

# Influence de la nystatine, un antibiotique polyénique, sur la formation des stérols liés par complexes et sur la conidiation du *Coprinus cinereus*<sup>1</sup>

## Influence of nystatine a polyene antibiotic, on the formation of complex-bound sterols and the formation of conidia by *Coprinus cinereus*

G. Défago, U. Mühlethaler et H. Kern

*Institut de Botanique Spéciale EPF-Z, ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich (Suisse), 31 août 1976*

**Summary.** In contrary to the wild strain, a monocaryotic mutant of *Coprinus cinereus* (basidiomycete) does not contain hydrosoluble, complex-bound sterols. Under nystatine-treatment, however, the mutant is induced to produce this kind of sterols in abundance. Furthermore, nystatine highly increases sporulation of the mutant and decreases sporulation of the wild strain.

Les champignons synthétisent plusieurs catégories de stérols: les stérols libres, les stérols estérifiés et les stérols rendus solubles dans l'eau par formation de complexes<sup>2</sup>; ces complexes sont probablement dus à des polysaccharides dont une partie est localisée au niveau de la paroi cellulaire<sup>3</sup>. De tels complexes ont été trouvés aussi chez les plantes supérieures<sup>4</sup> et chez les euglènes<sup>5</sup>. Les stérols libres et estérifiés<sup>6</sup> sont à l'origine de la toxicité des antibiotiques polyéniques pour les cellules fongiques. Ces dernières années, plusieurs mutants dont la synthèse des stérols libres et estérifiés diffère de celle de la souche sauvage ont été obtenus chez les champignons filamenteux. Ces mutants sont 2-150 fois plus résistants que la souche sauvage aux antibiotiques polyéniques et leur pouvoir conidiogène est, dans la presque totalité des cas, fortement amoindri<sup>7-10</sup>.

Ce travail reporte l'isolation d'un mutant du coprin dont la synthèse des stérols liés par complexes est inhibée dans les conditions normales de croissance. De plus, nous avons étudié l'influence de la nystatine sur les différentes catégories de stérols et sur la conidiation de ce basidiomycète.

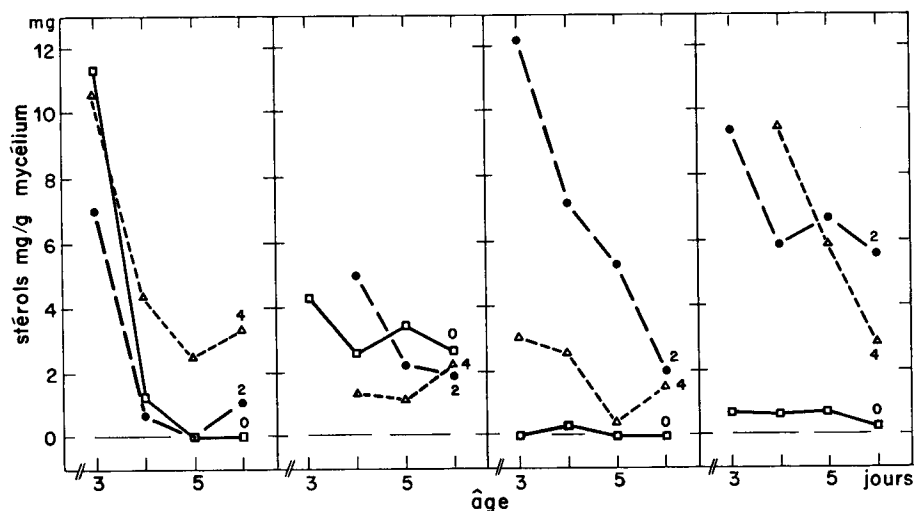
**Matériel et méthodes.** La souche monocaryote du *Coprinus cinereus* (Schaeff. ex Fr.) Gray – souvent nommée par erreur *C. lagopus* sensu Buller – a été traitée aux rayons ultraviolets. Parmi les 10% de conidies survivant sur un milieu à base de gélose maltée, nous avons sélectionné un mutant qui est 2 fois plus résistant que la souche sauvage à la nystatine sur ce milieu. Pour toutes les autres expériences, les souches sont cultivées à l'obscurité dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 25 ml de milieu liquide défini dont la source d'azote est de la phénylalanine ou de l'arginine<sup>11</sup>. Le mycélium est

broyé au [Potter] et divisé en 2 parties égales. De la première aliquote du broyat, les stérols libres et estérifiés sont extraits à l'éther après saponification à la soude<sup>12</sup>. De la deuxième, tous les stérols sont extraits après saponification avec une solution de pyrogallol, d'hydroxyde de potassium et de méthanol<sup>13</sup>; la différence des 2 déterminations donne la quantité de stérols liés par complexes. La détermination quantitative des stérols est faite par la méthode de Liebermann-Burchard et l'analyse qualitative a lieu par chromatographie gazeuse et NMR. La nystatine (4320 U/mg) est dissoute dans l'acétone.

