

BBA 45566

A PROPOS DE LA NATURE ET DU RÔLE D'UN PIGMENT ABSORBANT A 503 m μ CHEZ CERTAINES LEVURES

PIERRE LABBE, CHRISTIANE VOLLAND ET PAULETTE CHAIX

Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Paris, Paris (France)

(Reçu le 12 octobre, 1966)

(Manuscrit révisé reçu le 30 janvier, 1967)

SUMMARY

The nature and function of a 503 m μ absorbing pigment present in some yeasts

The 503 m μ absorption band is particularly strong in the spectra of yeasts harvested in the exponential growth phase from anaerobic or aerobic cultures on synthetic medium. This absorption band disappears after aeration in the absence of glucose.

The action of various oxidizing or reducing agents on the spectra of either intact cells or soluble fraction of yeasts has been investigated; analogous experiments have been made with protoporphomethene in solution ($\lambda_{\text{max}} = 503 \text{ m}\mu$) prepared from protoporphyrin. The similarity between the results in the two cases has led us to postulate the protoporphomethenic nature of yeast P₅₀₃.

The function of the P₅₀₃ pigment in cellular metabolism remains undetermined.

INTRODUCTION

Différents auteurs¹⁻⁶ ont noté dans le spectre de certaines levures cultivées soit en aérobiose, soit en anaérobiose, la présence de 2 bandes d'absorption situées l'une à 583.5 m μ et l'autre à 503 m μ , qu'on ne peut attribuer à des cytochromes. En ce qui concerne celle située à 583.5 m μ , il a été montré qu'elle correspondait à la bande d'absorption α de la protoporphyrine-zinc⁷. La bande d'absorption située, aussi bien à la température ordinaire qu'à celle de l'azote liquide, à 503 m μ * (réf. 4), disparaît en présence d'hydrosulfite.

Nous avons déterminé dans quelles conditions de culture des levures, apparaissait le composé** responsable de l'absorption à 503 m μ , et, comme il a été prouvé que les porphométhènes ou tétrahydroporphyrines, oxydables en porphyrines et réductibles en porphyrinogènes *in vitro* (Fig. 3), absorbaient vers 500 m μ , nous avons recherché si de tels composés pourraient être considérés comme responsables de la bande d'absorption située à 503 m μ chez la levure.

* Présente également chez d'autres microorganismes^{8,9} que les levures.

** Ce composé sera, au cours de ce mémoire, désigné provisoirement sous le nom de P₅₀₃.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET TECHNIQUES

Toutes les expériences sont réalisées avec *Saccharomyces cerevisiae*, souche Yeast Foam diploïde.

Toutes les incubations sont faites à 25°.

Conditions de culture

La composition des milieux liquides synthétiques ou complexes utilisés pour les cultures aérobies ou anaérobies a été précédemment décrite¹⁰⁻¹².

Les *précultures* ont été faites en aérobiose dans des erlenmeyers de 500, 2000 ou 3000 ml contenant 100, 500 ou 1000 ml de milieu ensemencé à partir de la souche conservée sur gélose inclinée; leur agitation est assurée par rotation d'un barreau aimanté⁴.

Les *cultures* aérobies et anaérobies ont été réalisées, soit dans des ballons de 6 l contenant 3 l de milieu¹⁰, soit dans un "fermenteur"¹³ contenant 30 ou 50 l de milieu, soit dans un "fermenteur BIOSYNTA" modifié contenant 14 l de milieu.

L'aération des milieux aérobies est assurée par injection d'air comprimé, filtré sur filtre Seitz, à raison de 1 l d'air par min par l de milieu.

Les milieux destinés aux cultures anaérobies sont saturés d'azote U (moins de 5 ppm d'O₂) durant 90 min avant l'ensemencement.

Les courbes de croissance des précultures et cultures sont établies à partir de mesures néphélométriques à l'aide du photomètre Coleman Jr. à 500 mμ (réf. 10).

