

LA SYNTHÈSE ADAPTATIVE DES CYTOCHROMES CHEZ LA LEVURE DE BOULANGERIE

par

BORIS EPHRUSSI ET PIOTR P. SLONIMSKI

avec la collaboration technique de Mlle G. PERRODIN

Institut de Génétique du C.N.R.S. et

Institut de Biologie physico-chimique, Paris (France)

On sait que les diverses microorganismes présentent des capacités respiratoires très variées. L'arsenal d'enzymes respiratoires dont ils disposent varie également d'une espèce, race ou souche, à l'autre. D'une façon générale, les organismes aérobies possèdent le système WARBURG-KEILIN complet, les organismes anaérobies n'en possèdent pas¹.

Mais le phénotype d'un organisme est toujours le résultat des interactions entre génotype et milieu. Or, si, comme nous venons de le rappeler, les variations de l'équipement en enzymes respiratoires selon le génotype sont indiscutablement établies, les variations de ces constituants cellulaires en fonction du milieu n'ont reçu que très peu d'attention. Elles sont cependant fort dignes de remarque. Comme il sera montré dans les pages qui suivent, la capacité respiratoire de la levure, la nature et la quantité des cytochromes qu'elle contient, subissent des modifications extrêmement importantes sous l'influence des conditions d'aération*. L'ampleur de ces modifications, dont les limites sont fixées par le génotype, ainsi que leur vitesse et la nature des conditions par lesquelles elles sont induites, permettent de les assimiler aux phénomènes de l'adaptation enzymatique.

Les problèmes que pose la synthèse des enzymes au cours de l'adaptation enzymatique se posent dès lors à propos de la synthèse, sous l'influence de l'oxygène, des ferments respiratoires de la levure. Pour leur solution, l'étude de la synthèse adaptative des cytochromes présente l'avantage exceptionnel de pouvoir reposer non seulement sur les tests habituels d'activité mais encore sur l'observation spectroscopique directe.

Quelques-uns des faits qui seront décrits dans le présent mémoire ont été entrevus par certains auteurs. Parmi ceux-ci, nous ne citerons que WARBURG² qui constata que les levures cultivées au laboratoire respirent moins intensément que la levure de boulangerie du commerce, fortement aérée pendant la fabrication, et BERAUD⁴ qui compara des levures de vin cultivées sur des milieux solides avec celles cultivées dans des milieux liquides et observa que, chez les premières, la respiration est plus active et le spectre des cytochromes plus net. Ces auteurs ne sont pas allés au delà des constatations mentionnées. FINK⁵, EULER et ses collaborateurs⁶, BOREI ET SJÖDEN⁷ ont attribué à la pression d'oxygène au cours de la croissance les différences qu'ils ont observé entre diverses levures quant à l'intensité de la respiration et à la structure des spectres des cytochromes

* Nous avons fait état de nos résultats dans une note préliminaire⁸.

dont certains sont semblables à ceux que nous décrivons. Malheureusement, les levures utilisées par ces chercheurs (levures de brasserie hautes et basses, levures de boulangerie) représentent le plus souvent des races, sinon des espèces différentes et il est difficile de départager, dans les résultats des auteurs cités, ce qui revient aux différences héréditaires et aux différences de conditions de culture. FINK ET BERWALD⁸ ont décrit la transformation de la levure de brasserie basse en levure de boulangerie par la culture prolongée en aérobiose. Les conditions de leurs expériences étaient cependant extrêmement favorables à la sélection de mutants spontanés et on est en droit de penser que la transformation observée était due à ce mécanisme, c'est-à-dire, en dernière analyse, au changement du génotype prédominant dans la culture.

Il n'existe à notre connaissance aucun travail où les variations que peut subir le système des cytochromes d'une levure ont été étudiées dans des conditions qui excluent les modifications génotypiques de celle-ci et qui ne diffèrent que par le degré d'aération. C'est ce que nous nous sommes proposé de réaliser dans ce travail.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Souche de levure. Nous avons utilisé dans ce travail notre souche 59 R⁰. C'est une souche haploïde monosporique, isolée à partir de "Boulangerie II" (*Saccharomyces cerevisiae*) que nous tenons du laboratoire des Fermentations de l'Institut Pasteur de Paris.

Conditions de culture. Ce travail demandant des quantités relativement grandes de levure, la culture est effectuée dans un milieu renforcé, dont la composition est:

Yeast extract Difco	10 g
MgSO ₄	0.7 g
CaCl ₂	0.4 g
NaCl	0.5 g
FeCl ₃ à 1 %	0.5 ml
KH ₂ PO ₄	1.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2 g
Glucose	54 g
Eau distillée	qs 1000 ml

Afin d'obtenir le rendement maximum en aérobiose, nous avons recours à un dispositif constitué essentiellement par une bouteille Pyrex de 10 litres tournant horizontalement autour de son axe avec une vitesse de 150 tours par minute et contenant 1 litre de milieu. Cette disposition assure un brassage continu du milieu et une très bonne aération de la culture, dont une partie se trouve continuellement en couche mince à la surface intérieure de la bouteille. L'atmosphère de celle-ci est continuellement renouvelée par injection d'air comprimé filtré et humidifié, cette injection se faisant par un tube qui pénètre par le goulot de la bouteille. Le rendement obtenu dans ces conditions est d'environ 20 g (poids sec) par litre.

Pour la culture des levures en anaérobiose, nous nous servons du même dispositif légèrement modifié. La bouteille est bouchée par un bouchon de caoutchouc qui laisse passer deux tubes. Un de ceux-ci est placé dans un trou excentrique du bouchon et est coudé de façon à pouvoir plonger dans le liquide: il sert à l'introduction du gaz et aux prélèvements d'échantillons de la culture qui peuvent se faire sans aucune introduction d'air. Le deuxième tube est placé au centre du bouchon, se trouve continuellement dans l'atmosphère de la bouteille et sert à l'évacuation du gaz. L'extrémité extérieure de ce tube porte une rallonge flexible qui plonge dans du mercure.

