

LES CAROTÉNOÏDES DE *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* ÉTUDE DE LEUR BIOSYNTHÈSE A L'AIDE DE L'ANALYSE DE MUTANTS ET DE L'EMPLOI D'UN INHIBITEUR DE LA CAROTÉNOGÈNÈSE

J. VILLOUTREIX

Laboratoire de Chimie, Faculté de Pharmacie de Nancy (France)*

(Reçu le 2 Septembre, 1959)

SUMMARY

The carotenoids of Rhodotorula mucilaginosa. A study of their biosynthesis by means of mutant analysis and by use of an inhibitor of carotenogenesis

1. The strain of *Rhodotorula mucilaginosa* studied contains the following carotenoids, in $\mu\text{g/g}$ of dry substance: torularhodine 98, torulene 16, γ -carotene 1.5, β -carotene 5.5. It contains neither phytoene nor phytofluene.

2. By repeated u.v. irradiations stable strains were isolated, the composition of which differs greatly both in quality and quantity from that of the mother strain: the proportion of some carotenoids is lower or even zero, but it can also be higher, and sometimes carotenoids that have not been found in the mother strain appear.

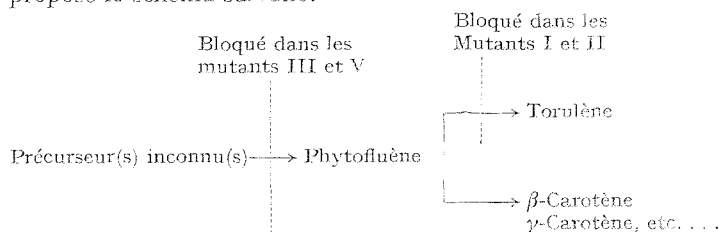
3. Grown in the presence of 2-hydroxybiphenyl, *Rh. mucilaginosa* becomes white, but it still contains small quantities of polyenes. The inhibitor can be removed by washing and an endogenous synthesis of pigments can be revealed.

4. The results obtained do not seem consistent with the idea that the different polyenes are mutually related.

INTRODUCTION

Si de nombreux auteurs ont étudié la nature des caroténoïdes des levures du genre *Rhodotorula*, peu d'entre eux ont tenté d'utiliser ces microorganismes pour aborder le mécanisme de la biosynthèse de ces pigments.

BONNER *et al.*¹ après avoir obtenu des mutants de *Rh. rubra* par irradiation ultraviolette ont proposé le schéma suivant:



* Directeur Professeur R. KAYSER.

NAKAYAMA *et al.*² ont montré que le torulène et la torularhodine se synthétisent probablement aux dépens du β -carotène chez *Rh. glutinis*.

Dans le présent travail qui porte sur *Rh. mucilaginosa* nous étudions d'une part les modifications de la caroténogénèse provoquées par des mutations dues à des irradiations u.v. et d'autre part celles apportées par l'emploi d'un inhibiteur. L'analyse des résultats obtenus nous permet de proposer un schéma de la biosynthèse des caroténoïdes chez *Rh. mucilaginosa*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Microorganisme

Levure appartenant à l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* (Jørgensen) Harrison et identifiée par Delft.

Milieu de culture: Il s'agit d'un milieu semi-synthétique où l'apport de facteurs de croissance se fait sous forme d'un "jus de levure" obtenu selon CONWAY ET BREEN³: 25 g de levure de boulangerie sont dispersés dans 250 ml d'eau distillée, le tout est porté à ébullition que l'on maintient pendant 1 h, puis centrifugé; le surnageant constitue le "jus de levure".

La formule du milieu est la suivante: sulfate d'ammonium 3 g, phosphate monopotassique 2 g, sulfate de magnésium 7 H₂O 0.25 g, chlorure de calcium 6 H₂O 0.25 g, chlorure de manganèse 4 H₂O 0.001 g, sulfate de zinc 7 H₂O 0.001 g, acide borique 0.001 g, chlorure ferrique 0.0005 g, sulfate de cuivre 5 H₂O 0.001 g, iodure de potassium 0.001 g, saccharose 20 g, jus de levure 250 ml, eau distillée Q.S.p 1,000 ml. Stérilisation 20 min à l'autoclave à 120°. Le pH est alors 5.2-5.4.

Mode de culture

Pratiquement toutes nos cultures ont été réalisées en boîte de Roux sur milieu semi-synthétique additionné de 20 g de gélose/l. Après ensemencement, les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 4 jours sans prendre de précautions spéciales contre la lumière.

Irradiation ultraviolette

A l'irradiation des cellules en suspension dans un liquide agité, nous avons préféré la méthode suivante plus facile à mettre en oeuvre:

La levure est mise en suspension dans un peu d'eau distillée stérile puis diluée de façon à obtenir environ 1,000 cellules par ml. Un volume connu de cette dilution est étalé à la surface d'un milieu nutritif coulé en boîte de Pétri.

Le générateur d'ultraviolet que nous utilisons est du type Germicide, il se présente sous la forme d'un tube de 110 mm de longueur et de 5 mm de diamètre extérieur (tube 123-100, Anciens Etablissements Gallois et Cie, Paris), fonctionnant sous haute tension et basse pression. Le spectre d'émission de ce tube est surtout représenté par la raie 2537 Å. Le générateur est mis en fonctionnement 1 h avant le début de chaque irradiation de façon à obtenir une émission stable et d'autre part à assurer une stérilisation suffisante de l'espace où se feront les manipulations.

Nous portons la boîte de Pétri à environ 10 cm de la lampe et enlevons le couvercle qui est laissé dans le champ de la lampe pendant la durée de l'irradiation.

Nous remplaçons ensuite le couvercle sur la boîte qui est portée à l'étuve à 30°

pendant 48 h. Une boîte de Pétri préparée dans les mêmes conditions, mais non irradiée, sert de témoin. Sauf indication contraire, le temps d'irradiation, déterminé par des essais préliminaires, a été de 4 min.

Extraction des caroténoïdes

Après lavage à l'eau distillée et centrifugation, la levure est traitée par de l'acétone à froid qui extrait, dans le plupart des cas, la presque totalité des caroténoïdes. Lorsque l'action de ce solvant est épuisée, nous achevons l'extraction par le mélange acétone-méthanol (3 : 1) qui laisse une levure blanche.