La récolte des levures est effectuée à un point précis de la courbe de croissance. Après avoir bloqué la multiplication cellulaire par brusque abaissement de température à 2-4°, les levures sont récoltées à 0° soit avec une "International centrifuge PR-2" dans le cas des faibles volumes¹², soit avec une centrifugeuse continue Sharples refroidie dans le cas des grands volumes¹³. Dans le cas des levures cultivées en anaérobiose, un certain nombre de précautions doivent être prises pour éviter tout contact avec l'air^{4,12}.

Préparation des homogénats

Le broyage des levures est effectué à l'aide du "Zell Homogenisator" Braun¹⁴ suivant la technique précédemment décrite⁴. On réalise deux sortes de préparations suivant qu'on opère en présence ou en absence d'air.

(1) Broyage en présence d'air en tampon Tris 0.1 M, pH 7.0, suivi d'une centrifugation de 20 min à 3000 × g pour éliminer les cellules entières et les gros débris cellulaires; le surnageant constitue l'*homogénat* H₁.

(2) Broyage sous courant d'azote U dans une solution de lactose 1 M, Tris 0.1 M, pH 7.0, saturée d'azote U, suivi d'une centrifugation de 20 min à 3000 × g; le surnageant constitue l'*homogénat* H₂.

Eventuellement les homogénats sont centrifugés 90 min à 105000 × g pour séparer la phase soluble des particules.

Spectrophotométrie

Les spectres d'absorption sont effectués à la température ordinaire à l'aide du spectrophotomètre enregistreur Lérès Spila D.M.S.

Les spectres de différence des homogénats H₁ et H₂ et des fractions solubles sont effectués en cuves.

Les spectres des cellules de levures sont effectués de la manière suivante: une pâte de levure (obtenue par sédimentation d'une suspension de cellules de levures à $13000 \times g$ pendant 5 min) est placée dans un anneau de plexiglas d'épaisseur 0.8 mm pressé entre 2 lames de plexiglas. Pour éliminer l'influence des phénomènes de diffusion, on place dans la voie référence du spectrophotomètre un témoin de diffusion convenablement choisi*. Les courbes spectrales ainsi obtenues ne permettent pas une évaluation quantitative des pigments présents au sein des cellules, mais elles permettent: – le repérage des maxima d'absorption à $1 m\mu$ près, de 450 à $650 m\mu$; – l'évaluation des intensités relatives des bandes d'absorption d'une même préparation; – une comparaison entre les spectres de différentes pâtes de levures ayant subi divers traitements mais sédimentées et examinées dans les mêmes conditions.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

(1) Influence des conditions de culture de la levure sur la présence et l'intensité de la bande d'absorption située à $503 m\mu$

Les spectres des cellules récoltées en phase exponentielle de croissance, aérobie ou anaérobie (Fig. 1) montrent que la bande d'absorption située à $503 m\mu$ est beaucoup plus intense dans le cas de levures cultivées sur milieu synthétique** que dans le cas

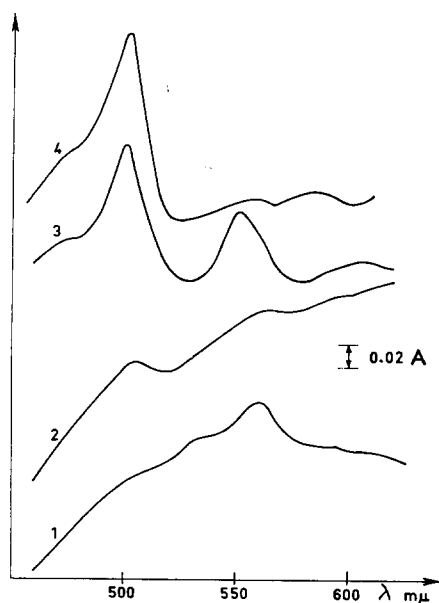


Fig. 1. Spectres de pâtes de levures récoltées en phase exponentielle de croissance (μ = taux de croissance). 1, aérobie sur milieu à l'extrait de levure ($\mu = 0.75$); 2, anaérobie sur milieu à l'extrait de levure ($\mu = 0.65$); 3, aérobie sur milieu synthétique ($\mu = 0.5$); 4, anaérobie sur milieu synthétique ($\mu = 0.5$).

