

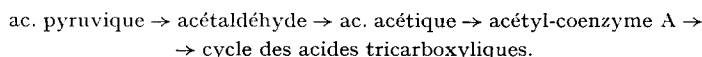
L'OXYDATION DE L'ACIDE PYRUVIQUE CHEZ LA LEVURE

A. ALVAREZ*, E. VANDERWINKEL ET J. M. WIAME

Service de Recherches du "Centre d'Enseignement et de Recherches des Industries Alimentaires" (C.E.R.I.A.), Bruxelles, et Laboratoire de Microbiologie de l'Université Libre de Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Si l'on réunit l'ensemble des données enzymatiques connues actuellement chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), on peut penser que l'acide pyruvique est oxydé par la suite des réactions:



On connaît, en effet, chez cet organisme les enzymes catalysant les 4 réactions de cette chaîne réactionnelle: ac. pyruvique décarboxylase^{1,2}, acétaldéhyde deshydrogénase^{3,4}, acétyl-CoA-kinase^{5,6} et enzyme de condensation⁷.

L'intensité de la fermentation alcoolique, caractéristique de la levure, suggère également cette voie métabolique. D'autre part, LEMOIGNE et coll.⁸ ont montré que l'alcool s'accumule pendant la croissance sur glucose, même dans des conditions d'oxygénation bien assurées.

Si ces arguments sont en faveur du chemin via l'acétate libre, il y a cependant quelques indications indirectes suggérant l'existence d'une voie métabolique oxydative, ne comprenant pas l'acétate libre.

EATON ET KLEIN⁹ observent que les cellules jeunes d'une souche de *S. cerevisiae* sont capables d'oxyder plus vite le glucose que l'acétate. D'autre part, LINNANE¹⁰ a isolé de la levure un système capable d'oxyder le pyruvate dans des conditions où l'acétate ne l'est pas.

Des travaux concernant le métabolisme d'une levure très particulière, du genre *Brettanomyces* (*B. bruxellensis*), indiquent aussi que les chemins d'oxydation du glucose et de l'acétate ne sont pas compris entièrement dans une même voie métabolique¹¹. On observe, chez cette levure, que la croissance sur un milieu glucosé produit des organismes pauvres en acéto-CoA-kinase et que ceux-ci oxydent très lentement l'acétate. La vitesse d'oxydation de l'acétate et l'activité kinasique peuvent être fortement accrues par croissance sur éthanol ou acide acétique. En appliquant à cette levure le principe de l'adaptation simultanée (séquentielle)¹², il semble que l'on ne puisse identifier le métabolisme de l'acide acétique à un fragment contenu intégralement ni dans le métabolisme du glucose, ni dans celui de l'acide pyruvique.

Etant donné l'importance des travaux concernant le métabolisme général de la levure, nous avons cru bon de reprendre le métabolisme du pyruvate, en étant guidés

* Adresse actuelle: Instituto de Investigaciones de Ciencias Biológicas, Montevideo, Uruguay.
Bibliographie p. 340/341.

par les travaux de ces quelques dernières années, réalisés sur tissus animaux^{13,14} et bactéries¹⁵⁻¹⁷.

Dans ces cas, on a en effet démontré l'existence de plusieurs mécanismes d'oxydation de l'acide pyruvique qui ne passent pas par le stade acide acétique libre.

On pourrait donc supposer que le système de décarboxylation oxydative est également présent chez la levure¹⁸. L'oxydation directe de l'acétaldéhyde en acétyl-coenzyme A, qui ne fut observée jusqu'à présent que chez *Escherichia coli*¹⁹ et *Clostridium Kluyveri*²⁰, constitue encore une autre possibilité.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Microorganismes

Un grand nombre d'essais ont été effectués avec de la levure de boulangerie commerciale (Levure Royale, Bruges), obtenue régulièrement après un maximum de trois jours après sa fabrication.

