

PEROXYDASES INDUITES PAR L'OXYGÈNE CHEZ LA LEVURE

par

H. CHANTRENNE

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences
Université de Bruxelles (Belgique)*

Nous avons signalé dans une note brève¹ que des peroxydases, et notamment la cytochrome peroxydase, apparaissent chez la levure sous l'action de l'air dans les mêmes conditions que les systèmes des cytochromes^{2,3} et la catalase⁴. La présente communication donne le détail des expériences.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches de levures

Levure normale: *Saccharomyces cerevisiae* isolée d'une levure de boulangerie commerciale (Levure Royale – Nederlandse Gist Fabriek).

Mutant "Petites colonies"¹⁵ diploïde provenant du laboratoire du Prof. B. EPHRUSI.

Culture, aération, préparation des extraits et dosage des protéines: voir publication antérieure⁴.

Préparation des autolysats. La levure récoltée par centrifugation est lavée deux fois avec de l'eau distillée, puis étalée sur une feuille de papier filtre et laissée 24 heures à la température du laboratoire. La levure ainsi séchée est finement broyée dans un petit mortier et mise en suspension dans trois fois son volume d'eau distillée; après addition de quelques gouttes de toluène, la suspension est mise à incuber 24 heures à 25°. La suspension est ensuite centrifugée et le surnageant clair dialysé à 4° pendant 4 heures contre de l'eau distillée.

Réduction du cytochrome c

Nous avons constaté qu'il est facile de réduire le cytochrome *c* à l'aide d'une résine réductrice. Cette nouvelle méthode présente le grand avantage de n'introduire aucune substance parasite dans la solution de cytochrome; elle est aussi très simple et rapide. Les solutions de cytochrome *c* réduit de cette façon ne contiennent pas d'eau oxygénée ni de peroxydes capables d'oxyder le cytochrome *c* en présence de la cytochrome peroxydase de la levure.

Procédé. Quelques grammes de la résine Duolite-S 10 (Chemical Process Company, Redwood City, California) sont lavés abondamment à l'eau et débarrassés de toute substance soluble. La résine est alors réduite à l'aide d'une solution à 10% d'hydrosulfite $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ dans la soude caustique à 2,5%, puis lavée rapidement à l'eau distillée et transférée dans un tube de 1 cm de diamètre, de façon à former une colonne de résine de 6 cm de haut. Celle-ci est lavée abondamment avec de l'eau distillée bouillie, jusqu'à élimination complète de l'hydrosulfite. La résine réduite est brun-rouge, elle se conserve pendant des mois à l'état réduit si la colonne est complètement remplie d'eau et bouchée aux deux extrémités.

25 mg de cytochrome *c* de cœur de cheval sont dissous dans 10 ml de tampon de phosphate 0,02 M pH 7,2 et la solution est versée sur la colonne de résine; la vitesse d'écoulement est réglée à 20 gouttes par minute environ. Le cytochrome qui sort de la colonne est réduit à 90-95%. La solution de cytochrome réduit se conserve à l'état congelé sans se réoxyder, pendant plusieurs mois. La colonne peut être utilisée de nombreuses fois sans qu'il soit nécessaire de la réduire.

Le cytochrome utilisé dans nos expériences était un produit commercial "Sigma".

Dosage de la cytochrome peroxydase

Dans les autolysats, qui ne contiennent pas de cytochrome oxydase, la peroxydase du cytochrome a été dosée selon ABRAMS *et al.*⁶ à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman muni d'un diaphragme permettant d'effectuer les mesures sur 1 ml de solution. La température du compartiment des cuvettes était maintenue à 25° par circulation de l'eau d'un thermostat.

La solution de cytochrome *c* réduit selon la méthode décrite plus haut ne contient pas de peroxydases, et aucune oxydation du cytochrome *c* n'est observée en présence de peroxydase avant l'addition d'eau oxygénée ou d'un hydroperoxyde. La réaction est donc déclenchée par l'addition au mélange de cytochrome réduit et d'enzyme, d'assez d'eau oxygénée pour atteindre une concentration finale de $5 \cdot 10^{-6} M$; cela représente un grand excès par rapport au cytochrome *c*, mais aucune oxydation de ce dernier ne se produit en l'absence d'enzyme.