* Une double épaisseur de papier mouillé (papier journal apprêté type Afnor I/I en 52 g) s'est révélée être un témoin dont l'absorption entre 450 et $650 m\mu$ est nulle et dont la diffusion en fonction de la longueur d'onde est parallèle à celle de la préparation de levure.

** A noter que le spectre des levures cultivées sur milieu synthétique présente en plus de la bande à $503 m\mu$ un épaulement vers $475 m\mu$.

de levures cultivées sur milieu complexe. Chez les levures récoltées en phase stationnaire de croissance, dans tous les cas, cette bande d'absorption est presque totalement absente.

Pour étudier les propriétés de P₅₀₃ nous avons utilisé la levure la plus riche en pigment, c'est-à-dire la levure cultivée en anaérobiose sur milieu synthétique et récoltée en phase exponentielle de croissance.

(2) *Influence de l'aération prolongée des levures, à l'état de "resting cells" sur la présence et l'intensité de la bande d'absorption à 503 mμ*

L'aération prolongée a été réalisée en présence ou en absence de glucose.

Les résultats consignés dans le Tableau I montrent que l'absorption à 503 mμ disparaît par aération en absence de glucose comme l'ont déjà signalé LINDENMAYER ET SMITH² et NOSOH¹. Un essai témoin incubé dans les mêmes conditions mais en atmosphère d'azote U ne présente qu'une très faible diminution de l'absorption à 503 mμ. L'aération n'a aucune influence sur l'absorption à 503 mμ si elle a lieu en présence de glucose ou à pH plus élevé (pH = 7.5).

MAUZERALL ET GRANICK¹⁵ ayant émis l'hypothèse que les porphométhènes pouvaient être photooxydables, nous avons également fait des essais d'aérations en présence de lumière blanche à 25° et à 0°. Les résultats obtenus (Tableau I) indiquent que P₅₀₃ n'est pas photooxydable *in situ*, dans les conditions réalisées.

D'autre part l'addition de glucose à une préparation préalablement aérée en absence de glucose jusqu'à disparition complète de P₅₀₃ provoque l'apparition d'une bande d'absorption à 503 mμ qui atteint son maximum en une quinzaine de minutes. Ce phénomène, signalé par NOSOH¹ et par LINDENMAYER ET SMITH², indique que la synthèse du pigment nécessiterait la présence d'un substrat carboné tel que le glucose.

TABLEAU I

INFLUENCE DE L'AÉRATION PROLONGÉE DE LEVURES EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE DE GLUCOSE SUR LA BANDE D'ABSORPTION À 503 mμ INITIALEMENT PRÉSENTE DANS CES CELLULES

Pour chaque essai 5 à 10 g de cellules de levure sont mis en suspension dans 200 ml de tampon phosphate 0.067 M, pH 4.5, ou 7.5 additionné ou non de glucose (0.05 M final). Les incubations sont réalisées à 25°, à l'obscurité dans des ballons à toxines de 2000 ml pendant 2 h. L'homogénéité est maintenue par agitation sur un plateau oscillant (120 périodes/min, amplitude 4 cm). L'aération des essais est assurée par injection continue d'air (4 l/min). Dans le cas des essais (a) et (b) soumis à une illumination fournie par 6 lampes à incandescence de 60 W chacune, distantes de 60 cm du fond des ballons, la température d'incubation a été de 25° (a) ou de 0° (b). Les spectres sont effectués sur les pâtes, dans les conditions décrites au paragraphe "Spectrophotométrie".

Conditions d'aération		Intensité de la bande d'absorption à 503 mμ après 2 h d'aération *
Sans glucose	pH = 7.5	+
	pH = 4.5 {	o
		o (a)
	lumière, 25°	++ (b)
	lumière, 0°	
Avec glucose	pH = 7.5	++
	pH = 4.5	+

* o, nulle; ++, intensité égale à l'intensité observée au temps zéro de l'incubation.