Lorsque les cultures ont été réalisées au laboratoire, elles ont été faites, soit avec cette même levure isolée en culture pure, soit avec la levure "Yeast Foam" issue du laboratoire du Dr. LINDEGREN, ou encore avec un mutant "petite colonie" de cette dernière, provenant du laboratoire du Prof. EPHRUSSI²⁵ *.

2. Cultures

Le milieu de culture est le suivant:

KH_2PO_4 $2 \cdot 10^{-2} M$; CaCl_2 $10^{-3} M$; citrate de fer $10^{-4} M$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $5 \cdot 10^{-5} M$; Extrait de levure (Yeast Extract Difco) 3.5 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $2 \cdot 10^{-2} M$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $10^{-3} M$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $10^{-4} M$; $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $5 \cdot 10^{-5} M$; glucose 30 g/l.

La culture anaérobie est réalisée à 30°, dans un flacon de 10 l rempli de ce milieu, et ensemencée par une culture de 250 ml. Un passage d'azote pendant les premières heures de culture élimine l'air restant; une soupape de Bunsen empêche toute rentrée d'air. Les cellules sont constamment maintenues en suspension dans le milieu par agitation magnétique. Nous récoltons environ 55 g de levure, poids humide, après 20 h pour 300 g de glucose.

3. Préparations de fractions

30 g de levure sont broyés au mortier avec 70 g de corindon pendant 5 min. Ce broyat est repris dans 30 ml d'une solution de lactose 0.5 M, tamponnée par du phosphate de potassium 0.1 M à pH 7.3. Une centrifugation d'une minute à 5,000 g élimine le corindon et une grande partie des cellules entières. Le surnageant est centrifugé pendant 10 min à 10,000 g; le culot contient des cellules entières et les parois cellulaires.

L'extrait exempt de cellules est très riche en particules (granules) visibles au microscope à contraste de phase. Cet extrait "total" a été employé lors du dosage d'activité des diverses fractions protéiques chez la levure de boulangerie.

La centrifugation de cet extrait à 140,000 g, pendant 30 min, donne un surnageant limpide S et un culot. Celui-ci est remis en suspension dans la même solution de lactose tamponnée et est centrifugé à nouveau.

Le surnageant S et le culot de granules lavés G remis en suspension ont servi tels quels à des tests qualitatifs, et, après précipitation au sulfate d'ammonium, aux tests quantitatifs.

Toutes les opérations se font à une température inférieure à 4°.

4. Préparation des enzymes

Les extraits, surnageant ou granules, sont dilués à 40 ml par de l'eau bidistillée. On y ajoute 1 mg de glutathion et 2 mg de ribonucléase. Les préparations sont maintenues 1 h à température ordinaire. On procède, ensuite, aux précipitations au sulfate d'ammonium, en chambre froide. Les précipités sont dissous et, au besoin, dilués suivant la nécessité des résultats de cinétique enzymatique, dans du tampon 0.1 M aux phosphates de K à pH 7.3 contenant 0.1 mg/ml de glutathion.

5. Dosage de l'acétyl CoA

Il a été effectué suivant TABOR²¹. L'acétyl CoA formé est capté par acétylation enzymatique de la parantitroaniline, dont le spectre d'absorption est modifié.

* Ce mutant nous a été donné par le Prof. H. CHANTRENNE, et a été testé en cultures en boîtes de Pétri sur un milieu contenant glucose (10/100), acétate (1 %), extrait de levure Difco (0.5 %), où il donne des colonies minuscules comparées aux colonies normales produites par la levure Yeast Foam originale.

L'enzyme d'acétylation est préparé suivant cet auteur; son activité a été contrôlée en utilisant l'oxydase pyruvique de coeur de porc, et l'acéto-CoA-kinase de levure obtenue suivant JOKES et coll.²² en se limitant à la seconde précipitation au sulfate d'ammonium.

Dans nos conditions de travail, la longueur d'onde où la différence entre les coefficients d'absorption molaire de la *p*-nitroaniline et de la *p*-nitroacétanilide est maximum, est 390 m μ ; les mesures ont été effectuées à cette longueur d'onde.