Cependant certaines cultures fournissent des levures dont les caroténoïdes ne peuvent pratiquement pas être extraits par le procédé ci-dessus. Une observation fortuite nous a montré que si la masse humide est agitée avec du benzène pur (qui dans ces conditions n'extrait pas de pigment), le traitement ultérieur par le mélange acétone-méthanol, après élimination du benzène, permet l'extraction totale des caroténoïdes. Ce dernier procédé a cependant l'inconvénient de donner des émulsions au moment des lavages.

Quel que soit le procédé d'extraction utilisé, les solvants sont réunis, additionnés d'éther de pétrole dans lequel on fait passer le pigment à l'aide d'une solution aqueuse à 20 % de chlorure de sodium. L'éther de pétrole, éventuellement le mélange éther de pétrole-benzène, est lavé à l'eau puis séché sur sulfate de sodium anhydre. On distille ensuite à sec en atmosphère d'azote à l'aide d'une pompe à vide à injection d'air.

Le résidu est repris par de l'éther de pétrole et la solution est placée au frigidaire pendant une nuit ce qui précipite la majeure partie des stérols qui sont éliminés par centrifugation à 0° (la filtration a dû être proscrite car une partie du pigment reste fixée sur le filtre, même si celui-ci est en verre fritté).

Chromatographie et dosage des caroténoïdes

Après élimination des stérols, la solution éthéropétrolique du pigment brut est versée avec précaution sur une colonne d'alumine Merck désactivée selon GOODWIN⁴. Pour certaines fractions, une deuxième chromatographie sur magnésie a été nécessaire. Tous les solvants ont été soigneusement redistillés et l'absence de fluorescence contrôlée dans l'u.v.

TABLEAU I
DONNÉES SPECTROGRAPHIQUES POUR LE DOSAGE DES CAROTÉNOÏDES DE *Rh. mucilaginosa*

Caroténoïde	Position des maxima d'absorption dans l'éther de pétrole en mμ			E 1% 1 cm pour le maximum principal	Référence
Phytoène	275	285	296	850	5
Phytofluène	332	348	367	1,540	6
β-Carotène	424	450	477	2,590	4
ξ-Carotène	378	399	424	2,500	7
γ-Carotène	435	460	491	2,760	8
Neurosporène	415	439	469	2,990	9
Lycopène	446	474	506	3,460	12
Torulène	458	484	518	2,680	10
Spirilloxanthine	466	494	528	2,360	13
Torularhodine	474	500	533	2,580	11

Pour le dosage des caroténoïdes, nous avons utilisé les coefficients d'extinction suivants: (voir Tableau I) définis par la relation

$$E_{1\text{ cm}}^{\%} = \frac{D \times 10}{C}$$

où D = densité optique

C = concentration en $\mu\text{g/ml}$.

Toutes les mesures ont été faites dans l'éther de pétrole à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman modèle D.U.

RÉSULTATS

Obtention de mutants sous l'action de l'irradiation u.v.

A partir d'une de nos cultures conservée sur milieu semi-synthétique, nous avons constitué une souche pure de *Rh. mucilaginosa* par isolement d'une seule cellule au micro-manipulateur. Cette souche mère sera désignée dans la suite du travail par RMP.

En soumettant cette dernière à l'action de l'u.v. dans les conditions exposées ci-dessus, nous avons obtenu, avec un taux de mortalité de 98 %, des colonies rose pâle ne présentant entre elles aucune différence macroscopique. Une de ces colonies est prélevée, une fraction en est repiquée sur milieu solide et constitue la souche RIN, l'autre fraction sert à préparer les dilutions qui subiront une nouvelle irradiation.

Celle-ci permet d'obtenir au bout de 48 h une colonie jaune (RJ1), une colonie orange (RO1) et une dizaine de colonies blanches dont une seule est conservée. A partir de ces différentes colonies, des souches pures sont obtenues en isolant une cellule au micromanipulateur. Il faut noter que, dans cette expérience, le taux de mortalité n'a été que de 80 % au lieu de 98 % dans l'irradiation précédente.

A ce stade de nos recherches, nous avons pensé que l'atténuation de la pigmentation des levures sous l'influence de l'irradiation était en quelque sorte un phénomène progressif, des cellules étaient devenues blanches parce que le mécanisme de leur caroténogénèse avait subi une atteinte plus profonde que les cellules jaunes, celles-ci ayant été plus sérieusement atteintes que les cellules orange.

Pour tenter de le démontrer, nous avons réirradié la souche RJ1 dans les mêmes conditions, avec la pensée que nous obtiendrions des colonies blanches; cependant sur 3,000 cellulesensemencées, nous n'avons décelé, après une nouvelle exposition aux u.v. identique aux précédentes, aucune colonie blanche. Nous avons prélevé une colonie au hasard qui, après culture, nous a donné la souche RJ2. Cette dernière a été, à son tour, soumise aux u.v. sans modification notable de la pigmentation et une colonie a été cultivée, elle a donné la souche RJ3.

L'irradiation de cette nouvelle souche RJ3 aboutit à l'obtention d'une seule colonie jaune pâle (RJP) au milieu de colonies apparemment inchangées. Ce résultat nous confirmait dans la pensée que l'irradiation aboutit à une décoloration progressive mais si une nouvelle exposition à l'u.v. de RJP nous a permis d'observer une colonie jaune très pâle (RJPX) et une cinquantaine de colonies blanches, dont l'une constituera la souche M1, la présence d'une colonie orange (OR1) venait infirmer notre hypothèse: l'irradiation pouvait aussi parfois augmenter la pigmentation aussi bien que la diminuer.

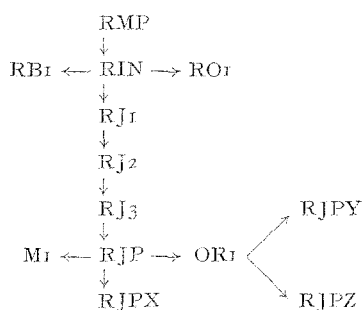
Ce résultat nous a incité à poursuivre les irradiations afin d'essayer d'obtenir

une souche dont la pigmentation serait aussi voisine que possible de celle de la souche mère.

OR₁ a donc été soumis à l'irradiation dans les mêmes conditions que les souches précédentes et, après deux tentatives infructueuses, nous avons obtenu: deux colonies dont l'une, rose orangé, constituera la souche RJPY et l'autre, orangé foncé, la souche RJPZ.

Toutes ces souches, dont nous donnons ci-dessous le schéma de filiation sont stables depuis leur isolement qui date, en moyenne, de quatre ans.

Schéma résumant la filiation des différentes souches venant d'être décrites.