Pour réaliser la culture anaérobie, on remplace l'air de la bouteille, aussitôt après l'ensemencement, par de l'azote purifiée par passage dans une colonne d'hydrosulfite de Na en milieu alcalin, puis on ferme le tube d'arrivée. Dans ces expériences, la quantité de liquide est de 3 litres par bouteille.

Traitement des suspensions non proliférantes. Pour soumettre la levure non-proliférante à diverses conditions d'aération, nous opérons de la façon suivante. La culture est recueillie dans des tubes à centrifuger et est lavée 3 fois par centrifugation à 6° C dans du tampon phosphaté M/15 à pH = 4.6. Le culot est suspendu dans le même tampon additionné ou non de glucose et placé dans des colonnes en Pyrex (8 cm × 80 cm) dont le fond est constitué par un filtre en verre fritté. Le tube de ce filtre permet l'injection de gaz, dont le passage assure, en outre, le brassage de la suspension. Les colonnes sont placées dans une étuve à 28° C. On utilise comme antimousse quelques ml d'huile additionnée de 5 % d'acide oléique.

Précautions d'asepsie. Toutes les opérations décrites sont effectuées stérilement et l'absence de contamination est vérifiée par les tests bactériologiques habituels.

Dénombrement des cellules. Celui-ci est fait à l'hématimètre sur des suspensions additionnées de bleu de méthylène, ce qui permet en outre d'évaluer la fréquence des cellules mortes. Le nombre de celles-ci n'a jamais dépassé 1%.

Poids sec. Le poids sec des suspensions est inféré à partir des mesures de densité effectuées à l'aide de l'électrophotomètre de MEUNIER, une courbe de correspondance ayant été établie au préalable.

Azote cellulaire. L'azote total est déterminé par le micro-Kjeldahl.

Mesures manométriques. La respiration et la fermentation aérobie sont déterminées à 28° C par la méthode directe de WARBURG dans le tampon phosphaté mentionné plus haut.

Techniques spectroscopiques. Sauf mention spéciale, toutes les observations et mesures sont effectuées sur des suspensions à 50% (volume cellulaire/volume total) dans du tampon, réduites par l'hydrosulfite de Na et contenues dans des cuves en plexiglas d'épaisseur variable (1 à 8 mm). Les positions des bandes sont déterminées au spectroscope de réversion de HARTRIDGE monté sur un microscope. Le dosage du cytochrome c réduit est effectué selon la méthode de ELLIOT ET KEILIN¹⁰ à l'aide du microspectroscope LEITZ, par compensation de l'intensité de la bande ac. La solution étalon est standardisée au spectrophotomètre BECKMAN, en admettant $\epsilon_{mM} = 28.1$ ¹¹.

L'hémochromogène pyridinique est dosé dans le mélange:

suspension de levure à 50%	1 ml
pyridine	0.33
KOH 0.1 N	0.33

après réduction par l'hydrosulfite de Na, contre un étalon standardisé au spectrophotomètre BECKMAN, en admettant $\epsilon_{mM} = 31$ (cf. LEMBERG ET LEGGE¹²). Vu la présence d'une forte bande c dans les spectres de quelques-unes de nos préparations d'hémochromogène pyridinique, nous avons, pour le dosage de ce dernier, apporté la modification suivante dans la méthode de ELLIOT ET KEILIN. Le cytochrome c est dosé sur une partie aliquote chauffée de la même levure. La cuve du cytochrome c étalon est laissée en place (et dans une position correspondant à la teneur de la préparation en cytochrome c) pendant la compensation de l'intensité de la bande a de l'hémochromogène pyridinique.

Rappelons en passant que la méthode de ELLIOT ET KEILIN présente l'avantage d'être applicable à l'étude des préparations opaques et ne nécessite donc pas l'extraction des pigments qui sont dosés *in situ*. Son défaut est la précision relativement petite des mesures. Dans les conditions de nos déterminations, le dosage du cytochrome c est précis à 10% près.

Nous ne parlerons ci-dessous que des bandes α des cytochromes. Les positions des bandes β sont parfois difficiles à préciser, car ces bandes sont généralement faibles et massées les unes dans le voisinage des autres.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Evolution des cellules proliférantes et non-proliférantes en anaérobiose

Nous ne ferons que rappeler brièvement les caractères bien connus d'une levure de boulangerie cultivée en aérobie¹³ que nous retrouvons chez la souche étudiée ici (Fig. 1, AE). A l'état réduit, elle présente un spectre qui comporte trois fortes bandes α dont les positions sont: c. 550-551 m μ , b. 563-564 m μ et a. 603-604 m μ et dont les intensités se rangent dans l'ordre de $ac > ab > aa$. Lorsque la préparation est congelée à l'air liquide, on voit les mêmes bandes intensifiées et décalées à 547, 559-560 et 599-600 m μ respectivement, et à 553 m μ la mince et très faible bande du cytochrome e récemment décrit par KEILIN ET HARTREE¹⁴. Si on chauffe la suspension cellulaire pendant 20 minutes à 80° C et l'examine ensuite à la température ordinaire, on ne voit que la bande du cytochrome c qui est thermostable; tous les autres cytochromes ont été détruits. Une faible et large bande peut être observée à ca 580 m μ ; elle correspond probablement à un hémochromogène artificiel résultant de l'union du groupement prosthétique du cytochrome a et d'une protéine dénaturée par la chaleur. L'observation à l'air liquide de la préparation chauffée, confirme la destruction des cytochromes b et a. La quantité de cytochrome c est de 0.06-0.07 γ Fe/mg N, et celle de l'hémochromogène pyridinique de l'ordre de 0.17 γ Fe/mg N. L'activité métabolique en présence de glucose