6. Définition de l'unité d'enzyme

Nous prenons comme unité d'enzyme, la quantité d'enzyme qui cause un changement de densité optique, dû à la *p*-nitroaniline, à 390 m μ , de 0.1 en 100 sec, dans les conditions de travail signalées plus loin (rapporté à 1 ml et pour un trajet optique de 1 cm).

Cette chute de densité optique correspond à la consommation de $7.2 \cdot 10^{-3}$ μ mol. de *p*-nitroaniline par ml.

7. Dosages divers

Le dosage des protéines est fait par la méthode du biuret; celui de l'acétoïne suivant WESTERFELD²³.

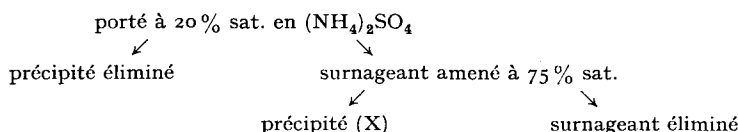
8. Produits et firmes

Pyruvate de Na	E. Merck
Acétaldéhyde	E. Merck (redistillée)
Paranitroaniline	E. Merck
Diphosphopyridine nucléotide (DPN)	C. F. Boehringer & Soehne G.m.b.H.
Coccarboxylase (TPP)	Schwarz Laboratories
Coenzyme A (CoA)	Pabst Laboratories
Glutathion (GSH)	S.A.F. Hoffmann - La Roche Co. Ltd.
Acétyl méthyl carbinol	L. Light & Co. Ltd.
2,3-dimercaptopropanol (BAL)	Fluka
Corindon No. 80 mesh/pouce	Carborundum Co.

RÉSULTATS

1. Dosage de l'activité de l'oxydase pyruvique dans diverses fractions protéiques de la levure de boulangerie

Pour cet essai, nous employons l'extrait "total" (méthode 3). Cet extrait, dilué à 40 ml, est traité comme suit:



Le précipité (X), dissous dans du tampon aux phosphates de K à pH 7.3 contenant 0.1 mg GSH/ml, nous donnait un test positif d'oxydase pyruvique. Après un traitement à la ribonucléase (méthode 4), il est fractionné suivant HAGER ET GUNSALUS²⁴:

- de 0 à 36 % de saturation en sulfate d'ammonium
- de 36 à 48 % (A)
- de 48 à 60 %
- de 60 à 100 % (B)

Ces diverses fractions sont testées et dosées en la présence, reconnue favorable (Tableau I), d'une quantité déterminée (0.1 mg prot.) de la dernière fraction (B), qui contiendrait, suivant les auteurs précités^{24, 25}, la déshydrogénase lipoïque. D'autre part, des essais sont effectués sans pyruvate, sans CoA et sans DPN. L'enzyme d'acétylation seul, avec cofacteurs et substrat, ne donne pas de formation d'acétyl CoA.

TABLEAU I

ACTIVITÉS DE L'OXYDASE PYRUVIQUE AU COURS D'UN FRACTIONNEMENT

Les mesures sont effectuées, en cuvettes de 1 cm de longueur et 0.3 cm de largeur, au spectrophotomètre Beckman D. U., à la longueur d'onde de 390 m μ . Le système complet contient: Tampon aux phosphates de K pH 7.3, 0.1 ml (100 μ mol.); MgCl₂, 0.01 ml, (2 μ mol.); CoA, 0.05 ml (0.1 μ mol.); DPN, 0.05 ml (0.4 μ mol.); GSH, 0.05 ml (10 μ mol.); TPP, 0.02 ml (0.2 μ mol.); Pyruvate de Na, 0.05 ml (5 μ mol.); *p*-nitroaniline, 0.05 ml (0.05 μ mol.); Enzyme d'acétylation, 0.15 ml (1.1 mg de protéine); Fraction (B), 0.02 ml (0.1 mg prot.).