**Résultats et discussion.** La souche sauvage synthétise les 3 catégories de stérols. L'intensité de la synthèse des stérols liés par complexes dépend de l'âge du mycélium et de la source d'azote dans laquelle il a poussé. Le mutant

- 1 Supporté par le Fond National Suisse, requête no 3.280.74.
- 2 C. G. P. Pillai et Y. D. Weete, *Phytochemistry* 14, 2347 (1975).
- 3 E. D. Thompson, B. A. Knights et L. K. Parks, *Biochem. biophys. Acta* 304, 132 (1973).
- 4 G. Adler et Z. Kasprzyk, *Phytochemistry* 14, 627 (1975).
- 5 R. D. Brandt, R. J. Pryce, C. Anding et G. Ourisson, *Eur. J. Biochem.* 17, 344 (1970).
- 6 S. C. Kinsky, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1963, 387 (1964).
- 7 J. S. Kim et K. J. Kwon-Chung, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 6, 102 (1974).
- 8 J. S. Kim, K. J. Kwon-Chung, G. W. A. Milne et B. Prescott, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 6, 405 (1974).
- 9 M. Grindle, *Molec. gen. Genet.* 130, 81 (1974).
- 10 M. Grindle, *Molec. gen. Genet.* 120, 283 (1973).
- 11 U. Mühlethaler, *Diss. ETH Zürich* (1976).
- 12 R. A. Olsen, *Physiologia pl.* 28, 507 (1973).
- 13 B. G. Adams et L. W. Parks, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 28, 490 (1967).

Influence de la nystatine sur la teneur en stérols liés par complexes de la souche sauvage (I) et du mutant (II). La croissance a lieu sur un milieu à base de phénylalanine (A) ou d'arginine (B) en présence de 0, 2 et 4 ppm de nystatine. De gauche à droite: IA, IB, IIA, IIB.



Influence de la nystatine sur la croissance, la conidiation et la synthèse des stérols libres et estérifiés de la souche sauvage et du mutant (4 jours de croissance en milieu liquide)

Souche	Source d'azote	Nystatine (ppm)	Poids sec mycélium (mg/l)	Nombre de conidies par g de mycélium $\times 10^7$	Stérols libres et estérifiés (mg/g mycélium)
Sauvage	Phénylalanine	0	409 $\pm$ 22	—	8,4 $\pm$ 0,8
Sauvage	Phénylalanine	2	276 $\pm$ 2	—	7,6 $\pm$ 0,3
Sauvage	Arginine	0	705 $\pm$ 107	6,6 $\pm$ 3,7	11,6 $\pm$ 0,9
Sauvage	Arginine	2	521 $\pm$ 28	0,4 $\pm$ 0,9	7,8 $\pm$ 1,3
Mutant	Phénylalanine	0	375 $\pm$ 13	—	11,8 $\pm$ 0,5
Mutant	Phénylalanine	2	287 $\pm$ 13	—	11,8 $\pm$ 0,2
Mutant	Argine	0	784 $\pm$ 50	8,7 $\pm$ 6,6	15,7 $\pm$ 1,9
Mutant	Arginine	2	840 $\pm$ 150	48,7 $\pm$ 18,6	14,2 $\pm$ 0,6

est, par contre, dépourvu de ces stérols liés par complexes; il compense partiellement ce manque par une teneur plus élevée en stérols libres et estérifiés. La possibilité de sélectionner de tels mutants devrait permettre d'éclaircir le rôle des stérols liés par complexes dans les cellules végétales; on admet généralement qu'ils constituent une réserve de stérols facilement disponibles<sup>14</sup>.

