

EFFETS DES IONS CUIVRIQUES SUR LA LEVURE

I. ACTION DES IONS Cu^{2+} SUR L'UTILISATION DU GLUCOSE,
DES RESÉRVES ET DE L'ACÉTATE

A. ANTOINE*

Laboratoires de Morphologie animale et de Chimie biologique de l'Université de Bruxelles (Belgique)

(Reçu le 21 novembre, 1962)

SUMMARY

*Effects of cupric ions on yeast**I. Action of Cu^{2+} on the utilization of glucose, acetate and cell reserves*

1. Studying the poisonous effect of Cu^{2+} on yeast (*Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces ellipsoideus*), it has been observed that in phosphate buffer plus glucose and $0.15 \cdot 10^{-3}$ or $0.3 \cdot 10^{-3}$ M Cu^{2+} , the utilization of glucose by yeast cells is restricted to the beginning of the contact with Cu^{2+} ; after this, the cells oxidize only their reserves.

2. The oxidation of acetate and cellular reserves is but slightly influenced by Cu^{2+} ; the enzymes of the Krebs cycle and the respiratory carriers are little affected by cupric ions; either they do not react with Cu^{2+} or they are located in regions of the cell where Cu^{2+} cannot penetrate or penetrates slowly.

INTRODUCTION

Les ions cuivreux inhibent la fermentation et l'oxydation du glucose chez *Saccharomyces ellipsoideus* en suspension dans du tampon de phosphate glucosé $0.3 \cdot 10^{-3}$ M en Cu^{2+} (see ref. 1).

Nous avons observé que la fermentation et la respiration de *S. ellipsoideus* et *S. cerevisiae*, "Yeast foam" ne sont pas également sensibles au cuivre. Lorsque ces deux levures sont mises en présence d'ions $Cu^{2+} 0.15 \cdot 10^{-3}$ M dans du tampon de phosphate glucosé, la production anaérobie de CO_2 est bloquée en 10 min; par contre, dans les mêmes conditions, la respiration se poursuit presque linéairement pendant plusieurs heures, après un ralentissement initial^{2,3}.

Dans les expériences décrites ci-après, nous avons comparé les effets des ions cuivreux sur l'oxydation des réserves cellulaires et de l'acétate de soude à ceux qu'ils produisent sur l'oxydation et sur la fermentation du glucose.

* Chef de travaux, Chaire de Zootechnie, Institut Agronomique de Gembloux (Belgique).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Levures utilisées

S. ellipsoideus, souche A de MINAGAWA¹ et *S. cerevisiae*, Yeast foam.

Les cellules sont obtenues par culture de 48 h, à 30°, en ballons agités, dans un milieu de Henneberg à l'extrait de malt.

Composition et préparation du milieu

Saccharose, 66 g; peptone, 3.3 g; KH₂PO₄, 3.3 g; MgSO₄ · 7H₂O, 1.3 g; extrait de malt (Difco), 40 g; eau, 800 ml. La solution est chauffée 10 min à 115°, refroidie, filtrée et portée à 1 l, puis stérilisée 20 min à 120°.

Des cellules dont les réserves sont marquées sont produites par culture de 40 h dans le milieu de Henneberg au malt renfermant 0.4 μC de [¹⁴C₆]glucose/ml, le saccharose étant remplacé par 2 % de glucose.

Après récolte, les cellules marquées sont lavées 5 fois à l'eau distillée, les cellules non marquées sont lavées trois fois.

Mesures de la consommation d'oxygène

Les mesures sont faites à l'aide de manomètres de Warburg. Les cupules centrales contiennent 0.2 ml de KOH à 30 % et sont pourvues d'un petit papier filtre plissé; il est tenu compte d'une absorption de 2 μl d'O₂/h, par les réactifs⁴.

Du glucose radioactif est utilisé dans certaines expériences (12 μg et 1 μC par cuvette de Warburg); il est placé avec la solution de CuSO₄ dans le compartiment latéral dont le contenu est introduit dans le compartiment principal, après mise à 0 des manomètres (temps 0).