Malgré les précautions prises au cours des différentes manipulations, il nous a paru utile de vérifier que nos nouvelles souches appartenaient bien toujours à l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa**. Toutes les souches colorées ont bien conservé les caractères essentiels qui permettent de les ranger dans l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa*. Il n'en va pas de même pour les mutants blancs puisqu'une des caractéristiques essentielles du genre *Rhodotorula* est une coloration allant du jaune au rouge.

NAKAYAMA *et al.*² considèrent que la différenciation des genres *Cryptococcus* et *Rhodotorula* basée respectivement sur l'absence ou la présence de caroténoïdes est arbitraire et suggèrent que la distinction soit faite d'après la production ou non "d'amidon".

Cette manière de procéder ne lève cependant pas toute indétermination, des levures comme *Rhodotorula glutinis* variété *infirmo-miniata* produisant de "l'amidon".

Connaissant l'origine de nos souches blanches, il était difficile d'admettre que ces levures appartenaient à une autre espèce que *Rhodotorula mucilaginosa* bien que certains auteurs n'hésitent à annoncer la création de nouvelles espèces par simple irradiation ultraviolette¹⁴.

Nous préférons cependant, dans notre cas, nous ranger à l'avis de B. EPHRUSSI et Ö. WINGE et considérer qu'il s'agit bien de "mutants blancs" de *Rh. mucilaginosa*.

Modifications apportées par les mutations dans la teneur en caroténoïdes de Rh. mucilaginosa

Etude qualitative: Nous avons déterminé la nature des caroténoïdes de chaque souche à partir de plusieurs centaines de grammes de levure sèche obtenue par culture en boîtes de Roux. Chaque boîte fournit en moyenne 1 g de matière sèche.

Souche mère RMP: La solution éthéro pétrolique de pigment est passée sur

* Le Centraal Bureau voor Schimmelcultures a bien voulu se charger de cette vérification.

colonne d'alumine désactivée, il se forme un certain nombre de zones diversement colorées dont l'élution est faite aussi sélectivement que possible. Le Tableau II indique l'aspect du chromatogramme et l'éluant utilisé pour la séparation de chaque zone.

Les éluats correspondant à chaque zone sont évaporés à sec sous pression réduite, en atmosphère d'azote. Après remise en solution dans l'éther de pétrole, les fractions ainsi obtenues sont examinées au spectrophotomètre.

TABLEAU II
SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES CAROTÉNOÏDES DE *Rh. mucilaginosa*
Les zones sont indiquées dans l'ordre croissant d'adsorption.

Zone	Couleur	Eluant
1	Incolore	Ether de pétrole
2	Jaune pâle, fluorescence bleu ciel, dans l'u.v.	Ether de pétrole + 5 % éther sulfurique
3	Orange	Ether de pétrole + 10 % éther sulfurique
4	Jaune pâle	Ether de pétrole + 15-20 % éther sulfurique
5	Orange	Ether de pétrole + 20-25 % éther sulfurique
6	Jaune pâle	Ether de pétrole + 25-50 % éther sulfurique
7	Rouge foncé	Ether sulfurique pur
8	Diffuse, formée en réalité de 7 bandes peu nettes	Méthanol pur

Fraction 1: Le spectre u.v. laisse supposer qu'il s'agit d'esters de stérols; le produit d'évaporation donne une réaction de Liebermann intense: nous n'avons pas poursuivi l'étude de cette fraction.

Fraction 2: ne donne pas de spectre bien défini. Nous avons craint la présence d'esters d'acides gras aussi avons nous pratiqué une saponification à froid par la potasse méthanolique à 12 %. Après extraction de l'insaponifiable par l'éther de pétrole, lavage à l'eau et séchage sur sulfate de sodium anhydre, nous avons procédé à une deuxième chromatographie sur magnésie-célite (1:1). Le développement du chromatogramme par de l'éther de pétrole contenant 2 % d'acétone permet d'obtenir 2 fractions: (a) La première fraction est incolore et présente dans l'u.v. une intense fluorescence bleu-ciel. Le spectre infra-rouge montre qu'il s'agit d'une substance à longue chaîne possédant, entre autres, une seule double liaison, et une fonction cétone. Il n'y a ni noyau aromatique, ni groupe OH. L'étude de cette substance n'a pas été poursuivie. (b) La deuxième fraction est colorée en jaune pâle, le spectre montre un seul maximum à 441 m μ dans l'éther de pétrole, ce produit n'a pu être identifié, il s'agit peut être d'un produit d'altération.

Contrairement à ce que nous pensions, ces différentes fractions ne contiennent ni phytoène, ni phytofluène.

Fraction 3: Le spectre obtenu (400-424-450-475 m μ) est celui d'un mélange. Par chromatographie sur magnésie-célite (1:1) avec de l'éther de pétrole à 5 % d'acétone, nous avons pu obtenir deux fractions: (a) Le pigment de la 1ère fraction a été identifié au β -carotène grâce aux caractères suivants:

- Le spectre d'absorption dans l'éther de pétrole présente des maxima situés à 424-450-477 m μ (425-450-477 m μ d'après GOODWIN¹⁵).

- D'autre part la chromatographie sur magnésie-célite (1:1) du mélange avec du β -carotène pur (Roche) fournit une bande unique. (b) Le pigment de la 2ème fraction interfère en partie avec le β -carotène et n'a pu être séparé de ce dernier qu'avec

difficulté. Entièrement épiphasique, ce pigment semble identique au pigment X mis en évidence par H. CLAES¹⁶ dans un mutant de *Chlorella* et présente les maxima suivants: 404-426-453 m μ .

Fraction 4: Le spectre indique que la séparation avec la zone précédente n'a pas été parfaite. Par contre, sur magnésie-célite (1:1) avec de l'éther de pétrole à 10 % d'acétone, nous séparons facilement deux fractions: (a) La première est constituée par le pigment X. (b) La deuxième est constituée par un pigment que nous avons identifié au γ -carotène par ses caractères d'absorption et son spectre présentant les maxima suivants: 435-460-493 m μ (432-461-494 m μ d'après GOODWIN⁸).

Fraction 5: Cette fraction est uniquement formée par du γ -carotène déjà caractérisé dans la fraction 4.

Fraction 6: Le comportement chromatographique et le spectre présentant des maxima situés à 415-439-469 m μ indiquent qu'il s'agit de neurosporène (415-440-470 m μ d'après HAXO⁹).

Fraction 7: Le comportement chromatographique et le spectre (458-485-518 m μ) montrent qu'il s'agit de torulène, ce pigment a été isolé par LEDERER de *Rh. rubra*¹⁰.