(3) *Localisation du pigment P_{503} dans la levure*

Quand le broyage des cellules de levure est effectué en présence d'air, on ne retrouve pas dans le spectre de l'homogénat H_1 la bande d'absorption à $503\text{ m}\mu$ (réf. 2). En revanche, le maximum d'absorption à $503\text{ m}\mu$ est présent dans le spectre de l'homogénat H_2 provenant d'une préparation effectuée sous courant d'azote U et on le retrouve dans la fraction soluble préparée à partir de cet homogénat (Fig. 2).

Quel que soit le mode de préparation des homogénats et des fractions solubles, leur spectre contient une bande d'absorption à $475\text{ m}\mu$ qui pourrait dépendre d'un composé analogue à celui mentionné par SLONIMSKI ET TAVLITZKI²² chez des levures cultivées sur des milieux synthétiques.

(4) *Tentatives de détermination de la constitution chimique de Pigment P_{503}*

MAUZERALL ET GRANICK¹⁵ et MAUZERALL^{16,17} travaillant sur l'uroporphométhène en solution aqueuse ont montré que cette molécule dont le pK est situé à pH 8.8 pouvait être réduite en uroporphyrinogène ou oxydée en uroporphyrine par action

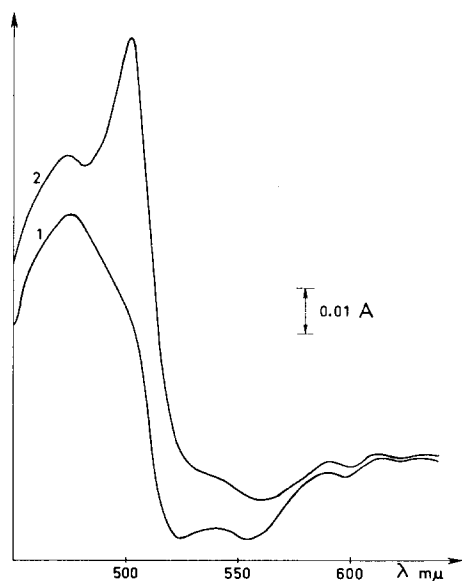


Fig. 2. Spectres de différence sous 1 cm (essai contre essai + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) des surnageants (90 min à $105000 \times g$) provenant: 1, d'un homogénat H_1 préparé en présence d'air; 2, d'un homogénat H_2 préparé sous courant d'azote U.

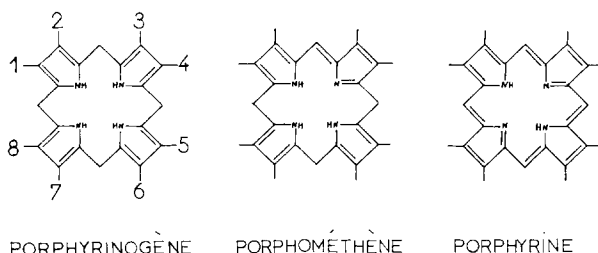


Fig. 3. Série "Uro": 1,3,5,8-acetyl-2,4,6,7-propionyl; Série "Proto": 1,3,5,8-méthyl-2,4-vinyl-6,7-propionyl.

de divers agents (NaBH_4 ; NaHSO_3 ; I_2 ; O_2), et que l'uroporphométhène pouvait donner un composé d'addition incolore par fixation de sulfite (et peut-être d'hydro-sulfite) sur le pont méthène (Fig. 3).