La potasse qui a absorbé le ¹⁴CO₂ est reprise quantitativement dans 5 ml d'eau et 0.5 ml de cette solution sont évaporés sur une plaquette. La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à fenêtre mince. L'auto-absorption due au léger dépôt de sels est appréciable, mais les chiffres obtenus sont directement comparables, puisque tous les échantillons contiennent la même quantité de sels.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Influence des ions Cu²⁺ sur la production aérobie de ¹⁴CO₂ à partir de [¹⁴C]glucose et sur la consommation d'O₂

Expérience: dans le compartiment principal d'une série de cuvettes de Warburg, on introduit: 1 ml d'une suspension de 3 · 10⁷ cellules de *S. cerevisiae* Yeast foam, et 1 ml de KH₂PO₄ M/7.5 contenant 1 % de glucose; on place dans la corne latérale 111 μl de 3 · 10⁻³ M CuSO₄ et 100 μl de la solution de [¹⁴C]glucose (12 μg et 1 μC). Ces réactifs sont versés dans le compartiment principal après 1 h d'incubation à 30° (temps 0); la concentration finale en Cu²⁺ est 0.15 · 10⁻³ M. O₂ consommé et ¹⁴CO₂ produit sont mesurés après 10, 20, 40, 80, 120 et 240 min de contact avec les ions Cu²⁺.

La même expérience a été exécutée avec 4 · 10⁷ cellules et 0.3 · 10⁻³ M Cu²⁺.

Les résultats rassemblés dans le Tableau I et la Fig. 1 montrent que les ions cuivriques ne bloquent pas la respiration en 240 min, alors que le dégagement de ¹⁴CO₂ provenant du glucose exogène radioactif est fortement inhibé après quelques minutes, et pratiquement arrêté après 80 min. Les ions Cu²⁺ inhibent donc fortement

l'utilisation du glucose exogène dans des conditions où la consommation d'oxygène est peu affectée.

Oxydation des réserves

Influence des ions Cu^{2+} sur l'oxydation des réserves cellulaires.

Expérience: on introduit dans des cuvettes de Warburg: 1 ml d'une suspension de $4 \cdot 10^7$ cellules de *S. cerevisiae*, Yeast foam et 1 ml de KH_2PO_4 M/7.5. Une solution de $CuSO_4$ ou de l'eau pure sont placées dans le compartiment latéral, de façon à obtenir des concentrations finales de 0, $0.3 \cdot 10^{-3}$ et $0.6 \cdot 10^{-3}$ M en Cu^{2+} . Il n'y a pas de

TABLEAU I

$^{14}CO_2$ RÉCUPÉRÉ DANS LA POTASSE APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS DE CONTACT DE CELLULES DE *S. cerevisiae* YEAST FOAM AVEC Cu^{2+} DANS DU TAMPON PHOSPHATE GLUCOSÉ + [^{14}C]GLUCOSE

Temps de contact avec Cu^{2+} et [^{14}C]glucose (min)	$Cu^{2+} 0.15 \cdot 10^{-3} M, 3 \cdot 10^7$ cellules		$Cu^{2+} 0.3 \cdot 10^{-3} M, 4 \cdot 10^7$ cellules	
	Coups/min dans KOH	Pour cent du $^{14}CO_2$ total produit	Coups/min dans KOH	Pour cent du $^{14}CO_2$ total produit
10	1435	55.6	1227	46.7
20	2139	82.8	1795	68.2
40	2350	91.1	2156	82
80	2535	98.2	2475	94.2
120	2515	1.8	2701	100
240	2581	100	2631	100