Fraction 8: Les pigments, trop peu abondants n'ont pu être séparés de manière satisfaisante.

Fraction 9: Le pigment présente les caractères d'un acide et semble bien, d'après nos dernières expériences, être identique à la torularhodine isolée de *Rh. rubra* par KARRER ET RUTSCHMANN¹¹.

Nous avons préparé l'ester méthylique de notre pigment acide par action du diazométhane; la comparaison du spectre d'absorption dans l'éther de pétrole du produit obtenu avec un échantillon authentique d'ester méthylique de la torularhodine laisse penser que notre pigment est constitué par un mélange des formes *cis* et *trans* de la torularhodine.

En fait après isomérisation par l'iode selon ZECHMEISTER¹², l'ester méthylique de référence fournit un spectre pratiquement identique à celui que nous avons obtenu pour l'ester méthylique de notre pigment acide (voir Fig. 1).

D'ailleurs la torularhodine a été obtenue à partir de *Rh. mucilaginos*a (Hoffmann La Roche, communication personnelle).

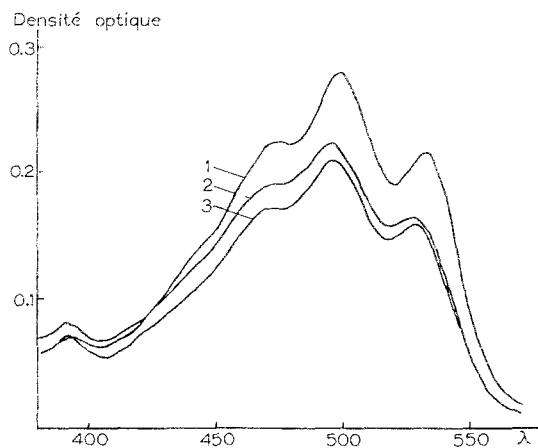


Fig. 1. 1. Ester méthylique de la torularhodine. 2. Ester méthylique de la torularhodine après isomérisation par l'iode. 3. Ester méthylique du pigment acide isolé de *Rh. mucilaginos*a.

Notre souche de *Rh. mucilaginosa* contient donc quatre pigments principaux: torularhodine, torulène, γ -carotène, β -carotène, ce qui est en accord avec les résultats de plusieurs auteurs pour d'autres espèces de *Rhodotorula* et en particulier avec ceux récents de PETERSON *et al.*¹⁸ pour *Rh. mucilaginosa*.

Nous avons pu, d'autre part, mettre en évidence tout d'abord le neurosporène qui, en ce qui concerne les levures, n'a été signalé jusqu'à présent que par BONNER *et al.* chez *Rh. rubra* et enfin le pigment X dont c'est la première fois que l'on mentionne la présence chez une levure.

Mutant RO1: Nous avons pu caractériser quatre pigments: le torulène, γ -carotène, pigment X, β -carotène. Cette souche se distingue donc aisément de la souche mère au moins par l'absence de torularhodine. De plus, le neurosporène n'est pas synthétisé, du moins en quantité décelable, dans nos conditions expérimentales.

Mutant RB1: Malgré sa coloration blanche, nous avons pu mettre en évidence, opérant sur 200 g de levure, des traces de β -carotène. La mutation a donc provoqué, chez cette souche, une abolition pratiquement totale de la synthèse des polyènes; nous n'avons pas pu, notamment, trouver d'accumulation de phytoène ou de phytofluène, corps considérés par plusieurs auteurs comme étant les précurseurs des caroténoïdes.

Mutant RJ1: Malgré sa coloration jaune, nous avons pu caractériser chez ce mutant la torularhodine, le torulène n'a pu être décelé.

Par contre il faut noter la présence d'un caroténoïde que nous n'avons jamais rencontré dans la souche mère: le ζ -carotène. De couleur verte en solution dans l'éther de pétrole, il est adsorbé sur colonne de magnésie entre le β -et le γ -carotène.

Le spectre effectué dans l'éther de pétrole nous a fourni les valeurs suivantes: 378-399-424 m μ , NASH ET ZSCHEILE¹⁹ donnent 378-400-425 m μ .

En outre, nous avons pu montrer chez ce mutant la présence de neurosporène, γ -carotène, β -carotène.

Mutant RJP: Ce mutant de couleur plus pâle que le précédent, contient les mêmes pigments que RJ1, y compris la torularhodine.

Mutant M1: Malgré nos nombreux essais, nous avons toujours du constater l'absence de pigment ainsi que de phytoène et phytofluène.

Mutant RJPX: A l'exception du pigment X qui n'a pas pu être caractérisé, ce mutant contient tous les pigments rencontrés dans la souche mère, c'est-à-dire: torularhodine, torulène, γ -carotène, β -carotène. En outre, de même que chez les deux autres mutants jaunes RJ1 et RJP nous avons pu caractériser le ζ -carotène. Enfin, c'est la mère de nos souches dans laquelle il nous a été possible de mettre en évidence le phytofluène que nous avons caractérisé grâce à son intense fluorescence bleu-vert dans l'u.v., son adsorption au-dessous du β -carotène et son spectre: 330-348-368 m μ (332-348-367 m μ d'après BONNER *et al.*¹)

De plus, nous avons confirmé que le polyène que nous avons isolé était bien du phytofluène par chromatographie de son mélange avec du phytofluène que nous avions isolé d'un concentré de tomates selon la technique de RABOURN *et al.*²⁰.

Mutant OR1: Cette souche, de coloration assez différente de celle du mutant RJPX, ne présente cependant, avec ce dernier aucune différence qualitative dans sa composition en caroténoïdes. Nous avons en effet pu caractériser: la torularhodine, le torulène, neurosporène, γ -carotène, ζ -carotène, β -carotène et phytofluène.

Mutant RJPY: L'analyse de ce mutant, dont la coloration est voisine de celle de

OR_I nous a réservé une grande surprise car cinq des pigments rencontrés chez son précurseur immédiat (OR_I) ont disparu et seuls le ζ -carotène et le neurosporène subsistent.

Par contre, le lycopène s'y trouve en quantité relativement élevée et nous avons pu isoler ce caroténoïde à l'état cristallisé. Il a été caractérisé par son spectre d'absorption dans l'éther de pétrole: 446-474-506 m μ (446-474-506, ESCHER²¹) et par chromatographie du mélange avec du lycopène pur (Fluka).

A notre connaissance, le lycopène n'a été mis en évidence chez les levures rouges, que dans un seul autre cas, celui d'une variété de *Rh. sarniei* étudiée par FROMAGEOT ET TCHANG²².