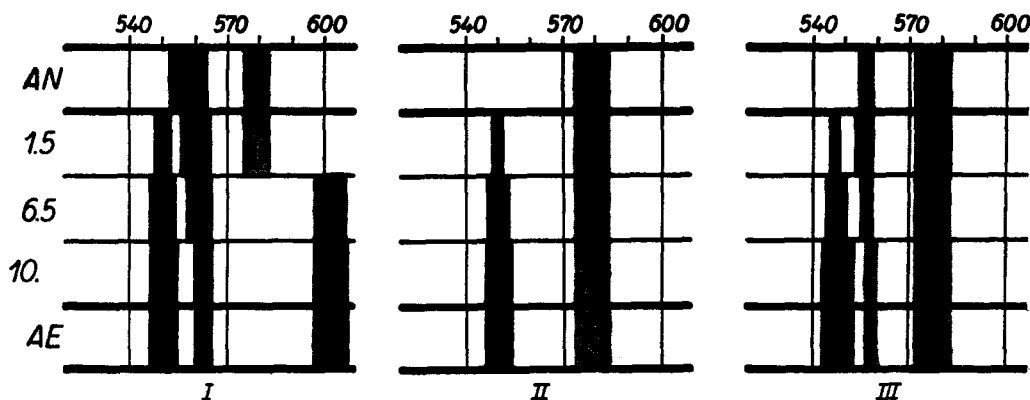


Fig. 1. Evolution du spectre de la levure cultivée en anaérobiose et aérée dans du tampon glucosé. Epaisseur des préparations: 4 mm. I. Spectres observés à 18° C; II. Spectres de la levure chauffée à 80° C pendant 20 minutes et observée à 18° C; III. *Id.* observé à — 170° C.

à 4% de la levure ayant proliféré en aérobiose est caractérisée par les valeurs suivantes: $Q_{O_2}(N) = 710$; $Q_{CO_2}(N)_{fermentation} = 1000$.

Lorsque cette levure est placée dans un milieu nutritif à l'abri de l'oxygène, il suffit qu'elle y produise 6 générations cellulaires (ce qui correspond à 24 heures environ) pour que ses caractéristiques soient radicalement modifiées. L'examen spectroscopique montre que les bandes des cytochromes b et c sont remplacées par une large et forte bande occupant une position intermédiaire (557–559 $m\mu$) et que la bande du cytochrome a est remplacée par une faible bande (a_1) aux environs de 580 $m\mu$. La bande à 557 $m\mu$ que nous allons provisoirement assimiler à ab_1 ne résulte pas d'une fusion des bandes des cytochromes b et c, mais correspond bien à un nouveau composé. Dans l'air liquide, elle reste unique et se déplace à 554 $m\mu$. Après chauffage de la levure, l'observation à la température normale ne permet pas de la voir. L'observation à — 170° C montre l'absence de la bande ac. On voit apparaître à cette température, une nouvelle et forte bande thermostable située à 555–556 $m\mu$ qui n'est pas décelable dans la culture aérobie. Nous discuterons plus bas la signification de ces trois bandes.

La quantité de cytochrome c est, d'après ces observations, inférieure à 0.002 $\gamma Fe/mg N$ et il est possible qu'elle soit nulle. Le dosage de l'hémochromogène pyridinique fournit la valeur 0.08 $\gamma Fe/mg N$.

Les caractères métaboliques de cette levure sont donnés par les chiffres suivants:

$$Q_{O_2}(N) = 9 \quad Q_{CO_2}(N)_{ferm.} = 2.600$$

Les images spectroscopiques qu'on vient de décrire sont représentées dans la Fig. 1, AN. Elles font ressortir la profonde modification de la constitution enzymatique de la levure ayant proliféré en anaérobiose.

Des modifications analogues peuvent-elles être introduites par l'anaérobiose en absence de multiplication cellulaire? L'expérience suivante permet de répondre à cette question. De la levure ayant proliféré en aérobiose est placée dans deux colonnes, dont l'une contient du tampon glucosé à 5.4% et l'autre du tampon seul. L'anaérobiose est assurée par passage d'azote purifié. De temps en temps des échantillons sont prélevés destinés à l'examen spectroscopique et aux tests d'activité. L'observation spectroscopique ne permet de déceler aucun changement même au bout de 22 heures, temps

suffisant, on se souvient, pour changer complètement le spectre des cellules proliférantes. Les résultats des autres mesures sont donnés par le Tableau I qui permet de constater que la capacité respiratoire et les teneurs en cytochrome c et en protohèmes restent sensiblement constantes et que seule la fermentation aérobie diminue graduellement pour tomber à environ 40% de sa valeur initiale, au bout de 22 heures.

TABLEAU I
EVOLUTION, EN ABSENCE D'OXYGÈNE, D'UNE LEVURE AYANT PROLIFÉRÉ EN AÉROBIOSE

	Heures	Poids sec (mg · 10 ⁻⁸)	N (mg · 10 ⁻⁸)	QO ₂	QCO ₂ fermentation	cytochrome c protohème (mg Fe · 10 ⁻¹³)	
Glucose + tampon	0	0.84	0.88	4.0 · 10 ⁻⁷	16 · 10 ⁻⁷	0.46	1.6
	4.5	1.0	0.75	3.7	9.7	0.48	
	13	1.0	0.61	3.9	6.5	0.39	1.2
	22	1.3	0.60	4.3	5.9	0.39	1.4
Tampon	22	0.90	0.92	3.7	17	0.45	

Toutes les valeurs sont calculées pour une cellule de levure. Les coefficients manométriques expriment le nombre de μ l de gaz absorbé ou dégagé pendant les premières 60 minutes de contact avec le glucose à 4%. Température: 28° C.