Dans les extraits, qui peuvent contenir de la cytochrome oxydase, on ajoute de l'azoture de sodium (concentration finale $5 \cdot 10^{-3} M$) au mélange d'enzyme et de cytochrome réduit. A cette concentration, la cytochrome oxydase est complètement inhibée, tandis que l'activité de la cytochrome peroxydase n'est réduite que de 15 % environ. De l'hydroperoxyde d'éthyle (concentration finale $2 \cdot 10^{-4} M$) est utilisé comme oxydant à la place de l'eau oxygénée. En présence d'une même concentration d'enzyme, la vitesse d'oxydation du cytochrome *c* par l'hydroperoxyde d'éthyle n'atteint guère que 25 % de celle que l'on observe avec l'eau oxygénée.

Soulignons enfin qu'il est indispensable de rechercher au préalable si l'autolysat ou l'extrait réduisent le cytochrome oxydé. Lorsque cette réduction est très lente, le chiffre de l'activité de la cytochrome oxydase ou de la peroxydase peut être corrigé en tenant compte de la vitesse de réduction du cytochrome par la préparation enzymatique. Si la réduction est trop rapide, l'enzyme doit être soumis à une dialyse prolongée.

L'hydroperoxyde d'éthyle a été préparé selon BAYER ET VILLIGER⁷ et la concentration des solutions déterminée par des mesures photométriques à 225 et 250 $m\mu$, en utilisant les données numériques de RIECHE⁸.

Dosage de la cytochrome oxydase

Le procédé est le même que pour le dosage de la peroxydase du cytochrome, à celà près qu'on n'ajoute pas de peroxyde; l'oxygène dissous suffit à oxyder tout le cytochrome présent. Pour mesurer la vitesse de réduction du cytochrome par la préparation enzymatique, on inhibe la cytochrome oxydase par l'azoture de sodium $5 \cdot 10^{-3} M$.

Détection de peroxydases par la benzidine

A la préparation d'enzymes on ajoute de l'eau oxygénée (concentration finale $10^{-4} M$), puis 1/50 du volume d'une solution à 5 % de benzidine dans l'acide acétique concentré. En présence de peroxydase, une coloration bleue se développe en quelques minutes.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les extraits de levure de boulangerie contiennent une peroxydase capable de catalyser l'oxydation de la benzidine par l'eau oxygénée. Cet enzyme est lié à des particules qui s'isolent facilement des extraits par centrifugation de ceux-ci à grande vitesse⁹.

Les particules isolées d'une levure normale cultivée pendant 24 heures en anaérobiose sont presque totalement dépourvues de peroxydase, mais celle-ci apparaît rapidement au cours de l'aération: les particules d'une levure aérée 15 minutes manifestent déjà une réaction peroxydasique nette, qui devient très intense dans la levure aérée une, deux ou trois heures.

Toutefois, si la réaction peroxydasique est effectuée sur la suspension de levure et non sur les granules isolés, elle est d'abord négative, devient très franche dans la levure aérée 30 minutes, atteint son intensité maximale pour une aération de 45 à 60 minutes, et s'affaiblit rapidement pour disparaître complètement dans la levure aérée 2 heures et plus. Il est donc vraisemblable que, dans les cellules intactes, la réaction peut être facilement masquée par la réduction du bleu de benzidine; il est en effet souvent difficile de mettre en évidence les peroxydases des levures intactes, surtout si les cellules sont chargées de glucides.

L'aération fait donc apparaître dans la levure normale une peroxydase de la benzidine, en même temps que toute une série d'enzymes respiratoires, de transporteurs d'électrons, et que la catalase.

Dans les particules isolées du mutant "petites colonies" d'EPHRUSSI, nous n'avons pas pu mettre en évidence de propriétés peroxydasiques, même lorsque ces levures avaient été aérées pendant plusieurs heures. Il semble donc que le mutant "petites colonies" soit incapable de former les peroxydases qui se trouvent associées à des particules sédimentables dans les extraits de levure normale.

Formation de cytochrome peroxydase pendant l'aération

La levure cultivée pendant 24 heures à 30° en anaérobiose est très pauvre en cytochrome peroxydase, mais il suffit de l'aérer pendant quelques heures en milieu glucosé pour provoquer la formation de quantités considérables de cet enzyme. Ces faits

peuvent être constatés facilement en observant à l'aide d'un spectroscope à faible dispersion la disparition de la bande de 550 m μ du cytochrome réduit, lorsqu'on ajoute quelques gouttes d'un autolysat de levure à une solution de cytochrome réduit contenant de l'eau oxygénée 10⁻⁶ M. Nous avons effectué de nombreuses fois cette expérience tant avec une souche normale de levure qu'avec le mutant "petites colonies". Dans tous les cas sans exception, nous avons pu observer qu'après 4 ou 6 heures d'aération, l'activité de la

cytochrome peroxydase était multipliée par un facteur de l'ordre de 50 à 100.

