

273. Activité comparée de la transaminase alanine-glyoxylate de *Neurospora* cultivé en présence de saccharose ou d'acétate

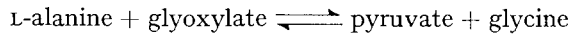
par G. Turian et G. Combépine

En hommage au Professeur TH. POSTERNAK à l'occasion de son 60^e anniversaire

(29 VIII 63)

La transamination enzymatique entre acides aminés naturels et glyoxylate est encore peu connue¹⁾. Une transaminase glutamate-glyoxylate a été décrite dans les tissus animaux²⁾ et végétaux³⁾.

La transaminase alanine-glyoxylate n'a, par contre, été mise en évidence que chez des microorganismes, une bactérie du genre *Pseudomonas*⁴⁾ et les champignons *Aspergillus niger*⁵⁾, *Blastocladiella emersonii*⁶⁾, *Allomyces* (souches hybrides) et *Neurospora crassa*⁷⁾. Cette transaminase est génératrice de glycine par équilibre favorable de la réaction réversible⁸⁾:



Lors de notre première étude de l'activité de la transaminase alanine-glyoxylate de *Neurospora*⁷⁾, nous n'avions pu obtenir une production de glycine à partir d'extraits non dialysés de cultures sur acétate, contrairement aux constatations faites avec des cultures sur même milieu mais avec le saccharose comme source de carbone. Cela nous avait conduit à envisager la possibilité d'une répression de l'activité de l'enzyme par un excès de substances endogènes dans les extraits de cultures sur acétate⁷⁾.

Pour essayer de préciser ce point, nous avons repris ces expériences en soumettant les extraits de *Neurospora* à une dialyse préalable, de manière à pouvoir comparer l'activité transaminasique des cultures sur saccharose, un répresseur de l'isocitratase⁸⁾, à celle des cultures sur acétate, caractérisée par une forte induction isocitratasique productrice du substrat glyoxylique⁷⁾.

Neurospora crassa (souche sauvage de signe de compatibilité⁺, collection de Baarn, Hollande) a été cultivé sur le milieu P de WESTERGAARD & MITCHELL⁹⁾ avec trois sources de C, soit: saccharose 2%; saccharose 1% + acétate 1%; acétate 2%.

1) A. MEISTER, Adv. in Enzymol. 16, 185 (1955); J. S. FRUTON & S. SIMMONDS, General Biochemistry, Wiley, New-York 1958.

2) P. S. CAMMARATA & P. P. COHEN, J. biol. Chemistry 187, 439 (1950); H. I. NAKADA & S. WEINHOUSE, *ibid.* 204, 831 (1953).

3) D. G. WILSON, K. W. KING & R. H. BURRIS, J. biol. Chemistry 208, 863 (1954).

4) L. L. CAMPBELL, J. Bacteriol. 77, 81 (1956).

5) A. DILLMANN, Dissertation, Universität München (1957); W. FRANKE, G. JILGE & G. EICHORN, Arch. Mikrobiol. 39, 58 (1961).

6) H. D. McCURDY & E. C. CANTINO, Plant Physiol. 35, 463 (1960).

7) G. TURIAN, Path. Microbiol. 24, 819 (1961).

8) G. TURIAN, J. SEYDOUX & D. VOLKMANN, Path. Microbiol. 25, 737 (1962).

9) M. WESTERGAARD & H. K. MITCHELL, Amer. J. Bot. 34, 573 (1947).

Après 3, 9 ou 12 jours de culture stationnaire, à 25° à l'obscurité, les mycéliums ont été récoltés (mise en pelote pour enrober les conidies), rincés à l'eau distillée, pressés entre papiers buvards jusqu'à élimination de leur eau de rétention et pesés (poids frais). Ils ont été conservés à -16° (3 jours au maximum) avant leur utilisation.

Pour la préparation des homogénats, les mycéliums gelés ont été broyés dans des mortiers refroidis par séjour au congélateur, en présence de sable de quartz lavé (acétone, HCl 1N puis eau distillée répétée) et d'une solution tampon phosphates 0,05M + NaCl 0,85% de pH 7,4. La quantité totale de cette solution a été de 9 volumes généralement (3 ml au minimum). Ces homogénats ont été centrifugés à froid pendant 5 min à 1600 g; le culot a été repris pour un nouveau broyage suivi d'une seconde centrifugation. Des surnageants réunis, une moitié a été conservée telle quelle à -16° (extrait non dialysé) et l'autre, dialysée dans des tubes de cellulose (Visking seamless cellulose tubing) de 18/32 inches durant 18 h à 4°, sous agitation constante, contre une solution tampon phosphates 0,2M de pH 7,2. Lorsque l'extrait dialysé n'était pas utilisé immédiatement, il a été conservé (une nuit au plus) à -16°.