Fraction % satur. S. Amm.	Quantité en		Additions	Vitesse $\frac{\Delta d.o.}{\Delta t \text{ sec.}} \times 10^5$	Activité unités/mg prot.
	ml	mg prot.			
36 à 48 % (A)	0.02	0.030	complet	0.20	400
	0.04	0.060	complet	0.40	
	0.04	0.060	sans fract. B	0.36	
	0.04	0.060	sans pyruvate	0.00	
	0.04	0.060	sans CoA	0.14	
	0.04	0.060	sans DPN	0.06	
0 à 36 %	0.02	0.036	complet	0.14	222
	0.06	0.108	complet	0.40	
48 à 60 %	0.08	0.240	complet	0	0
60 à 100 % (B)	0.02	0.100	complet	0	0

Vu ces résultats, nous utiliserons désormais la fraction protéique précipitant entre 20 et 75 % de saturation. Cette fraction contient suffisamment de la fraction (B) pour réaliser des vitesses proportionnelles aux quantités d'enzymes. (Voir la Fig. 1.)

2. Dosage de l'oxydase pyruvique dans la fraction soluble S et la fraction granulaire G de la levure de boulangerie

S et G sont dilués et traités comme exposé ci-dessus (voir méthodes).

Un premier précipité, faible, obtenu à 20 % de saturation, est éliminé. On emploie la fraction protéique précipitée entre 20 et 75 % de saturation en sulfate d'ammonium; elle contient la majorité des protéines des fractions.

La Fig. 1 est un exemple des cinétiques obtenues, permettant l'évaluation de la teneur en enzyme d'une fraction.

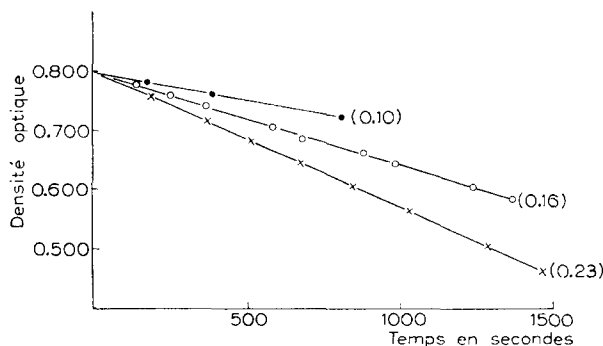


Fig. 1. Vitesse de réaction en fonction des quantités d'enzyme. Les conditions expérimentales ont été données en légende du Tableau I. ●—● 0.082 mg de protéines (0.04 ml). Fraction G. Vitesse 0.10. ○—○ 0.124 mg de protéine (0.06 ml). Fraction G. Vitesse 0.16. ×—× 0.165 mg de protéines (0.08 ml). Fraction G. Vitesse 0.23.

Les résultats sont exprimés dans le Tableau II.

TABLEAU II
RÉPARTITION DE L'OXYDASE PYRUVIQUE
Conditions semblables à celles données au Tableau I.

<i>Fraction</i>	<i>Unités/mg prot.</i>	<i>Quantité totale prot. en mg</i>	<i>Activité totale</i>
S	1.3	232.5	295
G	0.8	31	25

3. Comparaison de la levure normale et d'un mutant "petite colonie"

Les fractions sont obtenues comme il a été décrit aux méthodes.

Les résultats sont donnés dans le Tableau III.

TABLEAU III
RÉPARTITION DE L'OXYDASE PYRUVIQUE CHEZ UNE LEVURE NORMALE ET SON MUTANT
Conditions: voir Tableau I.

<i>Souche Yeast Foam</i>	<i>Fraction</i>	<i>Unités/mg prot.</i>	<i>Quantité totale prot. en mg</i>	<i>Activité totale</i>
Normale	S	0.6	136	86
Normale	G	2.9	16	57
Mutant	S	0.5	139	73
Mutant	G	1.5	25	39

4. Effet de l'éthanol et de l'acétaldéhyde sur l'activité de l'oxydase pyruvique

Absence d'acétaldéhyde déshydrogénase liée au Coenzyme A

a. Ethanol. En substituant 5 μ mol. d'éthanol au pyruvate, nous n'observons aucune formation d'acétyl CoA, mais une augmentation rapide de la densité optique à 340 m μ nous indique la présence d'alcool deshydrogénase dans notre préparation.