La détermination précise de l'activité de la cytochrome peroxydase, telle qu'on peut l'effectuer à l'aide d'un spectrophotomètre, est rendue difficile par la présence dans les autolysats de levure de systèmes qui réduisent le cytochrome *c*; en général, l'activité de ceux-ci peut être diminuée dans une large mesure par une dialyse prolongée qui n'affecte guère la peroxydase du cytochrome; dans plusieurs cas cependant, l'activité réductrice est restée trop grande pour que des mesures précises de l'activité de la peroxydase pussent être effectuées. Les chiffres rassemblés dans la Table I, qui ont été obtenus dans d'excellentes conditions, montrent clairement que la peroxydase du cytochrome augmente massivement au cours de l'aération, tant chez le mutant "petites colonies" que chez la levure normale.

Etat de la cytochrome peroxydase dans les extraits

Nous avons noté plus haut que la peroxydase qui catalyse l'oxydation de la benzidine est associée à des particules sédimentables dans une centrifugeuse rapide. La peroxydase du cytochrome au contraire se trouve en solution dans les extraits: en effet, une centrifugation de 15 minutes à 100.000 g élimine complètement la cytochrome oxydase et la peroxydase de la benzidine, sans réduire l'activité de la cytochrome peroxydase. Les particules lavées sont dépourvues de cytochrome peroxydase (Table II).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La peroxydase du cytochrome *c* et une peroxydase de la benzidine sont induites par l'oxygène chez la levure dans les mêmes conditions que les enzymes du système

TABLE II

ETAT DE LA CYTOCHROME OXYDASE ET DE LA CYTOCHROME PEROXYDASE DANS LES EXTRAITS

Les chiffres représentent la valeur, multipliée par 1000 de la constante de vitesse $k = 1/t \log_{10} (Cyt^{++})_0/(Cyt^{++})_t$ de l'oxydation du cytochrome *c*, le temps étant exprimé en minutes. Méthode décrite plus haut. Conditions expérimentales: Tampon de phosphate de K 0.02 *M*, pH 7.0. Cytochrome *c* réduit donnant au temps *O* une extinction voisine de l'unité à 550 μm . 0.1 ml d'extrait enzymatique. Volume total 1 ml.

		Extrait total dialysé	Surnageant dialysé	Pourcentage de l'activité totale dans le surnageant
Levure pressée commerciale	Cyt. Oxydase	1500	31	2 %
	Cyt. Peroxydase	85	80	94
	Cyt. Oxydase	1075	36	3
	Cyt. Peroxydase	205	190	93
Levure normale cultivée en anaérobiose puis aérée 15 h	Cyt. Oxydase	210	0	0
	Cyt. Peroxydase	116	120	103
Levure "Petites colonies" cultivée en anaérobiose puis aérée 6 h	Cyt. Oxydase	0	0	—
	Cyt. Peroxydase	240	260	108
		Particules lavées*		Surnageant dialysé
Levure pressée commerciale	Cyt. Oxydase	410	0	0
	Cyt. Peroxydase	0	940	

* Les particules ont été remises en suspension dans un volume de tampon égal au volume d'extrait dont elles provenaient, le chiffre indique l'activité de cette suspension.

terminal des oxydations^{2,3}. Ces deux peroxydases peuvent être séparées l'une de l'autre par centrifugation: l'une d'elles est associée à des particules sédimentables, l'autre est en solution dans les extraits. Il est frappant que la cytochrome peroxydase qui est en solution se forme aussi bien dans le mutant "petites colonies" que dans la levure normale, tandis que l'autre peroxydase, qui est associée aux particules sédimentables n'apparaît pas chez le mutant. Cette constatation vérifie la règle³ selon laquelle les enzymes qui font défaut dans le mutant "petites colonies" sont tous associés à des particules dont la perte ou la modification serait l'expression la plus simple de cette mutation cytoplasmique.