Le Tableau I permet de constater également qu'au cours de l'expérience, le nombre de cellules s'accroît légèrement, tandis qu'il reste stationnaire dans le témoin (tampon seul). Cette multiplication a pour effet une diminution de l'azote par cellule, qui est peut-être responsable de la diminution de l'intensité fermentaire (comparer DE LEY¹⁵). Le poids sec d'une cellule individuelle augmente progressivement: de $0.837 \cdot 10^{-8}$ mg, il passe à $1.25 \cdot 10^{-8}$ mg. Cette augmentation peut être attribuée à l'accumulation des réserves endogènes, non utilisables en anaérobiose^{16, 17}.

2. Effet de l'oxygène sur la levure ayant proliféré en anaérobiose

Dans les expériences dont nous donnerons maintenant les résultats, une levure ayant proliféré en anaérobiose est placée dans une colonne à aération dans du tampon glucosé, c'est-à-dire dans un milieu qui ne permet pas la croissance. Les changements qu'elle subit dans ces conditions sont le mieux illustrés par les modifications de son spectre. On les suivra facilement sur la Fig. 1, dont la première ligne horizontale représente le spectre de la levure au départ. Les lignes horizontales suivantes décrivent l'évolution du spectre avec le temps.

Déjà, au bout d'une heure et demie, on voit l'apparition du cytochrome c, dont la quantité va s'accroître progressivement. Les cytochromes b_1 et a_1 disparaissent au fur et à mesure que les cytochromes c, b et a sont formés. La bande thermostable située à 555 $m\mu$, très forte au début, s'estompe progressivement pour disparaître presque complètement à la fin de l'expérience. Après 10 heures d'aération, la levure possède le même spectre que la levure cultivée en aérobie (dernière ligne de la figure, AE).

Les résultats des diverses mesures effectuées sur des échantillons de cette levure sont donnés par le Tableau II. On y voit l'accroissement rapide de la teneur en cyto-

chrome c et l'augmentation parallèle de la capacité respiratoire. Les hémimes totales augmentent rapidement au cours des premières 2 heures; leur augmentation ultérieure est dans les limites des erreurs expérimentales. La fermentation aérobie diminue graduellement pour tomber au bout de 10 heures à environ 20% de la valeur initiale.

TABLEAU II

EVOLUTION, EN PRÉSENCE D'OXYGÈNE, D'UNE LEVURE AYANT PROLIFÉRÉ EN ANAÉROBIOSE

	Heures	Poids sec (mg · 10 ⁻⁸)	N (mg · 10 ⁻⁸)	qO ₂	qCO ₂ fermentation	cytochrome c protohème (mg Fe · 10 ⁻¹³)	
Glucose + tampon	0	1.0	1.2	0.1 · 10 ⁻⁷	31 · 10 ⁻⁷	< 0.03	0.94
	1.5	1.1	1.1	2.3	27	0.42	1.9
	3	1.1	0.95	3.5	18	0.65	2.0
	6.5	1.1	0.91	5.3	9.4	0.75	1.6
	10	1.0	0.70	4.2	4.9	0.83	1.6
Tampon	11	1.0	1.2	2.7	22	0.70	1.3

Voir légende du Tableau I.

Le nombre de cellules augmente légèrement, d'une façon linéaire, au cours de l'expérience, et a pour effet une diminution de la teneur des cellules en protéines. On constate, au bout de 10 heures qu'à peu près la moitié des cellules se sont divisées une fois. L'accroissement du rapport *poids sec/azote* est parallèle à cette croissance résiduelle d'où il résulte que chaque cellule pèse autant qu'au début de l'expérience. Ceci était à prévoir puisque les réserves endogènes peuvent être métabolisées par respiration.

La suspension aérée pendant 11 heures dans le tampon, sans source d'énergie exogène, évolue aussi, mais plus lentement. Il n'y a pas de divisions cellulaires, ni de changement du rapport *poids sec/azote*. La respiration, la fermentation, les teneurs en hémoprotéines et l'image spectroscopique ressemblent à celles qu'on obtient par aération en présence de glucose déjà au bout de 2 à 3 heures.

Les conclusions qui se dégagent des expériences que nous venons de décrire sont les suivantes. La levure qui a proliféré pendant un temps relativement court en absence d'oxygène, perd complètement le pouvoir d'oxyder le sucre, mais conserve son pouvoir fermentaire. Elle perd en même temps plusieurs constituants de la chaîne respiratoire, comme les cytochromes c, b, a, mais contient des constituants nouveaux, les cytochromes b₁ et a₁. Des tests *in vitro*, dans des systèmes reconstitués, montrent que ces modifications sont accompagnées de la perte des activités enzymatiques de la cytochrome oxydase, de la succino-déshydrogène et de la lactico-déshydrogène. Le mécanisme de cette perte semble requérir une multiplication cellulaire active, puisque, en absence de prolifération, la capacité respiratoire et la quantité de cytochrome c restent constantes en anaérobiose. Les enzymes déjà existants ne seraient donc pas détruits, mais "dilués" dans la masse cellulaire qui a cessé de les synthétiser (*cf.* WAINWRIGHT ET POLLOCK¹⁸).