L'addition ultérieure de pyruvate (5 μ mol.) à cet assai ne nous donne une formation d'acétyl CoA, à vitesse égale à celle de la réaction témoin, qu'en présence d'une quantité 2.5 fois plus grande de DPN⁺.

L'inhibition s'explique donc facilement par l'utilisation du DPN⁺ due à l'action de l'alcool deshydrogénase.

b. Acétaldéhyde. La substitution d'acétaldéhyde (5 μ mol.) au pyruvate, n'apporte aucune formation d'acétyl CoA, ni de variation dans la quantité présente de DPN⁺; toutefois, l'addition ultérieure de pyruvate (5 μ mol.) à cet assai ne nous donne aucune formation sensible d'acétyl CoA.

La présence simultanée d'alcooldeshydrogénase (levure) et d'aldéhyde deshydrogénase (foie de pigeon) dans notre assai, explique — et le calcul le confirme — que, en présence d'acétaldéhyde, la quantité de DPN⁺ se maintient sensiblement constante.

Bibliographie p. 340/341.

L'action inhibitrice de l'acétaldéhyde peut s'expliquer^{17, 28} par son action compétitive au niveau d'un intermédiaire du type "aldéhyde TPP" pour former de l'acétoïne (acétyl méthyl carbinol). Le dosage de ce composé confirme cette explication (voir Tableau IV); on a tenu compte d'un témoin sans acétaldéhyde, ainsi que de l'acétoïne présente dans un distillat d'acétaldéhyde. On voit que la quantité d'acétoïne produite en présence d'acétaldéhyde correspond à la quantité d'acétyl CoA formé dans le témoin.

Ceci nous montre aussi que la réaction: aldéhyde \rightarrow acétyl CoA est probablement absente chez la levure.

TABLEAU IV

FORMATION D'ACÉTOÏNE EN PRÉSENCE D'ACÉTALDEHYDE

Les tubes A et B bouchés mis à incuber pendant 1 h à 30°, contiennent 1 ml de la fraction de levure S et les quantités de cofacteurs et de substrats décrites au Tableau I multipliées par 10. Le tube A contient en plus 100 μ mol. d'acétaldéhyde. Le volume est porté à 10 ml dans chaque tube avant les mesures et le dosage de l'acétoïne.

Essais	Acétyl CoA formé μ mol./10 ml	Acétoïne produite μ mol./10 ml
A	0	1.7
B	0.3	1.0
Acétaldéhyde 100 μ mol. en distillation	/	0.3
	0.3	0.4

5. Rôle de l'acide lipoïque

Les travaux de PETERS^{27, 28} montrant l'inhibition du système d'oxydation du pyruvate par les ions arsénites (et notamment la Lewisite) et la réversion de cette inhibition par les composés dimercaptols, sont à l'origine de la mise en évidence du rôle fondamental de l'acide lipoïque dans ce système enzymatique (GUNSALUS^{17, 25}).

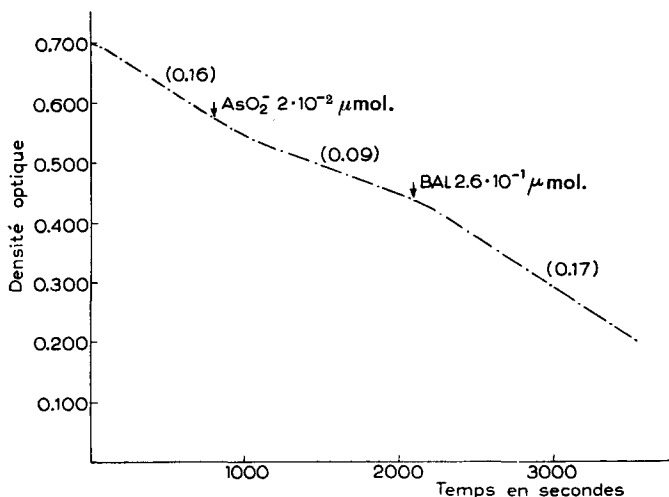


Fig. 2. Inhibition par les ions arsénites et réversion de cette inhibition par le B.A.L. Les conditions expérimentales ont été données en légende du Tableau I.