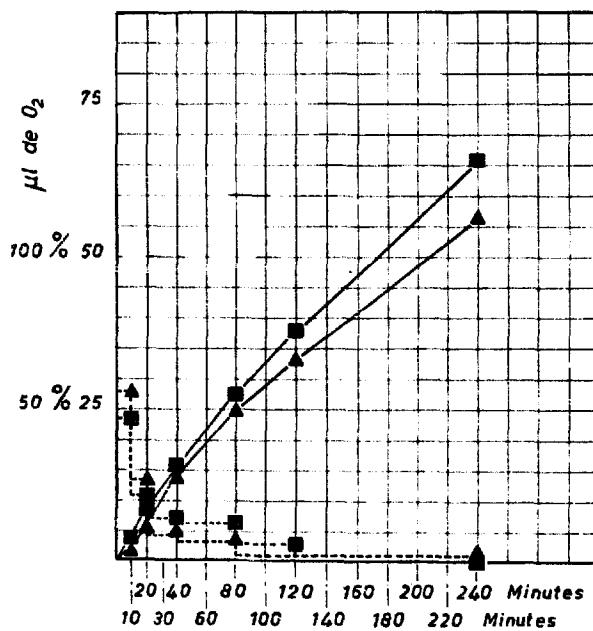


Fig. 1. Consommation d'oxygène par $3 \cdot 10^7$ cellules de *S. cerevisiae* Yeast foam, dans du tampon phosphate glucosé $0.15 \cdot 10^{-3}$ M en Cu^{2+} (Δ — Δ) et de $4 \cdot 10^7$ cellules dans le même milieu $0.3 \cdot 10^{-3}$ M en Cu^{2+} (\blacksquare — \blacksquare). Les paliers Δ --- Δ et \blacksquare --- \blacksquare donnent, pour les 2 séries, les pourcentages, produits dans les périodes correspondantes, du $^{14}CO_2$ total obtenu.

source de carbone dans le milieu, la levure ne dispose que de ses réserves. À titre de comparaison, on inclut dans la série une cuvette contenant du glucose à 1% ; la concentration finale en Cu^{2+} y est de $0.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Les suspensions sont incubées 20 min à 30° avant la mise à zéro des manomètres et l'introduction du CuSO_4 .

La consommation d'oxygène est donnée par la Fig. 2.

Nos résultats montrent que l'oxydation de substrats endogènes n'est pas affectée par les ions cuivriques ; en présence de glucose, on observe cependant une inhibition partielle de l'oxydation des réserves.

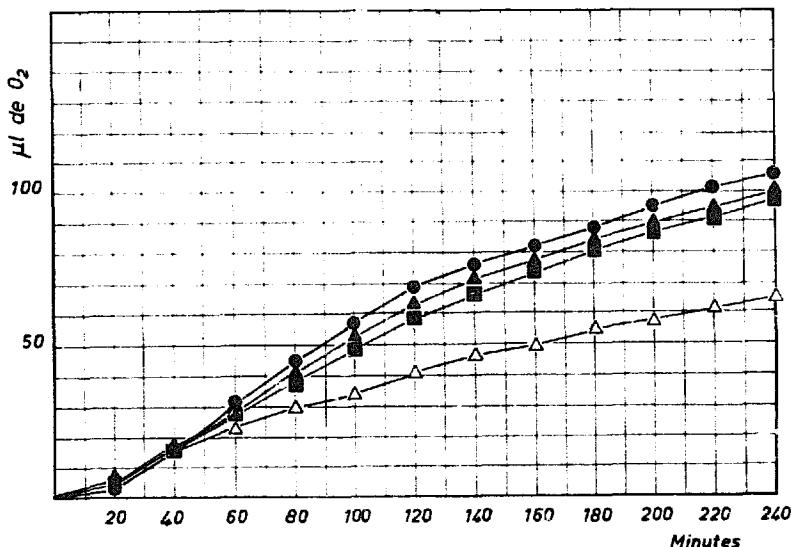


Fig. 2. Consommation d'oxygène par $4 \cdot 10^7$ cellules de *S. cerevisiae* Yeast foam, dans du tampon phosphate seul sans Cu^{2+} (●—●), $0.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en Cu^{2+} (▲—▲) et $0.6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en Cu^{2+} (■—■); dans le même tampon glucosé $0.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en Cu^{2+} (△—△).