Enfin, adsorbé au-dessus du lycopène, nous avons trouvé un pigment que ses caractères d'adsorption et son spectre 504-535-572 m μ dans le sulfure de carbone, 466-494-528 m μ dans l'éther de pétrole, nous ont permis de l'identifier à la *rhodoviolascine* (500-532-570 m μ) dans le sulfure de carbone et (466-494-528 m μ) dans l'éther de pétrole selon KARRER ET SOLMSEN²³. C'est la première fois semble-t-il que ce pigment qui constitue la majeure partie des caroténoïdes de certaines bactéries photosynthétiques¹³ est mentionné chez une levure rouge.

Etude quantitative

Afin de diminuer les risques d'oxydation et d'isomérisation, nous avons travaillé sur des quantités de levure beaucoup plus faibles que précédemment (de l'ordre de quelques grammes) permettant ainsi des extractions et des chromatographies plus rapides et nous avons vérifié que la reproductibilité de nos dosages était satisfaisante.

Le Tableau III résume les résultats que nous avons obtenus dans l'étude de chaque souche, seuls les mutants RB_I et M_I qui ne contiennent pas de caroténoïdes n'y figurent pas.

L'examen de ce tableau montre que: (a) Le taux des caroténoïdes totaux est variable il est nettement diminué dans RO_I et RJPY (*a fortiori* dans RB_I et M_I) par rapport à RMP alors qu'il est augmenté dans OR_I. (b) Le taux de certains caroténoïdes varie considérablement. La torularhodine qui forme les 4/5 des pigments de la souche mère, n'existe plus ou ne se rencontre qu'en quantité inférieure à 5 % chez les mutants. Le β -carotène, au contraire qui représente moins de 5 % des pigments de RMP, forme plus de 60 % de ceux de RO_I et RJP. Le γ -carotène passe de 1 % chez RMP à 42 % chez RJ_I. (c) Des caroténoïdes nouveaux peuvent apparaître comme le lycopène qui reste indécélable dans la souche mère mais constitue 85 % des caroténoïdes de RJPY.

Modifications apportées par le 2-hydroxybiphényle dans la teneur en caroténoïdes de Rh. mucilaginosa

Dans un précédent mémoire²⁴ nous avons montré que sous l'influence du 2-hydroxybiphényle nous obtenons, en culture, une levure pratiquement blanche. Cette dernière n'est cependant pas totalement dépourvue de caroténoïdes. En effet, nous avons extrait à partir de 50 g de levure sèche ayant poussé en présence de 2-hydroxybiphényle une solution jaune très pâle que nous avons soumise à la chromatographie. Quatre expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions et ont donné chaque fois des résultats qualitatifs identiques. Nous avons pu caractériser le ζ -carotène, le neurosporène et le phytoène à l'exclusion de tout autre polyène. Leur dosage a été

TABLEAU III

TENEUR DE *Rh. mucilaginosa* ET DE SES MUTANTS EN POLYÈNES

Les résultats sont la moyenne d'au moins deux expériences, ils sont exprimés en $\mu\text{g/g}$, les nombres entre parenthèses indiquent, pour chaque souche, le pourcentage de chacun des pigments dosés par rapport au total.

	RMP	ROr	RJr	RJP	RJPX	ORr	RJPY
Torularhodine	97.8 (81.27)	—	4.78 (4.85)	4.61 (3.62)	3.02 (2.98)	4.55 (3.13)	—
Spirilloxanthine	—	—	—	—	—	—	1.52 (2.0)
Lycopène	—	—	—	—	—	—	65.66 (86.4)
Torulène	15.6 (12.96)	8.9 (16.51)	?	?	1.83 (1.82)	0.26 (0.18)	—
Neurosporène	—	—	5.22 (5.30)	4.79 (3.77)	5.03 (4.98)	5.1 (3.51)	3.29 (4.32)
γ -Carotène	1.36 (1.13)	8.5 (15.77)	41.43 (42.11)	35.38 (27.85)	19.37 (19.23)	46.43 (31.98)	—
ζ -Carotène	—	—	6.35 (6.45)	2.23 (1.75)	7.76 (7.68)	9.0 (6.19)	2.90 (3.82)
Pigment X	Traces	1.6 (2.97)	—	—	—	—	—
β -Carotène	5.57 (4.62)	34.88 (64.73)	40.6 (41.26)	80.3 (63.07)	54.41 (53.90)	74.93 (51.61)	—
Phytofluène	—	—	—	—	9.52 (9.43)	4.90 (3.37)	2.69 (3.52)
Total	120.33	53.88	98.38	127.31	100.94	145.17	76.05

fait dans deux expériences, en voici les résultats exprimés en $\mu\text{g/g}$ de levure sèche:

Neurosporène	0.84	0.92
ζ -Carotène	1.66	1.44
Phytoène	6	10

Le phytofluène est donc totalement absent de ces cultures. Ce fait n'est pas surprenant, NAKAYAMA²⁵ n'a que rarement pu caractériser le phytofluène chez des levures rouges et d'autre part, BONNER *et al.* qui ont été les premiers auteurs à signaler la présence de ce polyène chez *Rh. rubra*, ont noté sur des souches conservées pendant deux ans une diminution très importante du taux de phytofluène²⁶.

Etude de l'apparition des pigments après élimination de 2-hydroxybiphényle

20 ml d'une culture de *Rh. mucilaginosa* sur 2-hydroxybiphényle, âgée de 24 h, servent à ensemercer 40 boîtes de Roux contenant chacune 200 ml de milieu semi-synthétique gélosé et 40 $\mu\text{g/ml}$ de 2-hydroxybiphényle. La levure est récoltée au bout de 4 jours à l'aide d'une solution de 2-hydroxybiphényle à 40 $\mu\text{g/ml}$ puis centrifugée à 0° et lavée 4 fois rapidement à l'eau glacée: dans ces conditions, il ne reste plus ni sucre, ni 2-hydroxybiphényle dans la dernière eau de lavage.

La masse cellulaire est placée dans 8 l d'une solution de phosphate monopotassique M/15. Nous prélevons alors rapidement un échantillon qui servira au dosage des caroténoïdes à l'instant zéro puis un courant d'air stérile est envoyé dans la suspension. Au bout de 20 min, le changement de teinte est déjà perceptible. Des échantillons sont prélevés au bout de 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h; la levure est tuée par l'acétone et les caroténoïdes extraits de la manière habituelle.