La Fig. 2 montre une réaction de vitesse $0.16 \left(\frac{\Delta \text{d.o.}}{\Delta t \text{ sec}} \times 10^3 \right)$ inhibée par l'addition de $2 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{mol.}$ d'arsénite (concentration finale $4 \cdot 10^{-5}$ M) la vitesse est alors réduite à 0.09.

L'addition ultérieure de $2.6 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{mol.}$ de B.A.L. (2,3-dimercapto-1-propanol) (concentration finale $5 \cdot 10^{-6}$ M) lève complètement cette inhibition, la vitesse est ramenée à 0.17.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats précédents montrent que le système d'oxydation pyruvique découvert par SCHWEET et coll.^{13,14} et KORKES¹⁵ et analysé par GUNSALUS¹⁷, existe également chez la levure.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, ce système est doublé de l'oxydation passant par l'état d'acide acétique libre et l'activation de celui-ci liée à l'ATP et au CoA. Il faut remarquer que, dans ce dernier cas, la formation d'acétyl CoA nécessite la dépense d'une molécule supplémentaire d'ATP. Un autre système capable de former l'acétyl CoA, sans dépense d'ATP, l'acétaldéhyde deshydrogénase liée au CoA²⁰, n'a pas été détecté. Alors que l'on peut montrer que chez certaines levures (*Brettanomyces bruxellensis*) la quantité d'acéto-CoA-kinase varie avec les conditions de culture, chez *Saccharomyces cerevisiae* les deux systèmes formateurs d'acétyl CoA sont permanents, y compris chez la levure ayant crû en anaérobiose. Il est possible qu'une étude, qui ne se limiterait pas aux races de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées en boulangerie, mais qui inclurait les levures utilisées dans les divers types de fermentation alcoolique, tels que la distillerie, les fermentations des vins et des bières, ainsi que les levures à métabolisme "oxydatif", pourrait avantageusement se baser sur ces données. Une telle étude permettrait, peut-être, de localiser au niveau enzymatique, les différences physiologiques qui déterminent leur emploi, leur habitat et leur classification.

Quelques commentaires doivent être faits en ce qui concerne l'oxydase pyruvique dite "soluble" et "granulaire". Il faut interpréter les données en tenant compte de ce que les préparations comportent une opération de broyage difficile à contrôler et qui peut, de façon variable, entraîner le passage à l'état soluble d'une fraction d'un enzyme primitivement contenu dans les éléments granulaires (NOSSAL¹⁹). Ceci peut expliquer également la difficulté qu'il y a à obtenir de bonnes respirations dans les préparations de mitochondries chez cet organisme et le rôle primordial de la technique de préparation des fractions.

LINNANE et coll.¹⁰, avec une préparation de mitochondries de levure de boulangerie comparable à notre fraction G, obtient une oxydation du pyruvate correspondant approximativement à 0.3 $\mu\text{mol.}$ de pyruvate consommé en 1.000 sec/mg de protéine. Nous obtenons ici des valeurs d'activité enzymatique pour la fraction G correspondant à des consommations de l'ordre de 0.1 à 0.2 $\mu\text{mol.}$ de pyruvate. La présence de l'oxydase pyruvique donne une explication à l'observation de LINNANE que les suspensions de granules ne sont pas capables d'oxyder l'acétate dans les systèmes où le pyruvate est oxydable: des travaux en cours dans ce laboratoire indiquent que l'acéto-CoA-kinase est un enzyme en majeure partie soluble; des granules obtenus par rupture des cellules au moyen d'ultra-sons retiennent cependant de 10 à 20 % de cet enzyme³⁶.

