

ACTION DE QUELQUES FACTEURS
SUR LA CROISSANCE ET LA PIGMENTATION
DES RHODOTORULACEES

Par J. MERY

Nous exposerons ci-dessous les résultats de nos premières recherches sur la physiologie des Rhodotorulacées.

Les souches utilisées proviennent toutes de Delft (Centraalbureau voor Schimmelcultures) ; nous les devons à l'obligeance du Prof. A. S. Kluyver que nous prions d'agréer tous nos remerciements.

Rhodotorula rubra (Demme) Lodder.

Rhodotorula bronchialis (Ciferri et Redaelli) Lodder.

Rhodotorula glutinis (Fresenius) Harrison, variété *infirmino-miniata* (Okunuki) Lodder.

Rhodotorula gracilis Rennerfelt.

Rhodotorula sanniei (Ciferri et Redaelli) Lodder, Fromageot.

Rhodotorula aurantiaca (Saito), Lodder.

Quatre ordres de faits retiennent particulièrement l'attention :

1° L'influence de l'oxygène sur la formation du pigment de ces levures.

2° L'action de différents sucres et de leur concentration sur l'apparition du pigment, son intensité et sa persistance.

3° L'immersion dans les milieux de culture solides absolument exceptionnelle chez ces levures.

4° L'action particulière de certains facteurs azotés sur la croissance, la lipogénèse, la pigmentation et l'immersion.

Influence de l'oxygène. — Elle se trouve démontrée par une observation très simple :

Si on ensemence *Rhodotorula gracilis* (souche 84), ou *Rhodotorula glutinis* (souche 88), sur milieu de Sabouraud ramené à 2 p. 100

de glycose (milieu de Langeron), on constate que la pigmentation apparaît d'abord en un point central de la surface de la petite colonie. Elle s'étend ensuite *superficiellement* à la périphérie, d'abord blanche, de cette dernière. Si au bout de deux, trois ou plusieurs semaines, on râcle la surface de la colonie, on s'aperçoit que les levures situées en profondeur sont restées blanches. Une observation analogue peut être faite avec d'autres espèces appartenant au genre *Rhodotorula* ; elle est particulièrement nette en ce qui concerne les deux souches précitées.

Une autre expérience est encore plus démonstrative. Nous commençons par points sur milieu peptoné-glycosé ; le tube est ensuite rempli, à moitié de la hauteur de la gélose inclinée, avec de l'huile de paraffine stérile. Sous huile de paraffine, la tension en oxygène est forcément faible et les colonies qui se développent sont blanches ou à peine colorées, tandis que celles développées au contact de l'air acquièrent rapidement leur teinte normale. Cette expérience si simple démontre les rapports entre la tension en oxygène, sa consommation au cours de la respiration et la formation de pigments caroténoïdes.

Action de différents sucres et de leur concentration. — Des observations antérieures, notamment celles de Fromageot et Tchang (1938), ont précisé l'existence de trois stades dans la pigmentation. Un premier stade est celui de l'existence d'une pigmentation maxima, le second celui de sa persistance, le troisième celui d'une décoloration progressive.

Les observations faites par les auteurs précités chez *Rhodotorula sarniei* s'étendent à l'ensemble des *Rhodotorulacées* et l'existence de de ces trois stades est constante lorsqu'on cultive ces levures sur des milieux dont on fait varier le sucre : glycose, saccharose, maltose, lactose.

Nous avons encore constaté que l'apparition du pigment est plus précoce, que la pigmentation est plus intense, que la persistance de la pigmentation maxima est accrue en présence de glycose, par rapport à d'autres sucres, notamment le saccharose, pourtant toujours assimilable.

Dans une seconde série d'expériences, nous faisons varier la concentration en glycérides du milieu, en portant cette concentration à 7,5 p. 100 (comme dans le milieu de Wöltje), au lieu de 2 p. 100 (taux habituel). En règle générale, l'augmentation de la concentration en sucres accroît la persistance de la pigmentation. Il en est bien ainsi avec *Rhodotorula rubra* (souche 79), *Rhodotorula bronchialis*

(souche 81), *Rhodotorula gracilis* (souche 84), *Rhodotorula aurantiaca* (souche 90), etc... Mais l'observation inverse est faite avec diverses souches de *Rhodotorula glutinis* et avec *Rhodotorula sanniei*.