Les résultats d'une de ces expériences sont indiqués dans le Tableau IV.

TABLEAU IV
DOSAGE DES DIFFÉRENTS CAROTÉNOÏDES EN FONCTION DU TEMPS,
APRÈS ÉLIMINATION DU 2-HYDROXYBIPHÉNYLE
Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de levure sèche.

Temps (h)	<i>Torularhodine</i>	<i>Torulène</i>	<i>Neurosporène</i>	γ -Carotène	ζ -Carotène	β -Carotène	Total
0	0	0	0.40	0	3.07	0	3.47
2	0.83	0	0.53	0	5.03	0	6.39
6	2.7	0	0.66	0	8.25	0	11.61
12	21	0	0.72	0	3.12	2.73	27.67
24	58.75	23.30	0.68	13.05	2.48	11.88	113.25
36	70.2	29.6	0.70	15.12	0.68	28.5	145.63
48	72.2	32.1	0.66	7.6	0	32.2	144.76
72	68	8.65	0	7.30	0	15.95	101.02

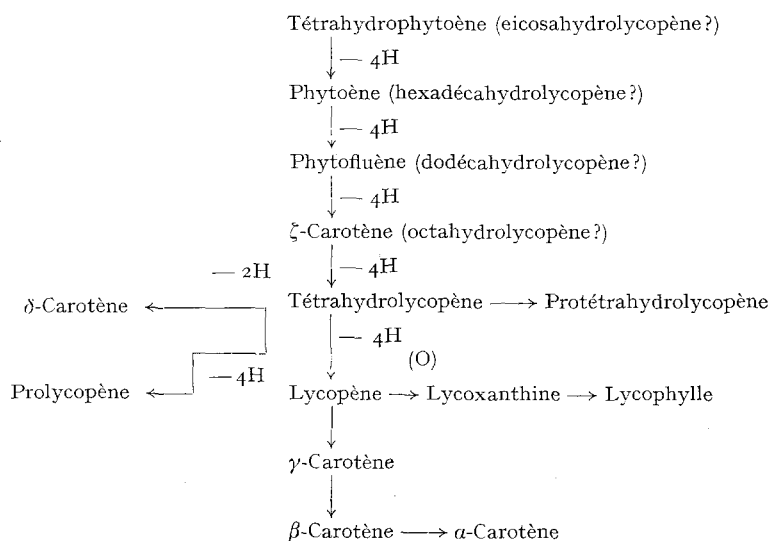
DISCUSSION

L'étude de BONNER *et al.*³ constitue toujours, à notre connaissance, la seule tentative pour aborder le mécanisme de la caroténogénèse des levures rouges par l'analyse systématique de mutants. Les conditions dans lesquelles ont opéré les auteurs précédents sont très différentes des nôtres; en particulier les mutants isolés proviennent tous d'une seule irradiation u.v. de la souche mère alors que la plupart de nos souches sont obtenues après plusieurs irradiations successives, ce qui peut expliquer que nous enregistrons des modifications beaucoup plus marquées.

BONNER *et al.* n'ont pas mis en évidence de torularhodine et le torulène constitue dans leur souche mère 70 % des caroténoïdes totaux. Trois de leurs mutants sont restés rouges (IV, VI, VII), deux mutants (I et II) sont orangé et se distinguent de la souche mère par une très forte diminution du torulène et une augmentation sensible du γ -carotène, surtout chez le mutant II.

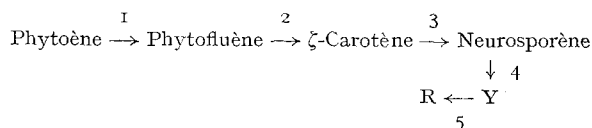
Nous constatons de même chez notre souche RJ1 une disparition pratiquement totale du torulène et une très forte augmentation du γ -carotène. Chez RO1, la disparition de la torularhodine est également accompagnée d'une augmentation sensible du β -carotène. Il semblerait donc d'après ces résultats que le γ -carotène constitue le précurseur du torulène et le β -carotène celui de la torularhodine.

De fait, la structure polyisoprénique des caroténoïdes incite à concevoir une filiation dans leur synthèse et c'est ainsi qu'à la suite d'une étude génétique très étendue sur les tomates, PORTER ET LINCOLN²⁷ ont proposé le schéma ci-après.



(d'après GOODWIN¹⁵)

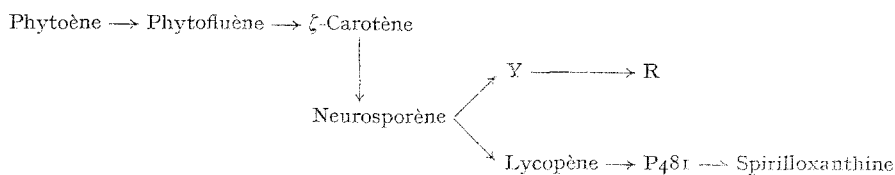
Certains auteurs ont pu mettre en évidence une telle filiation chez les micro-organismes et tout récemment NAKAYAMA²⁸ a montré à l'aide de mutants de *Rhodospseudomonas sphéroïdes* que deux pigments Y et R se synthétisent selon le schéma:



La réaction 1 serait bloquée chez le mutant bleu-vert qui ne contient plus que du phytoène, la réaction 4 est bloquée chez le mutant vert qui accumule principalement du neurosporène et du dihydroxyneurosporène alors que la réaction 5 n'a pas lieu chez le mutant brun qui voit s'accumuler du neurosporène et du pigment Y.

Par une étude comparée de l'apparition des caroténoïdes dans des conditions

normales et après action de la diphenylamine, JENSEN *et al.*²⁹ concluent également chez *Rhodospirillum rubrum*, à une filiation selon le schéma :



Nous allons envisager si ces schémas peuvent être appliqués aux résultats expérimentaux que nous venons de rapporter en étudiant les différentes étapes indiquées par les auteurs.

1. L'existence de la première de ces étapes: Phytoène \longrightarrow phytofluène semble douteuse chez *Rh. mucilaginosa* du fait que ces deux polyènes n'ont pas pu être caractérisés simultanément dans une souche donnée et qu'en particulier, si le phytoène est présent dans notre levure cultivée en présence de 2-hydroxybiphényle, le phytofluène en est absent.

Si l'on admet avec RABOURN³⁰ que le phytoène et le phytofluène sont des isomères, la succession de déshydrogénations proposée par PORTER ET LINCOLN n'est plus valable et on peut aussi bien penser que ces deux corps proviennent d'un précurseur commun sans qu'il soit nécessaire que l'un dérive de l'autre.