La présence de l'oxydase pyruvique, aussi bien dans les mutants à respiration déficiente (ou dans une levure normale récoltée après croissance anaérobique) que

dans la levure cultivée industriellement en aérobiose, peut être interprétée par le rôle fondamental que représente l'acétyl CoA dans les synthèses effectuées par le cycle des acides tricarboxyliques³⁰⁻³², ou par la condensation glyoxylique^{33,34} ou encore dans la formation des acides gras.

Alors que ce travail était sous-pressé, nous avons eu connaissance de celui de HOLZER ET GOEDDE³⁷, qui aboutit à des conclusions en partie semblables aux nôtres.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Prof. E. SLATER qui nous a offert l'échantillon de B.A.L.

L'un d'entre nous (A. ALVAREZ), remercie la Faculté de Chimie et Pharmacie de Montévidéo (Uruguay) pour l'octroi d'une bourse qui a permis de réaliser ce travail.

RÉSUMÉ

1. Un mécanisme de décarboxylation oxydative directe (oxydase pyruvique), semblable à celui décrit chez *Escherichia coli* et *Streptococcus faecalis*, est mis en évidence dans la levure de boulangerie.

2. Ce système enzymatique est présent dans les fractions solubles et granulaires. Il est également présent dans une levure ayant crû en anaérobiose ainsi que dans son mutant à déficience respiratoire.

3. L'action de l'éthanol et de l'acétaldéhyde, des ions arsénites et d'un composé dimercaptol est considérée.

4. La signification et l'importance de ce système sont discutées.

SUMMARY

1. The presence of a pyruvic oxidase in yeast has been demonstrated. This system is similar to that described for *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis*.

2. This system is present both in the soluble and in the granular fraction. It is also present in yeast after anaerobic growth and in a mutant produced by respiratory deficiency.

3. The action of ethanol, acetaldehyde, arsenous ions, and a dimercaptol, has been studied.

4. The significance of this system is discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. NEUBERG ET L. KARZAG, *Biochem. Z.*, 36 (1911) 68.
- ² H. HOLZER, G. SCHULZ, C. VILLAR-PALASI ET J. JÜNTGEN-SELL, *Biochem. Z.*, 327 (1956) 331.
- ³ S. BLACK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 34 (1951) 86.
- ⁴ J. E. SEEGMILLER, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 629.
- ⁵ F. LIPMANN, M. E. JONES, S. BLACK ET R. M. FLYNN, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 23, 84.
- ⁶ P. BERG, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 629.
- ⁷ S. OCHOA, J. R. STERN ET M. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 691.
- ⁸ M. LEMOIGNE, J. P. AUBERT ET J. MILLET, *Ann. Inst. Pasteur*, 87 (1954) 427.
- ⁹ M. R. EATON ET H. KLEIN, *J. Bacteriol.*, 68 (1954) 110.
- ¹⁰ A. W. LINNANE ET J. L. STILL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 56 (1955) 264.
- ¹¹ A. ALVAREZ ET J. M. WIAME, travaux en préparation.
- ¹² R. Y. STANIER, *J. Bacteriol.*, 54 (1947) 339.
- ¹³ R. S. SCHWEET ET K. CHESLOCK, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 749.
- ¹⁴ R. S. SCHWEET, in W. D. McELROY AND B. GLASS, *Phosphorus Metabolism*, Vol. I, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1951, p. 246.
- ¹⁵ S. KORKES, A. DEL CAMPILLO, I. C. GUNSALUS ET S. OCHOA, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 721.
- ¹⁶ S. KORKES, in W. D. McELROY AND B. GLASS, *Phosphorus Metabolism*, Vol. I, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1951, p. 259.
- ¹⁷ I. C. GUNSALUS, B. L. HORECKER ET W. A. WOOD, *Bacteriol. Rev.*, 19 (1955) 127.
- ¹⁸ S. OCHOA, *Advances in Enzymol.*, 15 (1954) 183.
- ¹⁹ E. A. DAWES ET S. M. FOSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 253.
- ²⁰ R. M. BURTON ET E. R. STADTMAN, *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 873.
- ²¹ M. TABOR, A. H. MEHLER ET E. R. STADTMAN, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 127.

