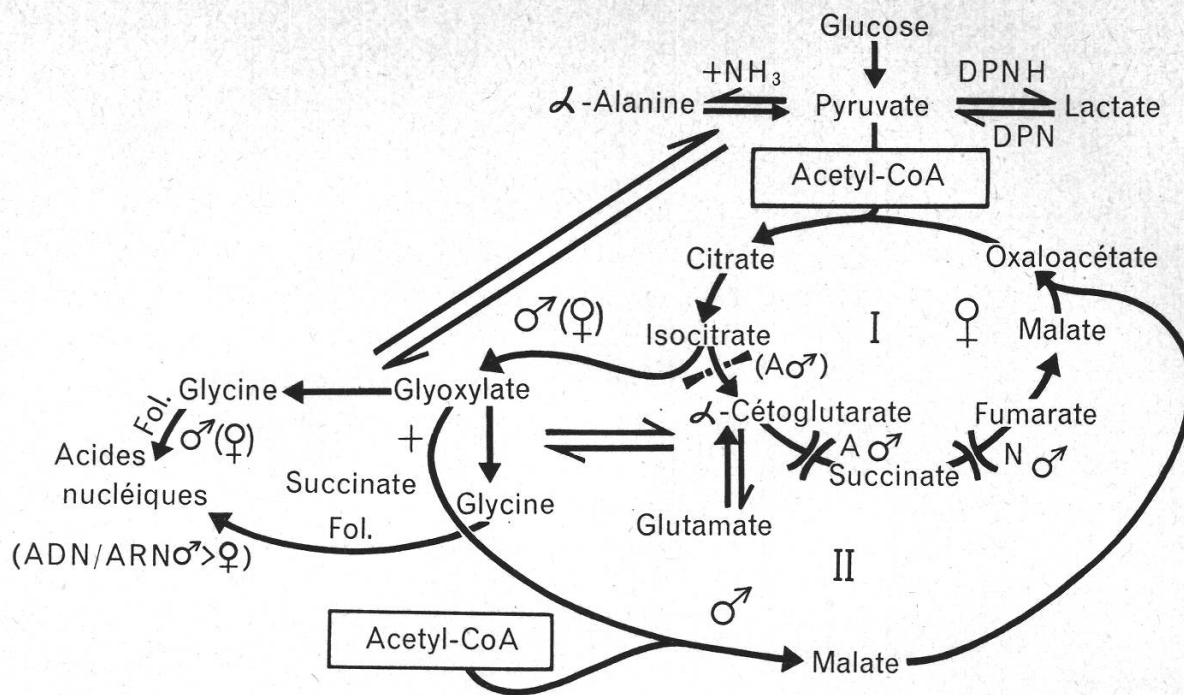


Figure 1

Schéma hypothétique illustrant, en conformité avec nos résultats expérimentaux, les cycles métaboliques et les voies biosynthétiques associées à la différenciation sexuelle chez *Allomyces* et *Neurospora*.

I = cycle de Krebs. II = cycle glyoxylique.)(= déficiences enzymatiques chez *Allomyces* (A) ou *Neurospora* (N). Fol. = acide folique.

Il ressort de nos dernières remarques que l'acide glyoxylique peut être considéré comme l'une des plaques tournantes du métabolisme fongique, point de départ commun à la synthèse transaminative d'un important précurseur nucléique, la glycine, et de la synthèse de l'acide malique, cette dernière complétant le cycle dit glyoxylique et permettant de rejoindre les dernières étapes oxydatives du cycle de Krebs. Il est vraisemblable que le cycle glyoxylique dont nous venons d'obtenir les premiers indices de fonctionnement tant chez *Allomyces* que *Neurospora*, représente donc l'indispensable source alternative d'énergie et de précurseurs biosynthétiques pour les territoires cytoplasmiques mâles, à cycle de Krebs fonctionnellement déficient.

Nous tenons à remercier M^{lle} H. Weiffenbach de son excellente aide technique et le Fonds national suisse de la recherche scientifique de son appui financier. Notre reconnaissance va aussi à M. le Prof. R. Emerson pour son envoi de souches hybrides d'*Allomyces*.

Summary

The hybrid, female strain of *Allomyces*, grown on synthetic medium with acetate as single source of C + traces of coenzyme A, partially reverts to maleness (40%). A similar shift with same degree of male diffe-

rentiation is obtained in growing the female strain on the synthetic medium with glucose as the source of C but enriched in glycine + folic acid. A high degree of maleness (80–90%) is also observed in the normal, bisexual (50% male) strains of *Allomyces macrogynus* or *A. arbuscula* grown on the same, acetate + CoA or glucose + glycine + folic acid, combinations. Acetate or glycine alone are much less efficient in directing sex differentiation towards maleness. Krebs cycle inhibitors, malonate and arsenite favor male against female differentiation and an antifolic agent, sulfanilamide acts rather the reverse way.