Il faut cependant se rappeler que KOE ET ZECHMEISTER⁶ ont apparemment obtenu du phytofluène à partir du phytoène par déshydrogénation à l'aide de N-bromo-succinimide.

2. L'étape suivante: phytofluène \longrightarrow ζ -carotène ne semble pas non plus avoir lieu chez *Rh. mucilaginosa*.

D'après l'expérience relatée dans le Tableau IV il se synthétise du ζ -carotène alors que la levure au départ ne contenait pas de phytofluène qui d'ailleurs n'a jamais pu être caractérisé au cours de cette expérience.

D'autre part, dans les mutants où le ζ -carotène a pu être mis en évidence, la présence ou l'absence de phytofluène ne semble pas influencer le taux de ce caroténoïde.

Enfin d'après les travaux de NASH *et al.*¹⁹ le ζ -carotène serait un isomère du phytofluène et non un déhydrophytofluène ce qui va également à l'encontre de la théorie des déshydrogénations successives.

3. Le passage du ζ -carotène au neurosporène est également douteux chez *Rh. mucilaginosa* car si le neurosporène a pu être caractérisé dans la souche mère en travaillant sur de fortes quantités de levure, le ζ -carotène n'y a jamais été mis en évidence. De plus dans la levure cultivée en présence de 2-hydroxybiphényle, le taux de ζ -carotène est supérieur à celui du neurosporène, ce qui n'est guère en faveur du passage ζ -carotène \longrightarrow neurosporène.

4. La filiation neurosporène \longrightarrow lycopène ne semble s'opérer ni chez la souche mère, ni chez les mutants autres que RJPY. Il ne nous a pas été possible en effet, de mettre en évidence le lycopène même en travaillant sur des quantités de levure sèche de l'ordre de 300 g. De plus dans RJPY où le lycopène représente 86 % des polyènes totaux, le neurosporène représente 4 %, c'est-à-dire un taux semblable à celui des autres mutants où il ne se forme pas de lycopène.

5. L'enchaînement lycopène \rightarrow γ -carotène \rightarrow β -carotène semble également peu vraisemblable. En effet nous n'avons pu déceler de lycopène dans la souche mère qui contient cependant de petites quantités de γ -carotène et β -carotène; d'autre part après élimination du 2-hydroxybiphényle le γ -carotène apparaît après le β -carotène et non avant, de plus la présence de lycopène n'a pu être notée dans ce cas là.

L'apparition de pigments n'existant pas dans la souche mère comme par exemple le lycopène, que nous trouvons à un taux élevé dans RJPY, est assez difficile à expliquer.

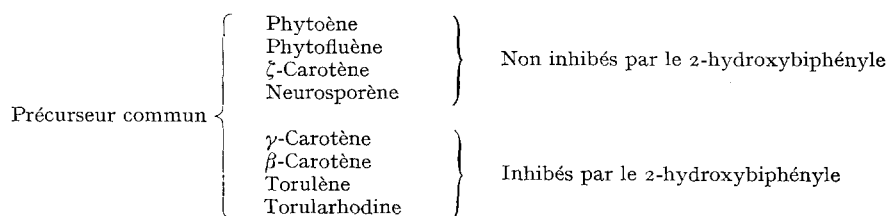
Cependant on connaît des mutations correspondant à "l'acquisition" d'un gène³¹ et d'autres où l'apparition d'un caractère est due à la mutation d'un gène dominant qui exerçait une action inhibitrice.

Quelques cas d'apparition de pigments chez des mutants sont signalés dans la littérature: BONNER *et al.*¹ n'ont trouvé de ζ -carotène chez *Rh. rubra* que dans le mutant "brun-orangé". SAPERSTEIN *et al.*³² étudiant les pigments de mutants de *Corynebacterium michiganense* obtenus par action du sulfate d'uranium signalent dans le mutant orangé, l'apparition de β -carotène et de canthaxanthine et dans le mutant rose, de spirilloxanthine alors que la souche mère ne contient que de la cryptoxanthine et du lycopène.

Ces résultats laissent penser, qu'au moins chez certains microorganismes, la synthèse des caroténoïdes ne s'effectue pas suivant la filiation proposée par PORTER ET LINCOLN.

Ne pouvant appliquer de schéma de filiation pour rendre compte de nos résultats expérimentaux, nous avons alors pensé que les différents caroténoïdes étaient susceptibles d'être synthétisés indépendamment les uns des autres à partir d'un précurseur commun. C'est l'idée qu'a également soutenue GOODWIN³³ à la suite de ses travaux concernant l'action de la diphenylamine sur la caroténogénèse de *Phycomyces*.

Nos résultats expérimentaux peuvent se transcrire dans le schéma ci-dessous, analogue à celui proposé par GOODWIN pour *Phycomyces*.



Cette théorie proposée par GOODWIN semble parfaitement pouvoir expliquer nos résultats. La présence d'un précurseur commun est confirmée par les données exposées dans le Tableau III. En effet, au début de l'expérience, la levure contient 3.47 μg de caroténoïdes/g de levure sèche, au bout de 36 h d'aération, nous trouvons 145.63 μg /g de levure sèche.

Il n'est guère possible d'identifier le précurseur accumulé au phytoène, puisque le taux de ce polyène est d'environ 10 μg /g de levure sèche ce qui est nettement insuffisant pour justifier un tel accroissement de la teneur en caroténoïdes.

La nature de ce précurseur reste à déterminer mais il est vraisemblable qu'il n'appartient pas à la série de PORTER ET LINCOLN et il pourrait s'agir d'une molécule beaucoup plus petite que l'édifice en C₄₀ proposé dans la théorie de la filiation, ainsi

que l'a suggéré MACKINNEY³⁴ pour expliquer l'augmentation considérable de la synthèse du β -carotène par *Phycomyces* sous l'influence de la β -ionone.

D'après cet auteur, la partie centrale de la molécule se synthétiserait indépendamment de ses extrémités. Il est intéressant de constater que cette hypothèse rejoint la méthode employée par ISLER *et al.*³⁵ pour effectuer la synthèse des caroténoïdes en réalisant la condensation de 2 fragments symétriques avec un fragment central.

REMERCIEMENTS

Nous remercions tout particulièrement Messieurs les Professeurs B. EPHERUSSI et Ö. WINGE pour les commentaires qu'il nous ont adressés au sujet des mutations et Monsieur le Professeur GOODWIN pour l'intérêt qu'il a bien voulu prêter à notre travail.