- ²² M. E. JONES, S. BLACK, R. M. FLYNN ET F. LIPMANN, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 141.
- ²³ W. W. WESTERFELD, *J. Biol. Chem.*, 101 (1945) 495.
- ²⁴ HAGER ET I. C. GUNSALUS, cités par S. KORKES, dans *Methods in Enzymology*, Vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 490.
- ²⁵ I. C. GUNSALUS, *The Mechanism of Enzyme Action*, édité par W. D. McELROY ET B. GLASS, The Johns Hopkins Press, 1954, p. 545.
- ²⁶ E. JUNI, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 727.
- ²⁷ R. A. PETERS, L. A. STOCKEN, ET R. H. S. THOMPSON, *Nature*, 156 (1945) 616.
- ²⁸ R. A. PETERS, H. M. SINCLAIR ET R. H. S. THOMPSON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 516.
- ²⁹ P. M. NOSSAL, *Biochem. J.*, 57 (1954) 62.
- ³⁰ P. P. SLONIMSKI, *Conférences et Rapports du 3ème Congrès International de Biochimie, Bruxelles, 1955*, Vaillant-Carmanne, Liège, 1956, p. 242.
- ³¹ M. H. HIRSCH, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 674.
- ³² J. M. WIAME, *Advances in Enzymol.*, 18 (1957) 241.
- ³³ D. T. O. WONG ET S. AJL, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 3230.
- ³⁴ H. I. KORNBERG ET H. A. KREBS, *Nature*, 179 (1957) 988.
- ³⁵ B. EPHRUSSI, H. HOTTINGUER ET A. M. CHIMENES, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 351.
- ³⁶ E. VANDERWINKEL, S. BOURGEOIS ET J. M. WIAME, *Arch. int. physiol. biochim.*, 66 (1958) 129.
- ³⁷ H. HOLZER ET H. W. GOEDDE, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 175.

Reçu le 7 novembre 1957

INFLUENCE COMPARÉE DU CHLORURE DE SODIUM ET DU TWEEN 80 SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA CARBOXYPEPTIDASE A DU PANCRÉAS

JULIE LABOUESSE

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences (Paris)

Diverses investigations¹⁻⁴ concernant l'influence de la force ionique sur l'activité enzymatique de la carboxypeptidase A du pancréas ont montré que l'activité de cet enzyme croît avec la force ionique du milieu, jusqu'à ce que celle-ci atteigne une valeur de 0.5, et ce, quel que soit le sel présent : à partir de cette valeur, il n'y a plus de modification de l'action enzymatique. D'autre part, il a été constaté² que les sels pouvaient être remplacés par le Tween 80*, substance tensioactive constituée par un dérivé polyoxyalkylénique d'un ester monooléique du sorbitane. Dans ce cas, comme d'ailleurs dans le cas des électrolytes, l'effet activateur est d'autant plus marqué que l'enzyme est plus dilué : on a vu en effet que, lorsque les concentrations de la carboxypeptidase sont de l'ordre de quelques dixièmes de $\mu\text{g/ml}$, la vitesse de la réaction enzymatique en absence de sel et de Tween 80 n'est pas proportionnelle à la quantité d'enzyme présent ; l'addition au mélange réactionnel, soit de chlorure de sodium 0.5 M, soit de 0.05 % de Tween 80 rétablit la proportionnalité tout en accroissant la vitesse d'hydrolyse du substrat³. Il est à remarquer à ce sujet que ni les sels, ni le Tween 80 n'inhibent la dénaturation thermique de l'enzyme en solution diluée, alors que le Tween 80, mais non les sels, protège l'enzyme contre la dénaturation de surface⁵.

Il était donc intéressant de comparer les constantes cinétiques et thermodynamiques liées à l'hydrolyse d'un substrat convenable, en présence des substances

* Atlas Powder Company, Wilmington, Delaware, États-Unis.