

FORMATION DE CATALASE INDUITE PAR L'OXYGÈNE CHEZ LA LEVURE

par

H. CHANTRENNE ET C. COURTOIS

*Laboratoire de chimie biologique de la Faculté des Sciences,
Université libre de Bruxelles (Belgique)*

Les recherches d'EPHRUSSI et de SLONIMSKI^{1, 2, 3} ont établi clairement que la formation des cytochromes, de la cytochrome oxydase, de plusieurs déshydrogénases et d'une cytochrome réductase est induite par l'oxygène chez la levure de boulangerie.

Les expériences que nous rapportons ci-dessous montrent qu'il en est de même pour la catalase.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Levure. Saccharomyces cerevisiae isolée d'une levure de boulangerie commerciale (Levure Royale, Nederlandse Gistfabriek).

Culture. En milieu liquide contenant, par litre, 50 g de glucose, 1.43 g de sulfate de magnésium, 0.53 g de chlorure de sodium, 1.0 g de phosphate monopotassique 1.2 g de sulfate d'ammonium, 1 ml d'une solution à 0.5 % de chlorure ferrique et 20 ml d'eau de levure.

Pour la culture des levure en anaérobiose, un litre de milieu estensemencé avec 5 ml d'une culture de 24 heures; le ballon est rempli jusqu'en haut du col et fermé par un petit couvercle de verre; il est mis à incuber 24 heures à 28–30°.

Aération. La levure est récoltée, lavée trois fois avec de l'eau distillée, et remise en suspension dans une solution contenant, par litre, 40 g de glucose, 0.2 g de sulfate de magnésium et 0.45 g de phosphate monopotassique. La concentration en levure de la suspension est déterminée par mesure de son opacité, et ajustée à 2.5 à 3 mg par ml. Cette suspension est ensuite répartie en portions de 30 ml dans des boîtes de Roux d'un litre qu'on dispose horizontalement sur un plateau animé d'un mouvement pendulaire (une oscillation par seconde, de 5 cm d'amplitude) dans une étuve à 28–30°.

Préparation des extraits. La levure, recueillie par centrifugation, est lavée deux fois avec de l'eau distillée; le culot est transféré dans un petit mortier et broyé avec du sable. La pâte obtenue est épuisée par 10 ml de tampon de phosphate de potassium 0.02 M de pH 7.0 et le liquide est centrifugé 15 minutes à 10,000 g. Toutes ces opérations sont effectuées à 5°.

Le liquide surnageant constitue l'extrait dans lequel l'activité catalasique est mesurée.

Mesure de l'activité catalasique. Méthode de VON EULER ET JOSEPHSON⁴. L'activité catalasique est exprimée selon ces auteurs (Katalase Fähigkeit) et rapportée au poids de protéines.

Dosage des protéines. Méthode colorimétrique de LOWRY *et al.*⁵ pour les expériences d'orientation. Méthode de KJELDHAL pour les expériences de contrôle.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Formation de catalase pendant l'aération

L'activité catalasique des extraits d'une levure cultivée 20 ou 30 heures à 30° en anaérobiose est très faible: elle se situe généralement entre 0.1 et 0.3 unités von Euler.

Bibliographie p. 400.

L'aération fait apparaître rapidement une activité catalasique beaucoup plus élevée: les extraits de levure aérée pendant 4 heures en milieu glucosé peuvent titrer jusqu'à 10 unités. L'activité catalasique peut être multipliée en 4 heures par un facteur allant de 20 à 90 selon les expériences. D'une façon générale, les cultures plus jeunes (20 h répondent mieux que les vieilles (30 h).

La Fig. 1 représente l'activité d'extraits de levure recueillie après des temps d'aération différents. Dans les conditions adoptées, l'activité s'accroît pendant au moins 10 heures avant d'atteindre un plateau; l'activité s'accroît rapidement dès le début, comme dans le cas de la formation induite du cytochrome $c^{1,2}$.

Action de l'hydroxylamine et de l'azoture sur l'activité catalasique des extraits

L'activité catalasique induite est thermolabile: elle est détruite à 100° en moins de 3 minutes.

Afin de savoir si l'enzyme responsable de la destruction de l'eau oxygénée dans les extraits est bien la catalase, nous avons étudié l'action de deux inhibiteurs typiques de la catalase, l'hydroxylamine et l'azoture de sodium sur cette activité d'un extrait de levure aérée.