Mesure de l'activité enzymatique: 0,5 ml d'extrait (dialysé et non dialysé respectivement) est pipeté dans un petit tube à centrifugation placé sur un agitateur métabolique (Gallenkamp) réglé à 37°. Les tubes ont été incubés 20 min avec 0,5 ml d'eau bidistillée contenant:

Na ₂ HPO ₄	36 μ moles
KH ₂ PO ₄	4 μ moles
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	5 μ moles
L-(+)-alanine (HOFFMANN-LA ROCHE)	10 μ moles
glyoxylate de Na (FLUKA)	10 μ moles
pyridoxal-5-phosphate (HOFFMANN-LA ROCHE)	20 μg

Le pH final du mélange d'incubation (1 ml) se situe entre 7,4-7,5 (suboptimal pour la réaction enzymatique mais défavorable à la réaction non enzymatique⁶).

La réaction enzymatique a été arrêtée par chauffage de 5 min à 100°, et le mélange centrifugé pour éliminer les protéines précipitées. Le surnageant a servi au dosage des glycine et pyruvate formés, critères de l'activité transaminasique. La glycine et le pyruvate endogènes ont été dosés sur des extraits non dialysés inactivés immédiatement à la chaleur (5 min à 100° au temps 0). Quant aux extraits dialysés traités de la même manière, ils ont permis de contrôler l'absence de ces métabolites, témoignant ainsi de l'efficacité de l'opération de dialyse.

Enfin, chaque expérience a comporté un témoin non enzymatique (homogénat remplacé par 0,5 ml H₂O bidistillée) soumis aux mêmes opérations.

Dosage de la glycine: par chromatographie unidimensionnelle descendante sur papier SCHLEICHER & SCHUELL N° 2043 b glacé portant des taches de 0,05 ml d'extraits déprotéinisés, avec le mélange butanol-H₂O-acide acétique (4-5-1). Le développement des chromatographies, prolongé 72 h dans une grande cuve, a permis une excellente séparation des taches de glycine et d'alanine. La révélation s'est faite à la ninhydrine (0,2% dans *n*-butanol), avec séchage de 10 min à 80° suivi d'une brève exposition à la lumière du jour (20 min) pour développement complet de la coloration. Après une nuit à l'obscurité, les taches ont été fixées avec le réactif cuprique de WIELAND & KAWERAU¹⁰), puis séchées, découpées et éluées au méthanol (5 ml). Les mesures spectrophotométriques, à 504 mμ, ont été faites contre un blanc découpé dans la même feuille de papier. Pour le dosage, des témoins de 2,5-25 μg de glycine (HOFFMANN-LA ROCHE) ont été traités dans les mêmes conditions.

Dosage du pyruvate: nous avons appliqué la méthode de préparation-séparation des dinitro-phénylhydrazones selon CAVALLINI¹¹) (pour les détails, voir 7)). Après évaporation à sec du solvant d'extraction (acétate d'éthyle), les dinitro-phénylhydrazones ont été reprises dans 0,2 ml de tam-

¹⁰) TH. WIELAND & E. KAWERAU, *Nature* 168, 77 (1951).

¹¹) D. CAVALLINI & N. FRONTALI, *Biochim. Biophys. Acta* 13, 439 (1954); S. L. RANSON, in *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* (K. PAECH & M. V. TRACEY), Bd. 2, 538 (1955).

pon phosphates (0,02M, pH 7,4) pour être déposées (à raison de 0,05 ml) sur papier SCHLEICHER & SCHUELL N° 2043b glacé et séparées par chromatographie descendante dans le solvant butanol-éthanol-NH₄OH 0,5N (7-1-2) durant 20-25 h.

Après découpage, les taches ont été éluées dans 5 ml de NaHCO₃ 0,2M, et l'extinction, mesurée à 365 m μ au spectrophotomètre BECKMAN DU. Le dosage de témoins de pyruvate (HOFFMANN-LA ROCHE), dans les mêmes conditions, a permis de constater que la méthode était satisfaisante.