L'existence de rapports entre le catabolisme des glycodes et la formation du pigment se trouve démontrée par l'expérience suivante. Nous incorporons au milieu de Langeron du fluorure de sodium au taux de 1 p. 200. La pigmentation est retardée, affaiblie et prend des teintes intermédiaires ; la décoloration est rapide. Enfin la croissance est diminuée.

Immersion dans les milieux de culture solides. — Elle est tout à fait exceptionnelle chez ces levures cultivées sur milieux de culture normaux. Nous ne l'avons observée que chez *Rhodotorula bronchialis* (souche 81) ; chez cette levure, on constate que le pigment ne s'étend pas au niveau de la zone profonde immergée et qui est pseudo-filamenteuse ; elle reste blanche, contrastant avec la pigmentation rouge de la colonie en surface ; des expériences répétées ont confirmé ce résultat.

Influence de la nature et de la concentration de la source azotée. — Un déséquilibre azoté du milieu est facilement obtenu en employant un milieu sans autre substrat azoté que celui contenu à l'état de traces dans la gélose brute. Dans ces conditions, la croissance est très faible, mais la persistance de la pigmentation maxima est quasi-indéfinie.

Les nitrates n'ont pas une influence particulière sur la pigmentation. En ensemençant sur milieu de Czapek (qui contient du nitrate de potassium), nous avons constaté que toutes les souches assimilant les nitrates selon les données de la méthode auxanographique de Beijerinck, présentaient une croissance optima sur ce milieu ; d'autre part, elles y excrètent un pigment diffusible, jaune et fluorescent.

L'emploi de différents acides aminés, comme source unique d'azote, donne des résultats particulièrement intéressants :

En présence de *glycocolle*, la croissance est moyenne, mais la persistance de la pigmentation maxima est notablement allongée. Ceci est à rapprocher d'une observation de Schopfer (1935), selon laquelle le glycocolle favoriserait la production de carotènes chez *Mucor hiemalis*.

L'addition de *cystéine* à un milieu de culture a pour effet d'atténuer l'intensité de la pigmentation maxima et de hâter considérablement la décoloration des colonies. La *cystine* a une action inverse.

La *tyrosine* est exceptionnellement assimilée. On le constate en ensemençant la levure sur un milieu ayant la composition suivante :

gélose 2 p. 100, glycose pur 2 p. 100, tyrosine 1 p. 100. La tyrosine insoluble opacifie le milieu. S'il y a assimilation, il se produit éclaircissement du milieu autour de la colonie. Seul, parmi les souches étudiées, *Rhodotorula gracilis* (souche 84), assimile la tyrosine.

Mais qu'elle paraisse assimilée ou non, la tyrosine provoque, chez toutes les levures étudiées :

- une diminution de la croissance globale ;
- une lipogénèse intense, comme en témoigne la présence d'enclaves lipidiques énormes ;
- une intensité, jusque-là jamais rencontrée, de la pigmentation ;
- une persistance indéfinie de cette pigmentation maxima ;
- une immersion constante. Cette immersion, absolument exceptionnelle dans les conditions normales, est ici la règle chez toutes les levures étudiées. Elle est liée à une pseudo-filamentation ou à une filamentation vraie de type très particulier chez *Rhodotorula rubra* (souche 79). Fait encore plus remarquable, la pigmentation s'étend en profondeur et même au niveau des éléments immergés.

Des observations analogues sont faites quand on réduit à 1/2 p. 100 le taux de la tyrosine dans le milieu ou si on y remplace le glycose par le glycérol.

Interprétation des faits précédemment observés. — 1° Selon Diddens et Lodder, les pigments des *Rhodotorulacées* sont toujours des carotènes. Ceci n'a été démontré de façon certaine que chez *Rhodotorula rubra* (Lederer) et chez *Rhodotorula sanniei* (Fromageot et Tchang). Une action identique d'un déséquilibre azoté, de la cystéine, de la tyrosine sur d'autres espèces, tend à confirmer l'opinion de Diddens et Lodder.

2° L'influence de l'oxygène sur la formation du pigment chez les *Rhodotorulacées* est évidente, comme nous avons pu le constater.

3° Ceci est à rapprocher de l'hypothèse de Luteraan, qui établit un rapport entre la présence constante de pigments caroténoïdes chez ces levures et l'absence chez elles de pouvoir fermentatif. Cet ensemble de faits tend à confirmer une hypothèse ancienne d'Arnaud, violemment combattue, et suivant laquelle les carotènes joueraient un rôle dans la respiration.

4° La respiration chez les levures est plus intense en présence de glycose que de saccharose (Kluyver et Custers). La pigmentation des *Rhodotorulacées* est plus précoce et plus intense en présence de glycose que de saccharose.