La formation des enzymes respiratoires peut être induite par l'oxygène dans des conditions où le bilan de la synthèse des protéines cellulaires est négatif; elle est accompagnée d'une disparition progressive des cytochromes b₁ et a₁. Une source exogène de

glucose accélère leur formation, mais la source endogène est qualitativement suffisante. Le fait que la levure peut synthétiser une certaine quantité de cytochromes en absence d'une source énergétique exogène indique indiscutablement que cette synthèse peut s'effectuer aux dépens des réserves endogènes. La vitesse de la synthèse du cytochrome c chez une levure cultivée en anaérobiose et mise en présence d'oxygène, est, au début, sensiblement égale à la vitesse de synthèse de ce même cytochrome pendant la croissance exponentielle d'une levure en aérobiose. ($2.4 \cdot 10^{-5}$ mg Fe/mg N cellulaire/heure dans le tampon glucosé et 2.8 à $3.5 \cdot 10^{-5}$ mg Fe/mg N cellulaire/heure dans le milieu complet). La formation du système WARBURG-KEILIN en absence de divisions cellulaires passe par plusieurs états intermédiaires caractérisés par la constitution des cytochromes et par les activités métaboliques. Les mêmes étapes intermédiaires ne peuvent être obtenues dans le passage de l'oxygène vers l'absence d'oxygène, que s'il y a croissance active de la levure.

Lorsqu'on fait proliférer en anaérobiose *partielle* une levure possédant au départ le système complet des cytochromes, on n'observe jamais la transformation totale du spectre et on n'aboutit jamais à l'image donnée par la Fig. 1, AN. La bande b_1 , qui semble être identique à celle de la levure ayant proliféré en anaérobiose totale, se scinde à -170°C , ce qui fait apparaître la bande α du cytochrome c à $547 \text{ m}\mu$. Il n'y a donc pas eu disparition totale du cytochrome c et ceci est confirmé par les caractères métaboliques qui sont également intermédiaires.

La levure proliférante présente le même état intermédiaire si elle est examinée *peu de temps après l'établissement de l'anaérobiose totale*.

En anaérobiose complète, l'état extrême est atteint généralement pendant la phase de croissance exponentielle et persiste après l'arrêt de la culture. Il ne dépend donc pas de l'âge physiologique de la culture.

Enfin, il est évident que la perte des cytochromes qui requiert une multiplication cellulaire ne repose pas sur la sélection de mutants, car, s'il en était ainsi, on ne devrait pas observer la reconstitution du système WARBURG-KEILIN normal en absence de prolifération.

Plusieurs expériences ont été réalisées pour montrer que c'est réellement le manque d'oxygène qui est responsable de la perte des enzymes respiratoires en anaérobiose.

Nature du milieu de culture. Nous avons observé le même phénomène sur des milieux solides et liquides à base d'eau de touraillons, dans un milieu synthétique liquide (sels + β -alanine + biotine + sucre) et dans un milieu liquide complet contenant différentes concentrations de sucre (de 1 à 10%).

Influence du CO_2 . A la fin de la croissance anaérobie, la phase gazeuse de la bouteille est constituée presque uniquement par du CO_2 et on pourrait penser que ce gaz a une influence inhibitrice sur la synthèse des enzymes respiratoires. Ceci n'est pas le cas, comme le montre l'expérience suivante. Deux fioles de 1 litre sont soudées aux extrémités d'un large tube. Dans l'une on place la culture; l'autre contient une quantité de KOH concentré dix fois supérieure à la quantité de CO_2 qui peut être dégagé théoriquement. L'anaérobiose est réalisée de la façon habituelle, les fioles sont bouchées hermétiquement et agitées à l'étuve. La respiration et le spectre de la levure qui se développe dans ces conditions sont identiques à celles de la levure qui a proliféré en présence de CO_2 .

Influence du pH. On pouvait penser que l'acidité plus grande en anaérobiose était responsable de la perte des enzymes. Or, la mesure du pH au cours de l'évolution de nos cultures en aérobiose et en anaérobiose montre qu'il n'existe pas de corrélation entre le pH du milieu et la constitution des cytochromes de la levure. En anaérobiose la disparition des bandes normales se produit, selon les conditions d'ensemencement, à des pH variés. La synthèse des cytochromes en aérobiose peut se produire à ces mêmes pH.

DISCUSSION

Les variations de la constitution enzymatique de la levure qui viennent d'être décrites sont, on vient de le voir, le résultat de l'action de l'oxygène moléculaire, facteur externe, et s'effectuent à génotype constant. Des phénomènes de ce type sont à la base de l'adaptation enzymatique, qui a fait l'objet de nombreux travaux de MONOD, SPIEGELMAN, POLLOCK et leurs collaborateurs etc, au cours de ces dernières années. La définition de l'adaptation enzymatique est la suivante: une population de cellules placée en contact avec un substrat acquiert, au bout d'un certain temps, les enzymes nécessaires pour le métaboliser¹⁹. D'après MONOD²⁰ l'essentiel du phénomène est l'induction de la formation d'un apo-enzyme par le substrat spécifique. Est-ce que la synthèse des cytochromes appartient à la catégorie des synthèses adaptatives? Nous allons essayer de répondre à cette question en comparant la synthèse du système WARBURG-KEILIN avec les adaptations enzymatiques connues.

1. Nous pouvons écarter facilement les deux objections souvent faites contre la présence d'un processus d'adaptation enzymatique, à savoir: la sélection de mutants possédant les enzymes en question et l'augmentation de la perméabilité vis-à-vis du substrat. Nous sommes à l'abri de la première objection du fait que la synthèse des cytochromes peut être observée dans des cellules non-proliférantes. D'un autre côté, le fait que nous mesurons directement la quantité d'enzymes nous met à l'abri de la deuxième critique.