Nos remerciements vont également à Mlle CLAES pour les renseignements qu'elle a bien voulu nous fournir au sujet du pigment X et à la firme Hoffmann-La-Roche (Bâle) pour l'envoi d'un échantillon d'ester méthylique de torularhodine et l'interprétation du spectre infrarouge.

RÉSUMÉ

1. La souche de *Rhodotorula mucilaginosa* que nous avons étudiée contient les caroténoïdes suivants, en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche:

Torularhodine 98, torulène 16, γ -carotène 1.5, β -carotène 5.5. Elle ne contient ni phytoène, ni phytofluène.

2. Par irradiations u.v. successives, nous avons pu isoler des souches stables dont la composition qualitative et quantitative est très différente de celle de la souche mère; par rapport à cette dernière, le taux de certains caroténoïdes diminue ou même devient nul, il peut aussi augmenter et il apparaît parfois des caroténoïdes n'existant pas dans la souche mère.

3. *Rh. mucilaginosa* cultivée en présence de 2-hydroxybiphényle devient blanche mais contient encore de petites quantités de polyènes.

Par lavage, l'inhibiteur peut être éliminé et une synthèse endogène des pigments peut être mise en évidence.

4. Les résultats obtenus ne paraissent pas compatibles avec l'idée d'une filiation entre les différents polyènes.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BONNER, A. SANDOVAL, Y. W. TANG ET L. ZECHMEISTER, *Arch. Biochem.*, 10 (1946) 113.
- ² T. NAKAYAMA, G. MACKINNEY, H. J. PHAFF, *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Sér.*, 20 (1954) 217.
- ³ E. J. CONWAY ET J. BREEN, *Biochem. J.*, 39 (1945) 368.
- ⁴ T. W. GOODWIN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 550.
- ⁵ W. J. RABOURN ET F. W. QUACKENBUSH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 44 (1953) 159.
- ⁶ B. K. KOE ET L. ZECHMEISTER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 41 (1952) 236.
- ⁷ H. A. NASH, F. W. QUACKENBUSH ET J. W. PORTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 3613.
- ⁸ T. W. GOODWIN, *Biochem. J.*, 62 (1956) 348.
- ⁹ F. HAXO, *Arch. Biochem.*, 20 (1949) 400.
- ¹⁰ E. LEDERER, *Thèse*, Paris, 1938.
- ¹¹ P. KARRER ET J. RUTSCHMANN, *Helv. Chim. Acta.*, 26 (1943) 2109; 28 (1945) 795; 29 (1946) 355.
- ¹² L. ZECHMEISTER, *Chem. Revs.*, 34 (1944) 267.
- ¹³ A. POLGAR, C. B. VAN NIEL ET L. ZECHMEISTER, *Arch. Biochem.*, 5 (1944) 243.

- ¹⁴ W. LASKOWSKI ET W. STEIN, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 452.
- ¹⁵ T. W. GOODWIN, *The comparative biochemistry of the Carotenoids*, London, 1952.
- ¹⁶ H. CLAES, *Z. Naturforsch.*, 12 (1957) 401.
- ¹⁷ A. POLGAR ET L. ZECHMEISTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 1856.
- ¹⁸ W. J. PETERSON, W. R. EVANS, E. LECCE, T. A. BELL ET J. L. ETHELLES, *J. Bacteriol.*, 76 (1958) 586.
- ¹⁹ H. A. NASH ET F. P. ZSCHEILE, *Arch. Biochem.*, 7 (1945) 395.
- ²⁰ W. J. RABOURN, F. W. QUACKENBUSH ET J. W. PORTER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 (1954) 267.
- ²¹ H. H. ESCHER, *Helv. Chim. Acta*, 11 (1928) 758.
- ²² CL. FROMAGEOT ET J. L. TCHANG, *Arch. Mikrobiol.*, 9 (1938) 424.
- ²³ P. KARRER ET U. SOLMSEN, *Helv. Chim. Acta*, 18 (1935) 1306; 19 (1936) 3.
- ²⁴ J. VILLOUTREIX, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 434.
- ²⁵ T. O. M. NAKAYAMA, d'après G. MACKINNEY, *Ann. Rev. Biochem.*, 21 (1952) 482.
- ²⁶ Y. W. TANG, J. BONNER ET L. ZECHMEISTER, *Arch. Biochem.*, 21 (1949) 455.
- ²⁷ J. W. PORTER ET R. E. LINCOLN, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 390.
- ²⁸ T. O. M. NAKAYAMA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 75 (1958) 356.
- ²⁹ S. L. JENSEN, G. COHEN-BAZIRE, T. O. M. NAKAYAMA ET R. Y. STANIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 477.
- ³⁰ W. J. RABOURN ET F. W. QUACKENBUSH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 61 (1956) 111.
- ³¹ Ö. WINGE ET C. ROBERTS, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg Sér. physiol.*, 25 (1950) 35.
- ³² S. SAPERSTEIN, M. P. STARR ET J. A. FILFUS, *J. Gen. Microbiol.*, 10 (1954) 85.
- ³³ T. W. GOODWIN, *J. Sci. Food Agr.*, 4 (1953) 209.
- ³⁴ G. MACKINNEY, *Ann. Rev. Biochem.*, 21 (1952) 473.
- ³⁵ O. ISLER ET M. MONTAVON, *Chimia*, 12 (1958) 1.

Biochim. Biophys. Acta, 40 (1960) 442-457

EXCHANGE REACTIONS CATALYZED BY γ -AMINOBUTYRIC-GLUTAMIC TRANSAMINASE

R. W. ALBERS AND WILLIAM B. JAKOBY

*Laboratory of Neuroanatomical Sciences National Institute of Neurological Diseases and Blindness
and Laboratory of Biochemistry and Metabolism,
National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health,
Bethesda, Md. (U.S.A.)*

(Received October 19th, 1959)

SUMMARY

γ -Aminobutyrate-glutamate transaminase catalyzes exchange reactions between γ -aminobutyrate and succinic semialdehyde and between L-glutamate and α -ketoglutarate. Several analogs were tested for inhibition of each of the exchange reactions; for a given analog, approximately equal inhibitions were obtained in both exchange reactions. Glutarate and butyrate were the most effective analogs tested.

INTRODUCTION

The purification of a soluble γ -aminobutyric-glutamic transaminase from a strain of *Pseudomonas fluorescens* has permitted a kinetic analysis of the course of the reaction described by equation (1). The results of this work were consistent with the hypothesis

Biochim. Biophys. Acta, 40 (1960) 457-461