Dosage des protéines: réalisé sur une aliquote des extraits non dialysés, par la méthode du biuret¹²⁾ impliquant une précipitation trichloracétique initiale et une mesure finale à 530 m μ . Protéine de référence: caséine dégraissée de la maison HOFFMANN-LA ROCHE⁷⁾.

Les résultats de nos mesures d'activité de la transaminase alanine-glyoxylate sont groupés dans les tableaux ci-dessous. Ils représentent la valeur moyenne de trois expériences successives.

Tableau I. *Extraits dialysés de Neurospora crassa cultivé 9 jours, à 25°, sur milieu P*
Activité transaminasique: μ mole glycine/mg prot./20 min.

Source de C		Saccharose 2%	Saccharose 1% CH ₃ COONa 1%	CH ₃ COONa 2%
Activité transaminasique (μ mole/mg prot./20 min) ^{a)}	glycine	2,1 (0,5)	1,03 (\leq 0)	0,5 (\leq 0)
	pyruvate	3,2 (1,0)	pas mesuré	1,4 (0,9)

a) Entre parenthèses, valeurs correspondantes des extraits non dialysés.

En fonction de l'âge des cultures, les analyses ont donné les valeurs comparatives figurant dans le Tableau II.

Tableau II. *Extraits dialysés de Neurospora crassa cultivé à 25° sur milieu P*
Activité transaminasique: μ mole glycine/mg prot./20 min.

Source de C	Age des cultures		
	3 jours ^{a)}	9 jours	12 jours
Saccharose 2%	0,25	2,1	1,3
Acétate de Na 2%	1,20	0,5	pas mesuré

a) Croissance active mais encore pondéralement très faible sur acétate (mycélium conidiogène), requérant de grandes surfaces de milieu (flacons de FERNBACH).

On constate que, contrairement aux extraits de cultures sur saccharose⁷⁾, les extraits de cultures sur acétate requièrent une dialyse préalable, pour la mise en évidence de leur transaminase par le dosage de la glycine formée (tableau I).

Pour expliquer cette différence de comportement, nous avons pensé⁷⁾ que la glycine produite était trop rapidement oxydée dans les extraits acétate non dialysés (co-facteur glycine-oxydasique?). Cette interprétation semble cependant devoir être écartée sur la base d'expériences préliminaires démontrant la constance du taux

¹²⁾ A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL & M. M. DAVID, J. biol. Chemistry 177, 751 (1949).

connu de glycine exogène après 20 min d'incubation avec des extraits de cultures sur acétate non dialysés. L'hypothèse d'une répression de la transaminase par un éventuel excès de glycine endogène – excès prévisible dans les cultures acétate à forte production glyoxylique par activité isocitratasique⁷⁾ – ne semble pas non plus rendre compte de l'absence d'activité observée. En effet, des dosages de la glycine endogène n'ont pas révélé un taux supérieur de cet amino-acide dans les extraits de cultures sur acétate, comparé à celui des extraits sur saccharose (tableau III):

Tableau III. *Glycine endogène ($\mu\text{mole}/\text{mg}$ protéine) de mycélium de *Neurospora crassa**

Source de C	Age des cultures sur milieu P		
	3 jours	9 jours	12 jours
Saccharose 2%	0,6	1,5	1,7
Acétate de Na 2%	0,9	1,2	1,5

Restent deux hypothèses que nous n'avons pas encore pu vérifier: (1) celle d'une incorporation anabolique (dans les bases nucléiques, etc.) si rapide de la glycine, qu'elle compense et au delà (voir cas de diminution du taux de la glycine, tableau I et 7)) la production de glycine par transamination; la dialyse éliminerait les facteurs d'incorporation de cette réaction concurrente; (2) celle d'une transamination secondaire de la glycine avec l'acide α -cétoglutarique produit en excès dans les cultures sur acétate¹³⁾ (l'acide glutamique résultant ne pouvait être décelé dans nos conditions chromatographiques où sa tache était masquée par celle de l'alanine); là aussi, cette réaction concurrente serait supprimée par la dialyse éliminant le partenaire cétoglutarique.

Quant à l'excès de pyruvate produit par rapport à la glycine, révélé par le bilan d'activité transaminasique, plus particulièrement celui concernant les extraits acétate (tableau I), il pourrait être attribué à l'activité parallèle, dans nos extraits bruts ou dialysés, d'une alanine-déshydrogénase. Une expérience dans laquelle l'alanine a été offerte comme seule partenaire de la réaction transaminasique (absence de glyoxylate exogène) n'a cependant pas permis de mesurer une production significative de pyruvate. Cette expérience semble aussi permettre d'écarter l'hypothèse d'une intervention de la transaminase glutamique-pyruvique de *Neurospora*¹⁴⁾ dans la production excédentaire de pyruvate, par transamination entre alanine et traces d'acide α -cétoglutarique endogène ayant pu échapper à la dialyse. En définitive, il se pourrait bien que le déséquilibre du bilan transaminasique relevât des causes discutées plus haut, suggérant la possibilité d'un «turn-over» de la glycine, plus rapide que celui du pyruvate.