2. Comme cela est exigé par la définition citée de l'adaptation enzymatique, c'est, dans le cas que nous avons étudié, le substrat (O_2) qui induit la synthèse des enzymes qui déterminent la vitesse de son métabolisme. En effet, étant donné que le "turnover number" du cytochrome c à 28° C reste sensiblement constant au cours de l'expérience (1000 ± 100 une heure et demie après le commencement de l'aération, 1000 ± 100 , 1200 ± 100 , 900 ± 100 après 3, 6,5 et 10 heures respectivement), il faut admettre soit que c'est ce constituant qui est le facteur limitant la vitesse de respiration, soit que le vrai facteur limitant (par exemple la cytochrome-oxydase) est synthétisé avec la même vitesse que le cytochrome c. Il est intéressant de rappeler que, d'après WARBURG, l'oxydation du ferrocyclochrome c par la ferri-oxydase représente le chaînon le plus lent de toute la chaîne respiratoire.

3. On admet que l'action du substrat dans l'adaptation enzymatique est spécifique. Cette notion est pourtant un peu vague, car il est quelquefois difficile de distinguer la spécificité du facteur induisant la formation d'un enzyme de la spécificité de celui-ci. On connaît en tous cas plusieurs exemples où plusieurs substrats induisent la même synthèse enzymatique.

Dans quelques expériences préliminaires, nous avons essayé d'induire la synthèse des cytochromes par quelques accepteurs d' H_2 , autres que l'oxygène: le bleu de méthylène $M/300$ (E'_0 à pH 5.6 = + 66 mv), 1-naphtol-2-sulfonate-sodium-indo-2.6-dichlorophénol $M/300$ (E'_0 à pH 5.6 = + 223 mv), ferricyanure de K $M/30$ et $M/300$ (E'_0 à pH 5.6 = + 430 mv) et nitrate de K $M/30$ et $M/300$. Aucune de ces substances ne nous a donné le résultat cherché, et, avec toutes les réserves qui sont de rigueur lorsqu'il s'agit d'un résultat négatif, il semble que l'on puisse admettre que le rôle de l'oxygène est spécifique.

4. Dans les phénomènes que nous avons décrits, s'agit-il de la synthèse des enzymes proprement dits ou de la formation de cofacteurs? En ce qui concerne les cytochromes,

on évite d'habitude de les classer dans une catégorie ou dans l'autre. C'est là une question de définition. Parmi les constituants du système dont l'oxygène induit la formation, nous avons au moins un enzyme typique: la cytochrome-oxydase. Que cet enzyme est réellement synthétisé au cours de l'adaptation décrite, résulte non seulement des considérations précédentes, mais aussi des dosages directs. Les extraits obtenus à partir de levures cultivées en anaérobiose et testés *in vitro* en présence d'un excès de cytochrome c pur et d'hydroquinone ne montrent aucune activité. Les mêmes préparations extraites des cellules ayant proliféré en aérobiose contiennent une cytochrome-oxydase très active.

On peut donc, à notre avis, considérer la formation des enzymes respiratoires comme une synthèse adaptative. Elle diffère toutefois, des adaptations précédemment décrites par une caractéristique importante.

Toutes les courbes expérimentales des adaptations enzymatiques connues indiquent que ces phénomènes présentent la cinétique des réactions autocatalytiques où la vitesse s'accroît pendant un certain temps (*cf.* MONOD²⁰). Cette constatation était en particulier à la base du rejet par SPIEGELMAN¹⁹ de l'hypothèse de YUDKIN²¹ selon laquelle le substrat déplace l'équilibre entre l'enzyme et son précurseur suivant la loi de l'action des masses.

Or cette hypothèse ou des hypothèses analogues, où le substrat stabilise l'enzyme, conduisent, comme l'a montré SPIEGELMAN (*l.c.*) à une cinétique du type des réactions chimiques du premier ordre, où la vitesse diminue avec le temps. La Fig. 2 donne la courbe de l'augmentation avec le temps du cytochrome c chez une levure cultivée en anaérobiose et aérée en présence de glucose. La courbe qui décrit l'accroissement de la capacité respiratoire a une forme tout à fait analogue. Ces courbes affectent la forme d'hyperboles à asymptotes horizontales plutôt que celle des courbes autocatalytiques en S. Sur la Fig. 2, est tracée en pointillés, la courbe théorique (en admettant la formule correspondant à l'hypothèse de YUDKIN $E = \bar{p} (1 - e^{-kt})$ ou $k = 0.45$). On voit que les courbes expérimentale et théorique sont en très bon accord. Rien dans nos expériences ne s'oppose donc à ce que l'on conçoive la synthèse du cytochrome c comme s'effectuant selon le mécanisme proposé par YUDKIN.

M. MONOD vient de nous communiquer les résultats d'une étude non encore publiée* sur la cinétique de la formation adaptative de la lactase chez *B. coli*. Ces résultats l'amènent à une conclusion similaire à la nôtre.

Il est curieux de constater que l'on s'attendait à ce que les synthèses adaptatives suivent une loi logistique parce que l'on admettait l'accroissement autocatalytique de l'enzyme intéressé et que nous trouvons une augmentation suivant une cinétique des réactions du premier ordre pour une

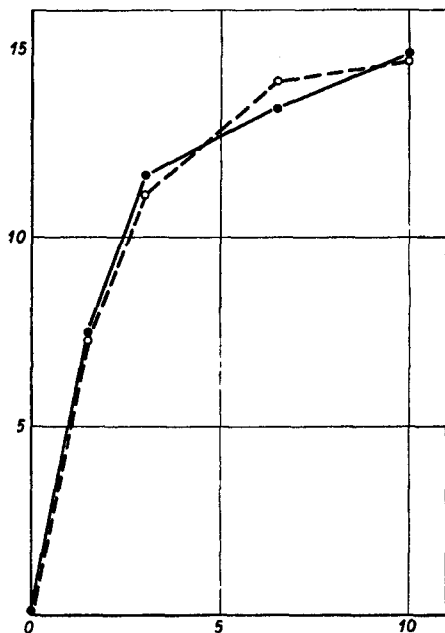


Fig. 2. Accroissement de la teneur en cytochrome c pendant l'aération d'une levure cultivée en anaérobiose. En ordonnée: atomes-grammes de Fe du cytochrome c $\cdot 10^{-10}$ par cellule. En abscisse: heures. Courbe expérimentale en trait plein; courbe théorique en pointillé

* MONOD, TORRIANI ET DOUDOROFF, *Ann. Inst. Pasteur*, sous presse.

synthèse dont le déterminisme comporte précisément l'intervention de particules autoreproductibles. Il a été montré en effet que la cytochrome-oxydase ne se forme qu'en présence d'un facteur cytoplasmique autoreproductible²².