SLONIMSKI³ a discuté en détails les mécanismes possibles de l'induction des enzymes respiratoires chez la levure. On peut la considérer comme un bel exemple, en peu particulier sans doute, d'inductions successives: on imaginerait volontiers en effet que l'oxygène induirait la cytochrome oxydase, qui induirait le cytochrome *c*; celui-ci induirait à son tour les cytochrome réductases, *etc.* Toutefois—SLONIMSKI l'a très justement souligné—cette interprétation ne peut expliquer l'apparition de cytochrome *c* chez le mutant "petites colonies" incapable de former la cytochrome oxydase, que s'il existe ou que s'il apparaît chez celui-ci un autre enzyme capable d'oxyder le cytochrome *c*. Nous venons précisément d'établir que le mutant forme la cytochrome peroxydase sous l'action de l'oxygène; il est donc permis d'imaginer que la formation du cytochrome

c dans le mutant est l'aboutissement d'une chaîne d'inductions. Cette hypothèse pourrait être éprouvée s'il était possible d'induire la cytochrome peroxydase par un autre agent que l'oxygène. Nous avons tenté de le faire à l'aide d'hydroperoxyde d'éthyle. Cette substance semble capable d'induire la formation de cytochrome peroxydase ; malheureusement, elle inhibe fortement la fermentation aux concentrations auxquelles son pouvoir inducteur se manifeste (Table III). Dans la levure maintenue au contact d'hydroperoxyde d'éthyle et en anaérobiose, il apparaît du cytochrome *c*; nous ne pouvons cependant pas affirmer qu'il s'en forme beaucoup plus que la petite quantité toujours induite par l'oxygène pendant les centrifugations des suspensions de levure. Ces manipulations, qui se font au contact de l'air, suffisent en effet à provoquer une synthèse de catalase qui peut se prolonger, chez le mutant "petites colonies", pendant les deux premières heures d'anaérobiose.

TABLE III

ACTION DE L'HYDROPEROXYDE D'ÉTHYLE

	Cytochrome peroxydase	%CO ₂
Avant incubation	4	280
Agité à l'air pendant 4 heures	500	300
Incubé 4 heures sans aération	3 ¹	
Incubé 4 heures sans aération, avec hydroperoxyde		
$2 \cdot 10^{-5} M$	14	278
$2 \cdot 10^{-4} M$	17	258
$2 \cdot 10^{-3} M$	65	72

levure. Ces manipulations, qui se font au contact de l'air, suffisent en effet à provoquer une synthèse de catalase qui peut se prolonger, chez le mutant "petites colonies", pendant les deux premières heures d'anaérobiose.

RÉSUMÉ

1. La cytochrome peroxydase et une peroxydase qui catalyse l'oxydation de la benzidine sont induites par l'oxygène chez la levure.
2. Le mutant "petites colonies" forme la cytochrome peroxydase, mais pas l'autre peroxydase.
3. Une méthode de réduction du cytochrome *c* à l'aide d'une résine réductrice est décrite.

SUMMARY

1. Cytochrome *c* peroxidase and a peroxidase able to catalyse the oxidation of benzidine are induced by oxygen in resting yeast.
2. The mutant "petites colonies" can form cytochrome peroxidase, but not the other peroxidase.
3. A method is described for reducing cytochrome *c* on a resin.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Erscheinen der Cytochromperoxydase, und einer Peroxydase welche die Oxydation von Benzidin catalysiert, wird bei der Hefe durch Sauerstoff induziert.
2. Der durch die Bildung von "kleinen Kolonien" charakterisierte Mutant formt Cytochromperoxydase, jedoch nicht die andere Peroxydase.
3. Es wird eine Reduktionsmethode von Cytochrom *c* durch reduzierendes Kunstharz beschrieben.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ H. CHANTRENNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 157.
- ² B. EPHRUSSI ET P. SLONIMSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 256.
- ³ P. SLONIMSKI, *La formation des enzymes respiratoires chez la levure*, Masson, Paris, 1953.
- ⁴ H. CHANTRENNE ET C. COURTOIS, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 397.
- ⁵ B. EPHRUSSI, H. HOTTINGUER, A.-M. CHIMÈNES, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 351.
- ⁶ R. ABRAMS, A. M. ALTSCHUL, T. R. HOGNESS, *J. Biol. Chem.*, 142 (1942) 303.
- ⁷ A. BAYER ET V. VILLIGER, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 34 (1901) 738.
- ⁸ A. RIECHE, *Alkylperoxyde und Ozonide*, Leipzig, Th. Steinkopf (1951).
- ⁹ H. CHANTRENNE, *Enzymologia*, 11 (1943) 213.

Reçu le 12 mars 1955