5° La tyrosine, qui stimule particulièrement la respiration chez la levure de boulangerie (Béraud), provoque l'action que l'on sait sur la pigmentation des *Rhodotorulacées*.

6° Les carotènes sont des corps très réduits et autoxydables. Frank, Retovski et Verne ont démontré, successivement, le pouvoir antioxygène des lipides et des carotènes. Luteraan et Choay démontrent son existence *in vivo* chez les *Rhodotorulacées* en les cultivant en présence d'acide oléique ; la persistance de la pigmentation, dans ces conditions, est quasi-indéfinie.

7° Il y a, comme l'a présumé Schopfer, des relations nettes, chez les champignons, entre la lipogénèse et la production de carotènes. Nous confirmons cette opinion, car certains facteurs favorisant la lipogénèse : augmentation de la concentration en glycérides (Terroine et ses collaborateurs), emploi du glycérol, déséquilibre azoté (Heide, Raaf), emploi de la tyrosine (Raaf), provoquent une augmentation de la pigmentation et de sa persistance chez les *Rhodotorulacées*.

L'action si particulière du glycérol a déjà été étudiée par Fromageot et Tchang. Nous confirmons leurs résultats.

8° Luteraan établit le rôle de la lipogénèse dans la respiration cellulaire et démontre que les circonstances tendant à élever le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire, normalement bas chez les levures, favorisent la synthèse et l'excrétion finale de corps très réduits et autoxydables que sont les lipides. Nous en déduisons, chez les *Rhodotorulacées*, que plus le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire tend à être élevé au delà de sa valeur normale, difficile à établir, plus se manifeste, par une persistance prolongée de la pigmentation maxima, le pouvoir antioxygène *in vivo* des lipides et des carotènes.

9° Nous avons établi, chez les champignons filamenteux, l'existence de rapports entre l'immersion dans les milieux de culture solides et la lipogénèse. « L'immersion mycélienne, observée en milieu de culture solide, est la traduction morphologique de la réaction de l'organisme fongique contre les circonstances de milieu et de culture qui tendent à élever, de façon exagérée, le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire » (Méry et Luteraan, 1948). Ceci permet de comprendre pourquoi, sous l'influence de la tyrosine, le pigment caroténoïde s'étend par exception au niveau des éléments immergés chez les *Rhodotorulacées*.

10° Finalement, le pouvoir antioxygène des lipides et des carotènes *in vivo* n'apparaît que comme l'une des manifestations si nombreuses d'une *fonction antioxygène physiologique* découverte et décrite par Langeron et Luteraan chez les champignons, mais qui pourrait bien être beaucoup plus générale.

Valeur morphologique des faits observés. — Nous insistons, pour terminer, sur les services que rendront, pour la détermination spécifique si difficile des Rhodotorulacées :

— l'emploi de certains milieux différentiels : milieu de Czapek, milieu à la tyrosine ;

— l'action parfois variable de l'augmentation d'une concentration en glycérides sur la pigmentation.

BIBLIOGRAPHIE

- ARNAUD. — *C.R. Ac. Sc.*, CIX, 1889, 911, 914.
 BÉRAUD. — *C.R. Soc. Biol.*, CXXXI, 1939, 708.
 DIDDENS et LODDER. — *Die anaskosporegenen Hefen*. Amsterdam, 1942.
 FROMAGEOT et TCHANG. — *Archiv f. Mikrob.*, IX, 1938, 424.
 HEIDE. — *Archiv. f. Mikrob.*, X, 1939, 135.
 KLUYVER et CUSTERS. — *Ant. van Leeuw.*, VI, 1939-40, 121.
 LANGERON et LUTERAAN. — *Ann. de Paras.*, XXIV, 1949, p. 143-179.
 LUTERAAN et LANGERON. — *C.R. Acad. Sc.*, CCXXVIII, 1949, 1247.
 LUTERAAN, LANGERON et MÉRY. — *C.R. Acad. Sc.*, CCXXVIII, 1949, 338.
 MÉRY et LUTERAAN. — *C.R. Ac. Sc.*, CCXXVI, 1948, 1215.
 RAAF. — *Archiv f. Mikrob.*, XII, 1941, 132.
 SCHOPFER. — *C.R. Soc. Biol.*, CXVIII, 1935, 3.

Institut de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris

(Directeur : Prof. H. Galliard)

Section de Mycologie médicale (Chef de service : D^r M. Langeron)