Que ce fait n'affecte pas l'allure de l'adaptation à l'oxygène doit être attribué à ce que celle-ci se produit dans des cellules qui possèdent déjà le facteur cytoplasmique en question. Il en ressort que les faits sur lesquels cet argument est fondé renforcent la thèse de la non-identité de la cytochrome-oxydase et du facteur autoreproductible.

5. Envisageons enfin brièvement ce que l'étude ci-dessus apporte à la connaissance de la synthèse des cytochromes du point de vue chimique.

Le blocage de la synthèse des cytochromes normaux par le manque d'oxygène semble devoir porter sur un (ou plusieurs) des derniers chaînons de cette synthèse, car les cellules ayant proliféré en anaérobiose possèdent une réserve suffisante de protohème sous forme non-différenciée ($20 \cdot 10^{-19}$ molécules-grammes de Fe par cellule) pour en faire les deux cytochromes principaux c et b ($11 \cdot 10^{-19}$ et environ $7 \cdot 10^{-19}$ molécules-grammes de Fe par cellule chez la levure formée en aérobiose). Il est généralement admis^{12, 23} que le cytochrome b possède comme groupement prosthétique, le protohème. S'il en est ainsi, le manque d'oxygène a pour effet la suppression de la synthèse de la protéine spécifique du cytochrome b ou la suppression de la possibilité de liaison entre la protéine spécifique b et le groupement prosthétique qui, comme on vient de le voir, est synthétisé en anaérobiose. Pour le cytochrome c, la situation est plus complexe, car son groupement prosthétique est ancré dans la protéine d'une façon très particulière, par des liaisons du type thioether, entre la cystéine de la protéine et les chaînes vinyle du protohème. Il est cependant vraisemblable que la synthèse du groupement prosthétique c s'effectue à partir du protohème¹². Si nous admettons ce point de vue, l'anaérobiose aurait le même effet que pour le cytochrome b: la suppression de la synthèse de la protéine ou la suppression de la liaison protohème-protéine c.

La classification et la nomenclature des hémochromogènes natifs dont la bande α à l'état réduit est située dans la région entre 550 et 563 $m\mu$ sont un peu confuses. On a pris l'habitude de désigner une large bande se trouvant dans cette région par le terme cytochrome b_1 . Or, le terme b_1 peut correspondre à des constituants qui sont différents même au point de vue spectroscopique. Pour ne citer que quelques exemples: chez certaines levures de bière ou chez des levures de boulangerie ayant proliféré en anaérobiose partielle, la large bande aux environs de 558 $m\mu$ se décompose aux basses températures en deux bandes dont une est la bande thermostable αc typique. Chez *E. coli*²⁴ la bande située à 560 $m\mu$ se scinde à -170° en donnant deux bandes d'intensité inégale à 551 et 559 $m\mu$. Chez *Cecropia* une bande analogue (milieu à 557 $m\mu$) ne se scinde pas à la température de l'air liquide, mais se déplace à 554 $m\mu$ ²⁵.

La large bande à 557-559 $m\mu$ de la levure cultivée en anaérobiose ne se scinde pas à -170° et se déplace à 554 $m\mu$. Elle ne comporte pas le constituant αc , est thermolabile et correspond vraisemblablement à un composé dont le groupement prosthétique est le protohème. Etant donné qu'elle disparaît au fur et à mesure de la formation des cytochromes b et c, il est tentant de considérer cette bande comme précurseur de b et c. La relation peut être en réalité plus complexe. Par exemple, ils peuvent dériver d'un précurseur commun. La situation est peut-être analogue pour les cytochromes a_1 et a.

La bande visible à -170° et située à 555 $m\mu$ pourrait être due au précurseur immédiat du cytochrome c, s'intercalant entre b_1 et le c, car elle disparaît au fur et à mesure de la synthèse du cytochrome c, est thermostable (caractère rencontré jusqu'à présent uniquement dans le cas du cytochrome c) et, dans certaines conditions, on peut

voir son apparition avant le début de la formation du cytochrome c. Il est par ailleurs possible que cette bande soit identique au cytochrome e récemment décrit par KEILIN ET HARTREE¹⁴ qui occupe à 1 ou 2 m μ près la même position; ou bien qu'elle est due à un hémochromogène artificiel résultant de l'union d'une protéine dénaturée par la chaleur avec l'hème b₁. La seule donnée que nous avons pour l'instant concernant cette nouvelle bande est qu'elle ne correspond pas au cytochrome b₂ de BACH, DIXON ET ZERFAS²⁶ qui occupe lui aussi une position proche, car l'activité de la lactico-déshydrogène est absente chez la levure ayant proliféré en anaérobiose.

ADDENDUM

Au moment de la rédaction de ce mémoire, est parue une note préliminaire de C. H. CHIN²⁷ qui relate des résultats sur la plupart des points similaires à ceux que nous avons décrits plus haut. La seule différence essentielle entre les résultats qu'il a obtenu sur une levure de brasserie et les nôtres, réside dans le fait que la bande b₁ observée par lui se scinde à — 170° en donnant en particulier la bande ac.