La nystatine influence relativement peu la synthèse des stérols liés par complexes chez la souche sauvage. Cet antibiotique induit par contre abondamment la synthèse de cette catégorie de stérols chez le mutant. Cette augmentation de la teneur en stérols liés par complexes peut constituer un mécanisme de défense de la cellule contre la nystatine. Un tel mécanisme a été invoqué pour expliquer l'augmentation de la synthèse des stérols libres et estérifiés sous l'effet de la nystatine<sup>15</sup> et de la sulfanilamide<sup>16</sup> chez les levures. Les 2 souches du coprin ont le même spectre qualitatif de stérols; celui-ci contient très

probablement de l'ergostérol et du 22-dihydroergostérol. Il n'est pas influencé par la nystatine.

La nystatine change non seulement la synthèse des stérols mais encore l'intensité de la conidiation; celle-ci diminue chez la souche sauvage en présence de l'antibiotique et augmente par contre fortement chez le mutant. Dans le milieu à base de phénylalanine, la nystatine n'arrive pas à induire la formation de conidies. Une fois de plus, les changements stéroliques provoqués soit par des mutations soit par l'addition de stérols exogènes<sup>17</sup> sont accompagnés de variations dans l'intensité de la reproduction asexuelle; ces variations sont beaucoup plus marquées que celles de la croissance mycélienne.

14 B. G. Adams et L. W. Parks, *J. Lipid Res.* 9, 8 (1968).

15 R. D. Gal'tsova, *Microbiologiya* 37, 57 (1968).

16 R. V. Rajagopalan et P. S. Sarma, *Biochem. J.* 69, 53 (1958).

17 J. W. Hendrix, *Phytopathology* 55, 790 (1965).

## Ba<sup>++</sup> induced square-shaped potential waves in molluscan neurones

M. Gola and C. Ducreux

Département de Biophysique des Neuromembranes, C. N. R. S., Institut de Neurophysiologie et Psychophysiologie, 31, Chemin Joseph-Aiguier, F-13274 Marseille Cedex 2 (France), 2 Septembre 1976

**Summary.** Rhythmic slow square-shaped potential waves lasting 20–50 sec are induced in *Aplysia* neurones when Ca<sup>++</sup> is replaced by Ba<sup>++</sup>. During the plateau, the membrane is highly permeable to Ba<sup>++</sup> ions, whereas in the inter-wave period the membrane resistance increases by 60 times. Analysis with slow current ramps suggests that the membrane properties of Ba-treated neurones and normally burst-generating neurones are similar.

During the last few years, much attention has been paid to the membrane mechanisms generating the slow potential oscillations in molluscan burst-generating neurones and in neurones exhibiting paroxysmal depolarization shifts (PDS). Our present ideas about these mechanisms are derived mainly from experiments performed in normal or pentylenetetrazol-treated neurones of molluscs. Besides, it was reported that Ba<sup>++</sup> induces 'square shaped' slow waves in various nerve cells<sup>1–4</sup>. The analogy between these different electrical slow behaviours makes the Ba effect particularly interesting, since it can be easily reproduced. The present communication deals with the slow waves induced by replacing Ca<sup>++</sup> by Ba<sup>++</sup> in *Helix* and *Aplysia* neurones.

The experiments were performed on *Helix pomatia* and on a small specimen (5–10 g) of *Aplysia rosea* collected along the Mediterranean coast. The abdominal ganglion was removed from the animal and 2 KCl-filled electrodes

were inserted in the cell. The *Aplysia* neurones studied were R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub>, R<sub>2</sub> to R<sub>4</sub> and L<sub>11</sub>. The most constant effect of Ba<sup>++</sup>-saline was observed on R<sub>14</sub> and L<sub>11</sub>. All following results refer to R<sub>14</sub>. Voltage measurements were made with conventional methods.

After control tests of the membrane characteristics of the cell, the artificial sea water (ASW) was changed to ASW in which Ca<sup>++</sup> was replaced by Ba<sup>++</sup>. In order to avoid a precipitate of BaSO<sub>4</sub>, the MgSO<sub>4</sub> (20 mM) of the normal ASW was replaced by an isosmotic amount of MgCl<sub>2</sub> (NaCl 494 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, Tris pH 7.7

1 I. Tasaki, *Nature, Lond.* 184, 1574 (1959).

2 K. Krnjevic, R. Pumain and L. Renaud, *J. Physiol., Lond.* 215, 223 (1971).

3 P. G. Kostyuk, in: *Neurobiology of Invertebrates*, p. 145. Ed. J. Salanki. Plenum Press, New York 1968.

4 R. Eckert and H. D. Lux, *J. Physiol., Lond.* 254, 129 (1976).