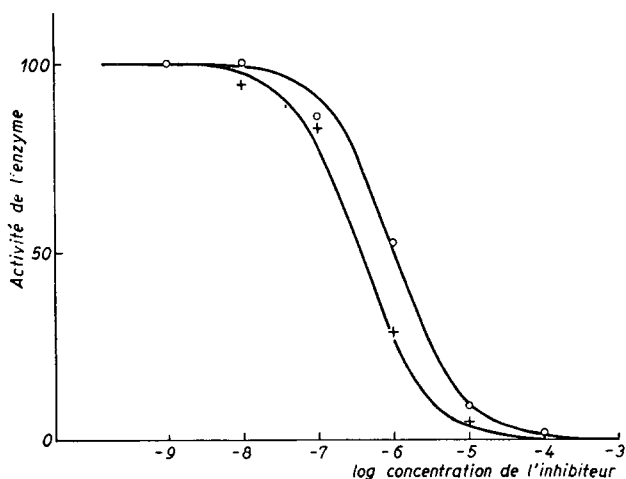


Fig. 2. Inhibition de la catalase par diverses concentrations d'hydroxylamine et d'azoture de sodium. L'activité est exprimée en pourcents de l'activité de l'enzyme en l'absence d'inhibiteur. +: hydroxylamine; O: azoture de sodium. Courbes calculées pour les valeurs $2.8 \cdot 10^{-7}$ et $1.1 \cdot 10^{-6}$ de la constante de dissociation apparente.

Bibliographie p. 400.

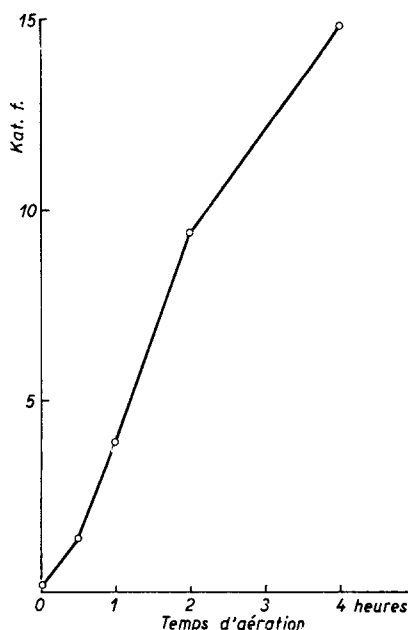


Fig. 1. Formation de catalase au cours de l'aération d'une levure cultivée en anaérobiose. Activité catalasique des extraits en fonction de la durée d'aération de la levure en milieu glucosé exempt d'azote assimilable.

La figure 2 dans laquelle les résultats de cette étude ont été rassemblés montre que l'activité catalasique est réduite de moitié par l'hydroxylamine $2.8 \cdot 10^{-7} M$ ou par l'azoture $1.1 \cdot 10^{-6} M$ et qu'elle est complètement abolie lorsque la concentration de ces agents atteint $10^{-4} M$.

BROWN⁶, qui a purifié la catalase de la levure et étudié certaines de ses propriétés avait également observé la demi-inhibition de l'enzyme par l'azoture de sodium à une concentration voisine de $1.4 \cdot 10^{-6} M$. Nous pouvons donc supposer que l'enzyme dont nous étudions la formation induite n'est autre que la catalase décrite par BROWN⁶.

Notons toutefois que le chlorodinitrophénol, qui inhibe la catalase du foie⁷, est sans action sur l'activité que nous étudions.

Action de la phénylalanine et de la p-fluorophénylalanine sur la formation induite de la catalase

Afin d'établir si la formation induite de catalase repose sur une synthèse de protéines, nous avons étudié l'effet de la *p*-fluorophénylalanine. Des expériences dont les résultats sont rassemblés dans le Tableau I, il ressort que la DL-*p*-fluorophénylalanine inhibe fortement la formation induite de catalase. On remarquera que cette inhibition n'est levée par la phénylalanine que si le milieu contient une source d'azote utilisable par la levure. Dans le milieu glucosé sans source d'azote, la L-phénylalanine bien loin de lever l'inhibition causée par la fluorophénylalanine, entrave elle-même la formation de l'enzyme; l'inhibition se manifeste déjà pour une concentration de 10^{-3} M de la L-phénylalanine.

TABLEAU I

	Catalase induite (%)			
	Milieu sans sels d'ammonium		Milieu complet	
	10^{-2} M	$1,5 \cdot 10^{-3}$ M	$5 \cdot 10^{-3}$ M	$1,5 \cdot 10^{-3}$ M
Sans addition	100	100	100	100
+ DL- <i>p</i> -fluorophénylalanine	14	22	15	68
+ DL- <i>p</i> -fluorophénylalanine et L-phénylalanine	13	17	55	122
+ L-phénylalanine	15	43	116	148

Aération: 4 heures à 30°.

Les chiffres en tête des colonnes indiquent la concentration finale de l'isomère l de chacun des acides aminés présents dans le milieu d'aération. La concentration en fluorophénylalanine racémique est donc le double du chiffre indiqué.

Il apparaît en tous cas que la fluorophénylalanine, qui empêche l'utilisation des acides aminés pour la synthèse des protéines chez la levure⁸ inhibe la formation induite de la catalase et que, dans certaines conditions, cette inhibition peut être levée par la L-phénylalanine. Il est donc très probable que la formation induite de catalase repose sur une synthèse de protéine à partir des acides aminés libres.