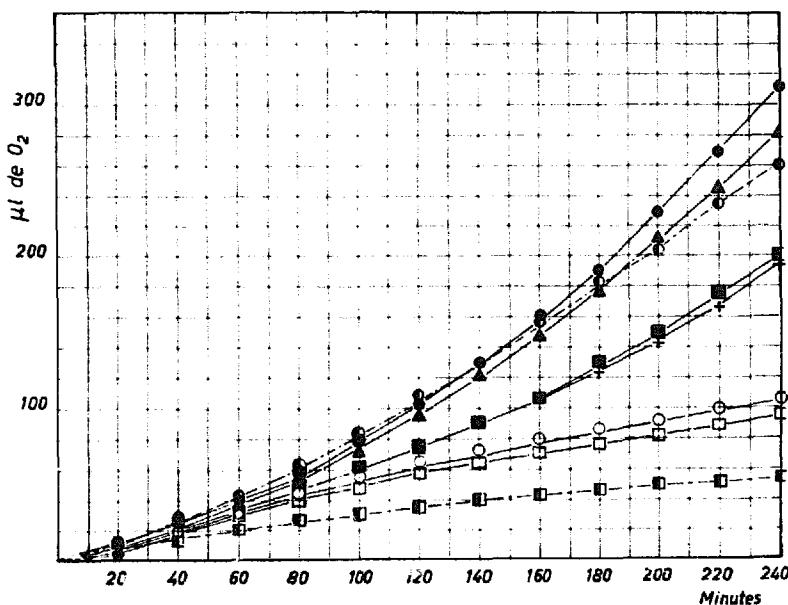


Fig. 3. Consommation d'oxygène par $5 \cdot 10^7$ cellules de *S. cerevisiae* Yeast foam, dans du tampon phosphate additionné d'acétate et sans Cu^{2+} (●—●), $0.15 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en Cu^{2+} (▲—▲), $0.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en Cu^{2+} (■—■), $0.6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en Cu^{2+} (+—+); dans le même tampon glucosé sans Cu^{2+} (○—○), $0.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en Cu^{2+} (■—■); dans le même tampon seul sans Cu^{2+} (○—○), $0.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en Cu^{2+} (□—□).

Oxydation de l'acétate

Afin d'établir si les ions cuivriques inhibent les réactions du cycle de Krebs, nous avons étudié leur action sur l'oxydation de l'acétate.

Expérience: on introduit dans des cuvettes de Warburg: 1 ml d'une suspension à $5 \cdot 10^7$ cellules de *S. cerevisiae* Yeast foam par millilitre et 1 ml de KH_2PO_4 M/7.5 contenant 1 % d'acétate de soude.

Du CuSO_4 ou de l'eau sont placés dans le compartiment latéral, de façon à obtenir les concentrations finales de 0, $0.15 \cdot 10^{-3}$, $0.3 \cdot 10^{-3}$ et $0.6 \cdot 10^{-3}$ M en Cu^{2+} .

Des témoins avec et sans glucose, et contenant ou non des ions cuivriques $0.3 \cdot 10^{-3}$ M sont inclus dans chaque expérience.

Les suspensions sont incubées 30 min à 30° avant l'addition du CuSO_4 .

Les résultats sont représentés par la Fig. 3; des courbes très semblables sont obtenues avec *S. ellipsoideus* pour des concentrations en ions Cu^{2+} de 0, $0.11 \cdot 10^{-3}$, $0.22 \cdot 10^{-3}$ et $0.44 \cdot 10^{-3}$ M.