Il nous paraît probable que cette différence dans les résultats est due à ce que M. CHIN n'a pas pris de précautions spéciales afin d'assurer l'anaérobiose stricte des cultures pendant leur prolifération. En effet, les propriétés de la bande b₁ qu'il trouve correspondent à celles que nous trouvons chez des levures proliférant en anaérobiose partielle ou bien chez des levures ayant proliféré en anaérobiose stricte et aérées pendant 2 heures. La justesse de cette interprétation est rendue vraisemblable par le fait que le QO₂ des levures de M. CHIN est élevé dès le début des expériences d'aération.

RÉSUMÉ

1. La levure de boulangerie qui a proliféré pendant un temps relativement court en absence d'oxygène perd le pouvoir de respirer le sucre, mais conserve le pouvoir fermentaire. Elle perd en même temps les cytochromes a, b et c, et acquiert des constituants nouveaux, analogues aux cytochromes a₁ et b₁.
2. Chez une telle levure, la synthèse des cytochromes normaux peut être induite par l'oxygène. Elle peut s'effectuer sans multiplication cellulaire et est accompagnée par la disparition des constituants a₁ et b₁. Elle conduit au rétablissement de la capacité respiratoire de la levure.
3. Le mécanisme de la synthèse adaptative des cytochromes est discuté.

SUMMARY

1. Baker's yeast, grown for a relatively short time in the absence of oxygen, cannot utilize glucose by respiratory mechanisms, but keeps its fermentative ability intact. At the same time it loses the cytochromes a, b and c, and acquires two new components analogous to cytochromes a₁ and b₁.
2. The synthesis of the normal cytochromes can be induced in such a yeast by oxygen in the absence of cell multiplication. Synthesis is accompanied by the disappearance of the new cytochrome components and results in the reestablishment of the ability to respire.
3. The mechanism of the adaptive synthesis of the cytochromes is discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bäckerhefe die einiger Zeit unter Ausschluss von Sauerstoff gewachsen ist, verliert die Fähigkeit Zucker für ihre Atmung zu verwerten, nicht aber ihn zu vergären. Gleichzeitig verschwinden Cytochrom a, b und c und zwei neue Bestandteile, analog dem Cytochrom a₁ und b₁, treten auf.

Bibliographie p. 267.

2. Bei einer solchen Hefe kann die normale Cytochromsynthese durch Sauerstoff in Gang gebracht werden. Sie kann ohne Zellteilung geschehen und ist von dem Verschwinden der Bestandteile a_1 und b_1 begleitet. Hierbei wird die Atmungsfähigkeit der Hefe wiederhergestellt.
3. Der Mechanismus der Anpassung der Cytochromsynthese wird erörtert.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. STEPHENSON, *Bacterial Metabolism*, London (1949) Longmans, Green and Co.
- ² B. EPHRUSSI ET P. SLONIMSKI, *Compt. rend.*, 230 (1950) 685.
- ³ O. WARBURG, *Biochem. Z.*, 189 (1927) 350.
- ⁴ P. BERAUD, *Ann. fermentations*, 5 (1939-40) 108.
- ⁵ H. FINK, *Z. Physiol. Chem.*, 210 (1932) 197.
- ⁶ H. VON EULER, H. HELLSTROM ET G. GÜNTHER, *Z. Physiol. Chem.*, 258 (1939) 47.
- ⁷ H. BOREI ET A. SJÖDEN, *Ark. Kemi, Miner., Geolog.*, 16 (1943) 1.
- ⁸ H. FINK ET E. BERWALD, *Biochem. Z.*, 258 (1933) 141.
- ⁹ B. EPHRUSSI, H. HOTTINGUER ET A. M. CHIMENES, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 351.
- ¹⁰ K. A. C. ELLIOT ET D. KEILIN, *Proc. Roy. Soc. B*, 114 (1934) 210.
- ¹¹ W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS ET J. F. STAUFFER, *Manometric techniques*, etc., Burgess Publ. Co. Minneapolis, (1945).
- ¹² R. LEMBERG ET J. W. LEGGE, *Hematin compounds and bile pigments*. Interscience Publ. (1949).
- ¹³ D. KEILIN, *Proceed. Roy. Soc. Biol.*, 98 (1925) 312.
- ¹⁴ D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Nature*, 164 (1949) 254.
- ¹⁵ J. DE LEY, *Verhand. Koninkl. Vlaam. Acad. Geneesk. v. Belgie*, XI (1949) No. 3.
- ¹⁶ T. J. STIER, *Cold Spring Harbor Symp.*, 7 (1939) 385.
- ¹⁷ P. SLONIMSKI, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 510.
- ¹⁸ S. D. WAINWRIGHT ET M. R. POLLOCK, *Brit. J. Exptl Path.*, 30 (1949) 190.
- ¹⁹ S. SPIEGELMAN, *Symp. Soc. Exptl Biol.*, II (1948) 286.
- ²⁰ J. MONOD, *Growth Symp.*, 11 (1947) 223.
- ²¹ J. YUDKIN, *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, 13 (1938) 93.
- ²² B. EPHRUSSI, H. HOTTINGUER ET J. TAVLITZKI, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 419.
- ²³ A. M. PAPPENHEIMER ET E. D. HENDEE, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 609.
- ²⁴ D. KEILIN ET C. H. HARPLEY, *Biochem. J.*, 35 (1941) 688.
- ²⁵ R. C. SANBORN, ET C. M. WILLIAMS, *J. Gen. Physiol.*, 33 (1950) 579.
- ²⁶ S. J. BACH, M. DIXON ET L. ZERFAS, *Biochem. J.*, 40 (1946) 229.
- ²⁷ C. H. CHIN, *Nature*, 165 (1950) 926.

Reçu le 13 juillet 1950