Le mécanisme de l'inhibition par la L-phénylalanine en l'absence de source d'azote utilisable par la levure est à l'étude en ce moment; il fera l'objet d'une publication ultérieure.

Formation induite de catalase dans le mutant petite colonie

EPHRUSSI ET SLONIMSKI^{1, 2, 3} ont montré que le mutant "petite colonie" est incapable de former une série d'enzymes respiratoires qui se rencontrent dans les extraits de levure normale en association avec des particules sédimentables dans une centrifugeuse rapide. Le mutant conserve au contraire la capacité de former les enzymes solubles.

Les résultats que nous avons obtenus pour la catalase concordent parfaitement avec cette règle: la catalase, qui est en solution dans les extraits de levure⁹, se forme en effet aussi bien dans le mutant que dans la levure normale. (Activité: au temps zéro 0.17; après 6 h. d'aération: 3.41). La catalase du mutant manifeste la même sensibilité vis à vis de l'hydroxylamine et de l'azoture que celle des levures normales.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Il convient d'ajouter la catalase à la liste des enzymes qui se forment dans la levure sous l'effet de l'aération^{1, 2, 3}.

Il est peu probable que la catalase soit induite directement par l'oxygène; l'inducteur réel est sans doute l'eau oxygénée qui se forme dans les cellules mises au contact de l'air^{10, 11}. CHANCE¹² a en effet pu observer in vivo la formation du complexe catalase-eau oxygénée chez *M. lysodeikticus* en milieu aéré, et sa disparition lorsque l'oxygène du milieu est épuisé; le même auteur a pu déterminer en outre la concentration de l'eau oxygénée à l'état de régime dans ces microbes maintenus en milieu bien aéré. Il est établi d'autre part que de l'eau oxygénée ajoutée au milieu de culture peut induire la formation de catalase chez *Aspergillus niger*¹³ et chez certaines algues vertes^{14, 15}. Nous pouvons donc supposer que dans nos expériences d'aération l'inducteur direct de la catalase est son substrat, l'eau oxygénée, qui se forme par la réaction de l'oxygène de l'air avec les systèmes réducteurs de la cellule.

Si ce phénomène d'induction de la catalase est général, il permet de mieux comprendre la présence de catalase dans presque toutes les cellules aérobies.

Nous remercions vivement M. EPHRUSSI, qui nous a très aimablement donné une souche du mutant petite colonie.

RÉSUMÉ

La levure de boulangerie cultivée en anaérobiose ne contient que très peu de catalase; cet enzyme se forme au cours de l'aération de la levure.

La *p*-fluoro-phénylalanine inhibe fortement la formation induite de catalase.

L'oxygène induit la formation de catalase chez le mutant "petite colonie" comme chez la levure normale.

SUMMARY

When grown anaerobically, baker's yeast is found to contain very little catalase, but this enzyme forms when the yeast is aerated.

The induced formation of catalase is inhibited by *p*-fluorophenylalanine.

Oxygen induces catalase formation in the "petite" mutant as well as in the normal strain.

ZUSAMMENFASSUNG

Anaerob kultivierte Bäckerhefe enthält nur sehr wenig Katalase, doch bildet sich dieses Enzym bei Belüftung der Hefe.

Solche induzierte Katalase-Bildung wird stark durch *p*-Fluoro-phenylalanin gehemmt.

Sauerstoff führt ebenso zur Bildung von Katalase bei der Mutante "kleine Kolonie" wie bei der normalen Hefe.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ B. EPHRUSSI ET P. SLONIMSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 256.
- ² P. SLONIMSKI, *La formation des enzymes respiratoires chez la levure*, Masson Paris 1953.
- ³ P. SLONIMSKI, *Symposium on Adaptation in Microorganisms* (1953); Third Symposium of the Soc. Gen. Microbiology, p. 78-97. The University Press, Cambridge.
- ⁴ H. VON EULER ET K. JOSEPHSON, *Liebigs Ann. Chem.*, 455 (1927) 1.
- ⁵ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- ⁶ G. L. BROWN, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 435.
- ⁷ P. L. GOLDACRE ET A. W. GALSTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 43 (1953) 169.
- ⁸ H. O. HALVORSON ET S. SPIEGELMAN, *J. Bact.*, 64 (1952) 207.
- ⁹ H. CHANTRENNE, *Enzymologia*, 11 (1943) 213.
- ¹⁰ J. W. MCLEOD, J. GORDON ET L. N. PYRAH, *J. Path. Bact.*, 26 (1923) 127.
- ¹¹ O. T. AVERY ET J. M. NEILL, *J. Exp. Med.*, 39 (1924) 347.
- ¹² B. CHANCE, *Science*, 116 (1952) 202.
- ¹³ G. S. KITAVIN, *Biochimya*, 17 (1952) 336.
- ¹⁴ L. R. BLINKS, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 39, Suppl. 2 (1952) 11.
- ¹⁵ J. BRACHET ET H. CHANTRENNE, *Arch. int. Physiol.*, 61 (1953) 248.

Reçu le 19 mars 1954