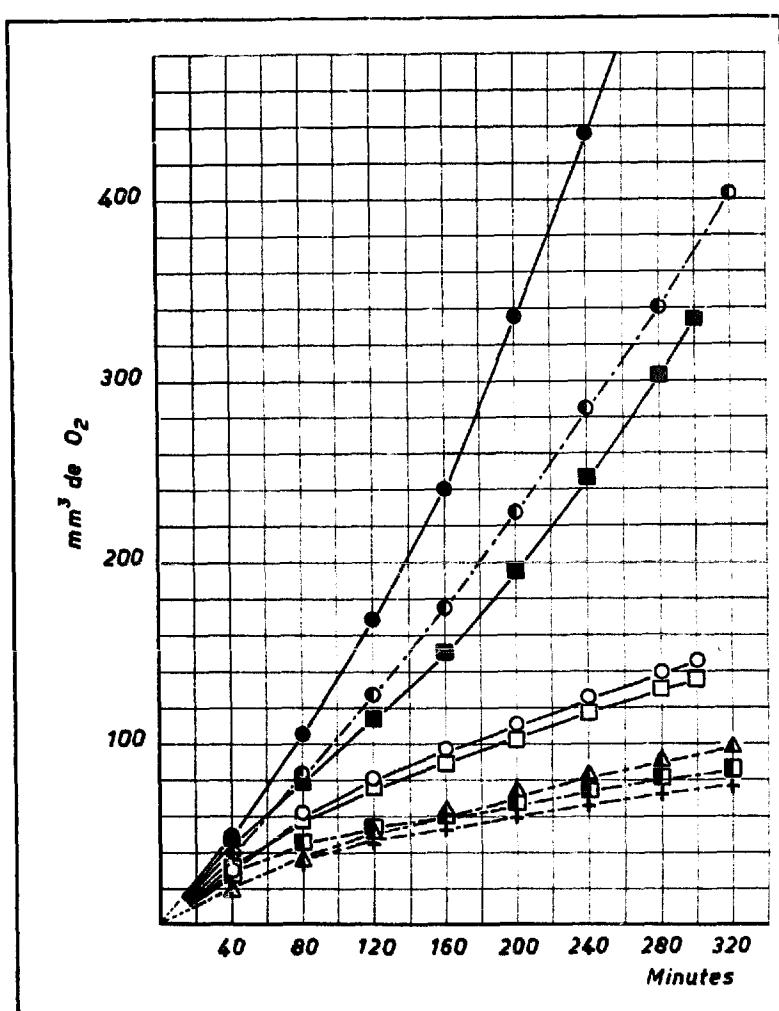


Fig. 4. Consommation d'oxygène par $6 \cdot 10^7$ cellules marquées de *S. cerevisiae* Yeast foam, dans du tampon phosphate additionné d'acétate et sans Cu^{2+} (●—●), $0.3 \cdot 10^{-3}$ M en Cu^{2+} (■—■); dans le même tampon glucosé sans Cu^{2+} (○—○), $0.15 \cdot 10^{-3}$ M en Cu^{2+} (▲—▲), $0.3 \cdot 10^{-3}$ M en Cu^{2+} (■—■), $0.6 \cdot 10^{-3}$ M en Cu^{2+} (+—+); dans le même tampon seul sans Cu^{2+} (○—○), $0.3 \cdot 10^{-3}$ M en Cu^{2+} (□—□).

Il est clair que les ions cuivreux, aux concentrations utilisées, inhibent beaucoup plus fortement l'oxydation du glucose que celle de l'acétate.

Oxydation de l'acétate, du glucose et des réserves cellulaires chez une levure préalablement marquée

Expérience: des cellules (*S. cerevisiae* Yeast foam) marquées au ^{14}C sont obtenues comme indiqué plus haut.

Activité de $3 \cdot 10^6$ cellules étalées et séchées: 28150 coups/20 min. Des échantillons de $6 \cdot 10^7$ cellules marquées sont mis en suspension dans les solutions indiquées ci-dessous et introduites dans des cuvettes de Warburg: (a) 2 ml de KH_2PO_4 M/15 contenant 10 mg d'acétate de soude; CuSO_4 : 0 ou $0.3 \cdot 10^{-3}$ M. (b) 2 ml de KH_2PO_4 M/15 contenant 10 mg de glucose; CuSO_4 : 0, $0.15 \cdot 10^{-3}$, $0.3 \cdot 10^{-3}$ et $0.6 \cdot 10^{-3}$ M. (c) 2 ml KH_2PO_4 M/15; CuSO_4 : 0 et $0.3 \cdot 10^{-3}$ M.

Les cellules marquées sont incubées 15 min à 30° , avant la mise à zéro des manomètres et l'introduction des ions Cu^{2+} .

TABLEAU II

PRODUCTION DE $^{14}\text{CO}_2$ PAR $6 \cdot 10^7$ CELLULES MARQUÉES DE *S. cerevisiae* YEAST FOAM
DONT L'ACTIVITÉ EST 28150 COUPS-COMPTEUR/min

Les No. 1 et 2 correspondent à O—O et □—□ de la Fig. 4; les No. 4, 6, 8 et 10 correspondent à ○—○, ▲—▲, ■—■, +—+; les No. 11 et 12 correspondent à ●—● et ■—■. Les No. 3, 5 et 7 sont des doubles de 4, 6 et 8, mais sont sortis du bain thermostatique après 220 min, 100 min avant 4, 6 et 8.

Désignation et milieu	Concentration mM de Cu^{2+}	Temps d'incubation (min)	Coups/min dans KOH	O_2 consommé (μl)	Coups/min par μl d' O_2 consommé	Intervention des réserves dans la production de CO_2 (%)
1. Tampon seul	0		1289	144.5	8.9	100
2. Tampon seul	0.3		1207	136.5	8.9	100
3. Tampon + glucose	0	220	450	274	1.69	19
4. Tampon + glucose	0	320	695	402.5	1.73	19.5
5. Tampon + glucose	0.15	220	393	70	5.6	63
6. Tampon + glucose	0.15	320	637	98.5	6.47	72.7
7. Tampon + glucose	0.3	220	411	69	6	67
8. Tampon + glucose	0.3	320	557	85.5	6.5	73
10. Tampon + glucose	0.6	320	499	75.5	6.6	74.2
Différence entre 5 et 6	0.15	100	244	28.5	8.56	96.3
Différence entre 7 et 8	0.3	100	146	16.5	8.85	99.5
11. Tampon + acétate	0		1313	590	2.2	25
12. Tampon + acétate	0.3		1017	334	3.23	36

Pour chaque concentration d'ions Cu^{2+} de la série du glucose, la moitié des cuvettes sont retirées du bain thermostatique après 220 min de contact avec les ions Cu^{2+} , les autres 100 min plus tard.