Nous avons tenté de préparer du protoporphométhène en appliquant la méthode de MAUZERALL¹⁷ à la protoporphyrine diméthylester. Par réduction avec TiCl_3 en milieu acide, nous avons obtenu la disparition des bandes d'absorption caractéristiques de la protoporphyrine et l'apparition d'une large bande d'absorption à $503 \text{ m}\mu$. La molécule responsable de cette absorption se comportant vis-à-vis des réducteurs, des oxydants et du sulfite d'une façon analogue à l'uroporphométhène: disparition de l'absorption à $503 \text{ m}\mu$ par action de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, NaBH_4 , Na_2SO_3 ; disparition de l'absorption à $503 \text{ m}\mu$ et apparition du spectre d'absorption de la protoporphyrine par action de I_2 et O_2 , nous en avons conclu que le protoporphométhène absorbait à $503 \text{ m}\mu$.

Il restait à prouver que l'absorption à $503 \text{ m}\mu$ chez la levure dépend de la présence de ce composé. Les expériences d'oxydation et de réduction de P_{503} sont irréalisables à pH acide sur les cellules de levure et sur les homogénats. Nous avons essayé de voir si à pH neutre les réducteurs, les oxydants et le sulfite exercent sur le spectre d'absorption de la levure et des homogénats des effets analogues à ceux qu'ils provoquent sur le protoporphométhène en solution acide.

Les conditions expérimentales ont été les suivantes. Dans le cas des cellules de levure préalablement mises en suspension dans l'eau (5 g levure poids frais par 30 ml d'eau) les différents réactifs ont été ajoutés à la concentration finale 10^{-2} à 10^{-3} M ; le spectre est effectué sur la pâte préparée dans les conditions décrites plus haut.

Dans le cas de l'homogénat H_2 , on effectue un spectre de différence entre 2 cuves contenant l'une l'homogénat, l'autre l'homogénat plus le réactif à la concentration finale 10^{-2} à 10^{-3} M .

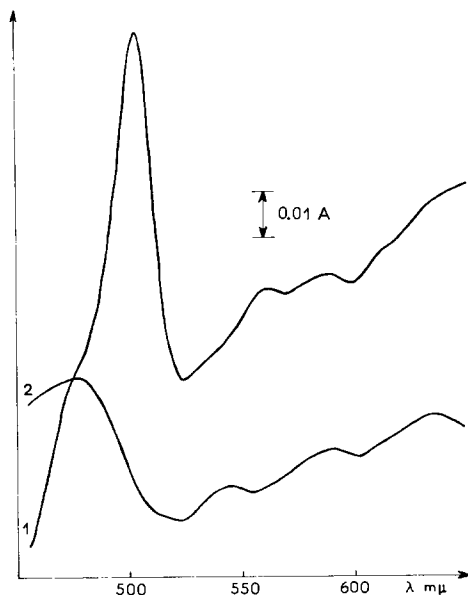


Fig. 4. Spectres de pâtes de levures récoltées en phase exponentielle de croissance anaérobie, sans (courbe 1), et avec (courbe 2) addition de HgCl_2 (10^{-3} M final).

Dans ces conditions, on observe, comme avec le protoporphométhène en solution, que les agents réducteurs (borohydrure, hydrosulfite) et le sulfite provoquent la disparition de la bande d'absorption à 503 m μ . L'addition de NaCN provoque aussi, comme l'avaient déjà constaté LINDENMAYER ET SMITH² et NOSOH¹, la disparition de P₅₀₃. Cette action pourrait s'expliquer par une fixation du cyanure sur le pont méthène, analogue à celle du sulfite.

L'action d'oxydants tels que l'iode, le ferricyanure et l'oxygène sur les cellules ou les homogénats ne provoque pas l'apparition du spectre de la protoporphyrine. On peut toutefois supposer qu'il y a eu néanmoins formation de protoporphyrine aux dépens du protoporphométhène et que, si cette substance n'a pu être décelée spectrophotométriquement, cela dépend peut-être du fait que la ferrochélatase présente^{7,18} incorpore le fer dans la protoporphyrine, au fur et à mesure de sa formation, pour donner du protohème dont le spectre d'absorption dans le visible est très faible. En faveur de cette hypothèse, il convient de mentionner que l'addition d'un oxydant tel que HgCl₂, capable d'oxyder en protoporphyrine le protoporphométhène en solution, et capable aussi d'inhiber la ferrochélatase, provoque chez la levure entière la disparition de l'absorption à 503 m μ et l'apparition des bandes I et III (632 m μ et 537 m μ) de la protoporphyrine neutre; la bande II (577 m μ) est confondue avec la bande à 583 m μ de la protoporphyrine-Zn déjà présente au temps zéro; quant à la bande IV (504 m μ) de la protoporphyrine, elle est masquée par la large absorption du pigment absorbant vers 475 m μ (Fig. 4).