Une signification physiologique peut être accordée aux données du tableau II montrant que l'activité de la transaminase apparaît au maximum déjà le 3^e jour dans les très jeunes cultures sur acétate, dont la croissance active est immédiatement suivie de différenciation conidienne, alors que dans les cultures sur saccharose, l'acti-

¹³⁾ G. TURIAN, *Path. Microbiol.* 26, sous presse (1963).

¹⁴⁾ J. R. S. FINCHAM, *Nature* 168, 957 (1951).

vité enzymatique n'atteint son maximum qu'après 9 jours, c'est-à-dire au moment de la maturité sexuelle (différenciation protopéithéciale) des mycéliums.

Relevons enfin que, contrairement à l'isocitratase, un enzyme de type adaptatif, inductible par l'acétate¹⁵⁾ mais réprimé en présence de saccharose⁸⁾, la transaminase alanine-glyoxylate de *Neurospora* se comporte en enzyme de type constitutif, formé et actif en présence du saccharose comme de l'acétate (tableau I). On peut cependant penser que son degré d'activité *in vivo* dépend, pour une part tout au moins, de celui de l'isocitratase pour ce qui concerne la disponibilité en partenaire glyoxylique.

Nous remercions le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE et le FONDS MARC BIRKIGT de leur précieux appui.

SUMMARY

Extracts from acetate-grown *Neurospora crassa* showed alanine-glyoxylate activity only after dialysis.

The activity of these extracts has been compared to that of similar, dialyzed extracts from sucrose cultures which were already active, though less without dialysis.

Endogenous levels of glycine in acetate cultures were not higher than in sucrose cultures. There are reasons to suspect a quicker turn-over of glycine in the conidiogenous cultures on acetate.

Institut de Botanique générale, Université de Genève

¹⁵⁾ H. L. KORNBERG, *Ann. Rev. Microbiol.* 13, 49 (1959).

274. Verteilung der Radioaktivität in der Ratte nach Verabreichung von [¹⁴C]-*d,l*- α -Tocopheryl-acetat

von U. Gloor, F. Weber, J. Würsch und O. Wiss

(21. IX. 63)

Für die Beurteilung des Wirkungsmechanismus des Vitamins E im tierischen Organismus sind sichere Kenntnisse über den Gehalt von α -Tocopherol in den Geweben wichtig. Im Zusammenhang mit der partiellen Ersetzbarkeit des Vitamins E durch unnatürliche Antioxydantien, wie z. B. Diphenylparaphenylendiamin und Ethoxyquin¹⁾ stellt sich die Frage, ob für deren Wirksamkeit geringere Mengen von α -Tocopherol in den Geweben vorhanden sein müssen, d. h., ob sie nur als Synergisten wirksam sind oder das Vitamin E ersetzen können. Publizierte Ergebnisse²⁻⁶⁾ über den

¹⁾ = 2,2,4-Trimethyl-1,2-dihydrochinolin.

²⁾ E. E. EDWIN, A. T. DIPLOCK, J. BUNYAN & J. GREEN, *Biochem. J.* 79, 91 (1961).

³⁾ J. GREEN, A. T. DIPLOCK, J. BUNYAN & E. E. EDWIN, *Biochem. J.* 79, 108 (1961).

⁴⁾ Q. CRIDER, P. ALAUPOVIČ & B. C. JOHNSON, *J. Nutrition* 73, 64 (1961); *Biochem. biophysic. Research Commun.* 2, 293 (1960); P. ALAUPOVIČ, B. C. JOHNSON, Q. CRIDER, H. N. BHAGAVAN & B. C. JOHNSON, *Amer. J. Clin. Nutrition* 9, No. 4, Pt. II, 76 (1961).

⁵⁾ A. S. CSALLANY & H. H. DRAPER, *Arch. Biochemistry Biophysics* 92, 462 (1961).

⁶⁾ J. G. BIERI, C. J. POLLARD, I. PRANGE & H. DAM, *Acta chem. scand.* 15, 783 (1961).