La quantité de ^{14}C dans le CO_2 dégagé est déterminée.

Les résultats sont exprimés dans le Tableau II et la Fig. 4, après déduction du $^{14}\text{CO}_2$ produit durant la période d'incubation; ils confirment complètement les résultats des expériences précédentes.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Il est évident que l'action des ions cuivrés sur une cellule doit être multiple puisque le Cu²⁺ peut se fixer sur toute une série de substances et peut, par conséquent, altérer le métabolisme normal en de très nombreux points. Les ions Cu²⁺ peuvent par exemple réagir avec des protéines^{5,6} et des substances de la série nucléique^{7,8} pour former des complexes de stabilité fort variable. Nous avons montré que le milieu de Henneberg retient une partie du Cu²⁺ ajouté qui peut même se fixer sur la gélose³.

Certains enzymes sont très sensibles au Cu²⁺; la déshydrogénase lactique, qui réagit avec les ions Cu²⁺ (see ref. 9), l'est particulièrement^{10,11}. La lipase pancréatique est inhibée à 90 % par le cuivre $2 \cdot 10^{-5}$ M¹².

Nous avons observé une différence d'action des ions cuivrés sur les systèmes fermentaire et respiratoire de la levure. La fermentation anaérobie est totalement inhibée après 10 min de contact avec les ions Cu²⁺ dans le tampon de phosphate glucosé $0.15 \cdot 10^{-3}$ M en Cu²⁺; dans les mêmes conditions, la respiration est beaucoup moins affectée, elle se poursuit à vitesse presque constante pendant plus de 4 h, après un ralentissement initial.

Comme il faut trois fois plus de glucose pour produire un certain volume de CO₂, fermentaire que pour fixer le même volume d'O₂, la première hypothèse à envisager est que les ions cuivrés inhiberaient l'utilisation du glucose, tandis que le système d'oxydation des réserves cellulaires serait peu sensible aux ions Cu²⁺.

Les expériences que nous rapportons dans le présent travail montrent qu'en effet la production aérobique de ¹⁴CO₂ à partir de [¹⁴C]glucose, est rapidement inhibée par les ions Cu²⁺ $0.15 \cdot 10^{-3}$ et $0.3 \cdot 10^{-3}$ M (Tableau I et Fig. 1). La moitié du CO₂ radioactif est produit dans les 10 premières minutes et 80 % dans les 20 premières minutes; après 80 min, la levure ne produit plus de CO₂ radioactif, alors que la consommation d'oxygène se poursuit presque inchangée durant 3 h encore. En réalité, la production de ¹⁴CO₂ provenant du [¹⁴C]glucose est sans doute encore plus localisée au début du contact avec les ions Cu²⁺ que ne le montre la Fig. 1; il faut en effet un certain temps pour que tout le ¹⁴CO₂ soit absorbé par la potasse; de plus, il est vraisemblable qu'un peu de ¹⁴C s'incorpore rapidement dans la fraction la plus active des réserves cellulaires, pour être oxydé progressivement par la suite.

Il ressort clairement de ces premiers résultats qu'après un temps de contact suffisant (80 min), la levure respire activement sans oxyder le glucose extérieur; elle oxyde donc ses réserves.

La Fig. 2 confirme que l'oxydation des réserves cellulaires n'est guère sensible aux ions Cu²⁺, même à la concentration la plus élevée ($0.6 \cdot 10^{-3}$ M).

L'oxydation de l'acétate de soude est également beaucoup moins sensible aux ions Cu²⁺ que celle du glucose (Figs. 3 et 4).