L'action des oxydants est à rapprocher des observations faites par COOPER⁹ sur *Rhodopseudomonas spheroides* cultivé en anaérobiose: cet auteur a en effet constaté que, après exposition à l'air, le milieu de culture incolore de ce microorganisme devient rose par suite de formation de coproporphyrine III. Cette formation (accélérée par H₂O₂, I₂, Fe(CN)₆³⁻, retardée par cystéine et ascorbate) s'accompagne de l'apparition transitoire d'un composé absorbant à 500 m μ . D'après nos expériences, ce composé pourrait dépendre d'un coproporphométhène.

Par addition d'hydroxylamine à la levure dans les conditions précédemment décrites, nous avons observé comme LINDENMAYER ET SMITH², la disparition de l'absorption à 503 m μ sans apparition d'autre bande d'absorption dans la zone visible du spectre. Ce phénomène pourrait être dû à l'action réductrice de l'hydroxylamine: en effet l'absorption à 503 m μ du protoporphométhène en solution disparaît par action de l'hydroxylamine, et, par une addition ultérieure d'iode, il y a apparition du spectre caractéristique de la protoporphyrine.

Nous avons tenté de déterminer le pK de P₅₀₃ présent dans la fraction soluble d'un homogénat H₂ en opérant de la même manière que MAUZERALL ET GRANICK¹⁵ dans la zone de pH comprise entre 6.7 et 9.3. Si nous avons bien constaté que l'intensité de l'absorption à 503 m μ commence à décroître à pH 8 pour s'annuler vers pH 9, il ne nous a pas été possible de déterminer avec exactitude la valeur du pK: en effet la forte concentration en protéines et surtout la présence du pigment absorbant à 475 m μ (cf. Fig. 2) rendent difficiles des mesures quantitatives précises.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le fait que P₅₀₃ *in situ* dans les cellules de levure ou dans les homogénats réagit vis-à-vis de différents agents chimiques de la même manière que le protopor-

phométhène en solution indique que P₅₀₃ doit être un composé protoporphométhénique.

LINDENMAYER ET SMITH² ont émis l'hypothèse suivant laquelle P₅₀₃ pourrait être la forme semi-quinonique de l'ubiquinone; cette hypothèse semble difficile à retenir car d'une part on retrouve P₅₀₃ dans la fraction soluble (à 105 000 × g) des homogénats H₂, d'autre part on sait que la levure cultivée en anaérobiose contient très peu d'ubiquinone¹⁹. On ne peut pas non plus envisager que P₅₀₃ soit une forme semi-quinonique du FMN qui, dans certaines conditions (HCl 1 M), absorbe à 503 mμ, car dans des conditions physiologiques (pH neutre) ce composé absorberait à 565 mμ (réf. 20).

P₅₀₃ est abondant chez les levures récoltées en phase exponentielle de croissance aérobie ou anaérobie sur les milieux synthétiques que nous avons utilisés; mais il n'existe qu'en très faible quantité chez les levures provenant de cultures sur milieux complexes à l'extrait de levure. Si on fait l'hypothèse que P₅₀₃, capable de s'accumuler dans certaines conditions, est un précurseur des porphyrines, on peut supposer comme dans le cas de *R. sphaeroides*²¹ que l'extrait de levure apporte au milieu un facteur d'utilisation de ce précurseur.