Looking for the metabolic pathways favored or induced by the sex exogenous modifiers, we found acetate-stimulated isocitratase activity in *Allomyces*. This activity, evaluated from the glyoxylate split from isocitrate, is higher in homogenates from acetate than from glucose-grown molds and higher in the male – Krebs cycle deficient – than the female extracts. The second product from isocitrate cleavage, succinic acid, accumulates (with some lactic acid) in the filtrates from acetate-grown cultures. The liberation of glycine in the same filtrates, combined with observation of pyruvic acid formation in the isocitrate tests, is suggestive of transaminase activities (alanine-glycine, etc.) in our alanine rich extracts of *Allomyces*.

Isocitratase activity has also been observed in *Neurospora crassa* homogenates. It is much more vigorous in the male extracts (37° C grown, conidia-forming mycelia) than in the female ones (25° C grown, protoperithecia-forming mycelia). Succinic acid accumulation in the male filtrates is not only the consequence of the previously found succinic dehydrogenase deficiency in the male organs but also of their high isocitratase activity which, with its second cleavage product, glyoxylic acid, provides the necessary building block for the paradoxical, simultaneous formation and accumulation of malic acid in these Krebs cycle deficient organs and their filtrates.

Our new data suggest that the glyoxylic acid cycle, managed by isocitratase and predictable malate synthetase activities, may well constitute the necessary, alternative metabolic pathway for the Krebs cycle deficient, male differentiation in *Neurospora* as well as *Allomyces*.

Bibliographie

- Barnett J. A., Kornberg H. L.: The utilization by yeasts of acids of the tricarboxylic acid cycle. *J. Gen. Microbiol.*, **23**, 65 (1960).
- Cantino E. C., Turian G.: Physiology and development of lower fungi (Phycomycetes). *Ann. Rev. Microbiol.*, **13**, 97 (1959).
- — A role for glycine in light stimulated nucleic acid synthesis by *Blastocladiella emersonii*. *Arch. Mikrobiol.* (sous presse, 1960).
- Cavallini D., Frontali N.: Quantitative determination of keto-acids by paper partition chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 439 (1954).
- El Hawary M. F. S., Thompson R. H. S.: Separation and estimation of blood keto acids by paper chromatography. *Biochem. J.*, **53**, 340 (1953).
- Emerson R.: Aspects of synthesis and order in growth. (Dorothea Rudnick édit.), Princeton University Press, 171 (1955).
- Ingraham J. L., Emerson R.: Studies on the nutrition and metabolism of the aquatic Phycomycete, *Allomyces*. *Amer. J. Bot.*, **41**, 146 (1954).
- Kornberg H. L., Krebs H. A.: Synthesis of cell constituents from C₂-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature*, **179**, 988 (1957).
- Gotto A. M., Lund P.: *Nature*, **182**, 1430 (1958), cité dans Kornberg H. L.: Aspects of terminal respiration in Microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, **13**, 49 (1959).
- Madsen N. B.: Synthesis of C₄-dicarboxylic acids from acetate by a «glyoxylate bypass» of the tricarboxylic acid cycle. *Biochim. biophys. Acta*, **24**, 651 (1957).
- Machlis L.: Growth and nutrition of water molds in the subgenus *Euallomyces*. II. Optimal composition of the minimal medium. *Amer. J. Bot.*, **40**, 450 (1953).
- McCurdy H. D., Cantino E. C.: Isocitritase, glycine-alanine transaminase, and development in *Blastocladiella emersonii*. *Plant Physiol.*, **35**, 463 (1960).
- Olson J. A.: The d-isocitric lyase system: the formation of glyoxylic and succinic acids from d-isocitric acid. *Nature*, **174**, 695 (1954).
- Owens R. G., Novotny H. M., Michels M.: Composition of conidia of *Neurospora sitophila*. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **19**, 355 (1958).
- Smith R. A., Gunsalus I. C.: Distribution and formation of isocitratase. *Nature*, **175**, 774 (1955).
- Turian G.: Recherches sur les bases cytochimiques et cytophysiologiques de la morphogénèse chez le champignon aquatique *Allomyces*. *Rev. Cytol. Biol. vég.*, **19**, 241 (1958).
- Prédominance de la glycolyse aérobie et déficience oxydative lors de la différenciation gamétangiale mâle chez *Allomyces*. *Compt. Rend. Acad. Sci., Paris*, **250**, 2412 (1960_a).
- Déficiences du métabolisme oxydatif et différenciation sexuelle chez *Allomyces* et *Neurospora*. Activité d'une DPN-deshydrogénase lactique chez *Allomyces*. *Pathol. et Microbiol.*, **23**, 687 (1960_b).
- Westergaard M., Mitchell H. K.: *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Amer. J. Bot.*, **34**, 573 (1947).
- Wong D. T. O., Ajl S. J.: Conversion of acetate and glyoxylate to malate. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 3230 (1956).
- Wright B. E.: Utilization of glyoxylic and glycolic acids by a *Neurospora* mutant requiring glycine or serine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **31**, 332 (1951).