Le cycle de Krebs doit être considéré comme la voie principale d'oxydation chez la levure^{13,14}, bien que le système d'oxydation directe¹⁵ et le cycle du glyoxylate^{16,17} puissent y fonctionner; il apparaît donc, dans les limites de nos expériences, que les enzymes du cycle de Krebs ne sont affectés que relativement peu et lentement par le Cu²⁺. Les systèmes transporteurs de la chaîne respiratoire sont également peu sensibles au Cu²⁺, puisque, lorsque la levure utilise l'acétate, ils permettent une consommation intense d'oxygène, même en présence de Cu²⁺ ($0.6 \cdot 10^{-3}$ M). On peut en conclure que les enzymes et transporteurs du système respiratoire réagissent peu avec

le Cu²⁺ ou bien qu'ils fonctionnent dans une région de la cellule qui est peu accessible à ces ions.

L'emploi d'une levure marquée au ¹⁴C et la mesure du ¹⁴CO₂ recueilli dans la potasse (Tableau II) montrent qu'il existe un turnover important du carbone cellulaire quand les cellules sont incubées dans du tampon de phosphate additionné de glucose ou d'acétate.

Selon INGRAM¹⁸, les ions Hg²⁺ inhibent l'oxydation du glucose par la levure et sont sans effet sur l'oxydation des réserves; ces phénomènes, qui sont comparables à ceux que nous avons observés avec les ions Cu²⁺, sont dus à l'inactivation de l'hexokinase. D'autre part, ROTHSTEIN¹⁹ a montré que les ions Cu²⁺ et Hg²⁺ inhibent rapidement la pénétration du glucose dans les cellules musculaires, en agissant au niveau de la membrane cellulaire. Le rapprochement de nos résultats et de ceux des deux auteurs cités mène à l'idée que les ions cuivre bloquent l'une des premières étapes de l'utilisation du glucose par la levure et permet de penser que cet effet pourrait résulter d'une inhibition de l'hexokinase ou du mécanisme de pénétration du glucose.

RÉSUMÉ

1. L'utilisation du glucose par la levure (*Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces ellipsoideus*) en tampon de phosphate est assez rapidement inhibée par les ions Cu²⁺ aux concentrations $0.15 \cdot 10^{-3}$ M ou $0.30 \cdot 10^{-3}$ M. Dès lors, les cellules n'oxydent plus que leurs réserves.

2. L'oxydation de l'acétate et des réserves intracellulaires n'est que très peu affectée par les ions Cu²⁺. Les enzymes du cycle de Krebs et la chaîne respiratoire ne sont guère inhibés par les ions Cu²⁺; ils y sont insensibles, ou bien ils se trouvent dans des régions de la cellule où les ions cuivre ne pénètrent pas ou ne pénètrent que lentement.

BIBLIOGRAFIE

- ¹ T. MINAGAWA, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 539.
- ² A. ANTOINE, *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 69 (1961) 93.
- ³ A. ANTOINE, *Etude Biochimique et Génétique de la Résistance au Cu²⁺ chez la Levure*, Editions Duculot, Gembloux-Belgique, 1962.
- ⁴ P. SLONIMSKI, communication personnelle.
- ⁵ H. A. SAROFF ET W. L. CHOATS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 74 (1958) 245.
- ⁶ R. LEBERMAN ET B. R. RABIN, *Nature*, 183 (1959) 747.
- ⁷ E. FRIEDEN ET J. ALLES, *J. Biol. Chem.*, 230 (1958) 797.
- ⁸ G. ZUBAY ET P. DOTY, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 47.
- ⁹ P. SNODGRASS ET F. L. HOCH, *Federation Proc.*, 18 (1959) 326.
- ¹⁰ A. CURDEL, L. NASLIN ET F. LABEYRIE, *Compt. Rend.*, 249 (1959) 1959.
- ¹¹ C. A. APPLEBY ET R. K. MORTON, *Nature*, 173 (1954) 749.
- ¹² E. D. WILLS, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 481.
- ¹³ A. STOPPANI, S. DE FAELUKES, L. COUCHES ET F. SACERDOTE, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 444.
- ¹⁴ H. L. KORNBERG ET J. R. SADLER, *Nature*, 185 (1960) 153.
- ¹⁵ F. DICKENS ET G. E. GLUCK, *Biochem. J.*, 50 (1952) 81.
- ¹⁶ J. A. OLSON, *Nature*, 174 (1954) 695.
- ¹⁷ H. L. KORNBERG ET H. A. KREBS, *Nature*, 179 (1957) 988.
- ¹⁸ M. INGRAM, *An Introduction to the Biology of Yeast*, Pitman and Sons Ltd., London, 1954, p. 98.
- ¹⁹ A. ROTHSTEIN, *Federation Proc.*, 18 (1959) 1026.