Le fait que P₅₀₃ soit présent en quantités équivalentes chez les levures cultivées soit en anaérobiose soit en aérobie et que d'autre part son apparition et sa disparition ne suivent pas l'oxydation et la réduction des cytochromes², conduit à exclure, comme l'avait pensé NOSOH¹, sa participation directe au fonctionnement de la chaîne respiratoire. La disparition de P₅₀₃ au cours de l'aération des levures en tampon non glucosé pourrait s'expliquer par une oxydation du protoporphométhène en protoporphyrine conduisant ensuite à du protohème.

RÉSUMÉ

La bande d'absorption à 503 mμ est particulièrement intense dans les spectres de levures récoltées en phase exponentielle de croissance aérobie ou anaérobie sur milieu synthétique. Cette bande d'absorption disparaît par aération en absence de glucose.

Nous avons examiné l'action de divers agents réducteurs et oxydants sur les spectres de la levure entière et des homogénats obtenus à partir de cette levure; nous avons réalisé des expériences analogues sur du protoporphométhène en solution ($\lambda_{\max} = 503 \text{ m}\mu$) que nous avons préparé à partir de la protoporphyrine. La similitude des résultats obtenus dans les deux cas nous a conduits à postuler la nature protoporphométhénique de P₅₀₃ de la levure.

Le rôle du pigment P₅₀₃ dans le métabolisme cellulaire reste indéterminé.

REMERCIEMENTS

Nous remercions MARIE-JOSÉ GIRARD, Aide-chimiste C.N.R.S., pour son excellente collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Y. NOSOH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 105 (1964) 439.
- 2 A. LINDENMAYER ET L. SMITH, *Biochim. Biophys. Acta*, 93 (1964) 445.

- 3 A. W. LINNANE, *Oxidases and Related Redox Systems*, Amherst (Mass.), 1964, Vol. II, John Wiley, New York, 1965, p. 1102.
- 4 T. HEYMAN-BLANCHET, Thèse, Sciences, Paris, 1962.
- 5 M. M. ELKIND ET H. SUTTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 72 (1957) 84.
- 6 Y. NOSOH ET M. ITOH, *Plant Cell Physiol.*, 6 (1965) 771.
- 7 P. CHAIX ET P. LABBE, *Colloque International sur les Mécanismes de Régulation des Activités Cellulaires chez les Microorganismes*, Marseille, 1963, C.N.R.S., Paris, 1965, p. 481.
- 8 C. R. GOUCHER ET W. KOCHALATY, *Arch. Biochem. Biophys.*, 68 (1957) 30.
- 9 R. COOPER, *Biochem. J.*, 63 (1956) 25 P.
- 10 T. HEYMAN-BLANCHET ET P. CHAIX, *Biochim. Biophys. Acta*, 35 (1959) 85.
- 11 B. EPHRUSSI, P. SLONIMSKI, Y. YOTSUYANAGI ET J. TAVLITZKI, *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Serv. Phys.* 26 (1956) 87.
- 12 T. HEYMAN-BLANCHET, L. OHANIAN ET P. CHAIX, *Biochim. Biophys. Acta*, 81 (1964) 462.
- 13 P. LABBE ET P. CHAIX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 1281.
- 14 M. MERKENSCHLAGER, K. SCHLOSSMANN ET W. KURZ, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 332.
- 15 D. MAUZERALL ET S. GRNICK, *J. Biol. Chem.*, 232 (1958) 1141.
- 16 D. MAUZERALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 1832.
- 17 D. MAUZERALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (1962) 2437.
- 18 G. RIETHMULLER ET H. TUPPY, *Biochem. Z.*, 340 (1964) 413.
- 19 T. SUGIMURA ET H. RUDNEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 37 (1960) 560.
- 20 H. BEINERT, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 5323.
- 21 M. HIGUCHI ET G. KIKUCHI, *Nature*, 200 (1963) 1191.
- 22 P. P. SLONIMSKI ET J. TAVLITZKI, *Compt. Rend.*, 232 (1951) 2263.

Biochim. Biophys. Acta, 143 (1967) 70-78