

BBA 46139

EFFET DE L'ACCUMULATION DE Zn-PROTOPORPHYRINE PAR LA CELLULE DE LEVURE SUR LA SYNTHESE ET LE FONCTIONNEMENT DE SON SYSTEME RESPIRATOIRE

AGNÈS GILARDI, LISA DJAVADI-OHANIANC*, PIERRE LABBE ET PAULETTE CHAIX
Laboratoire de Chimie Biologique, Université de Paris, 96, Bd. Raspail, Paris 6e (France)

(Reçu le 22 février, 1971)

SUMMARY

Effect of Zn-protoporphyrin accumulation by yeast cells on synthesis and activity of their respiratory system

Yeast cells harvested from aerobic or anaerobic culture are able to synthesize considerable amounts of Zn-protoporphyrin, by aeration of resting cells in phosphate buffer (pH 8).

In yeast cells harvested from aerobic growth, Zn-protoporphyrin accumulation inhibits respiratory activity and produces some lethality. In yeast cells harvested from anaerobic growth this accumulation produces both a strong inhibition of cytochrome biosynthesis and of respiratory adaptation, accompanied by an important lethality.

Zn-protoporphyrin is accumulated into the mitochondrial fraction and causes a total inhibition of O_2 consumption by isolated mitochondria. The "in vitro" addition of purified Zn-protoporphyrin to intact mitochondria induces a lost of respiratory control.

INTRODUCTION

Dans un précédent travail¹, nous avons mis en évidence que l'"adaptation respiratoire" des levures contenant de la Zn-protoporphyrine (c'est-à-dire ayant été cultivées en anaérobiose sur milieu synthétique additionné de Zn^{2+} ($2.5 \cdot 10^{-6}$ M)**) est moins rapide que l'"adaptation respiratoire" des levures provenant d'une culture faite dans les mêmes conditions sur le même milieu non additionné de Zn^{2+} , chez lesquelles la Zn-protoporphyrine n'est pas décelable.

Les nouvelles expériences réalisées ont pour but de chercher si cette inhibition de l'"adaptation respiratoire" est directement liée ou non à l'accumulation de Zn-protoporphyrine dans la cellule. On peut supposer, en effet, que la présence de Zn-protoporphyrine est capable d'entraîner l'inhibition de la synthèse et du fonctionnement du système respiratoire. Cette inhibition pourrait être liée soit à une compétition entre la Zn-protoporphyrine et des précurseurs de la synthèse des hémoprotéines,

* Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Téhéran, Iran.

** Une telle concentration en Zn^{2+} n'est pas toxique mais au contraire stimulatrice de la croissance des levures.

soit à une désorganisation des membranes mitochondriales due au fait que la Zn-protoporphyrine est une molécule lipophile susceptible de pénétrer dans les zones phospholipidiques des membranes.

En vue de vérifier ces hypothèses:

(1) Nous avons mis au point un procédé d'enrichissement contrôlé en Zn-protoporphyrine de cellules de levure provenant de cultures anaérobies ou aérobies.

(2) Nous avons étudié les effets de cet enrichissement en Zn-protoporphyrine: (a) sur la cinétique de l'“adaptation respiratoire” (appréciée d'après des mesures de respiration et des déterminations spectrales) de cellules de levures provenant de cultures anaérobies; (b) sur l'activité respiratoire de cellules de levures provenant de cultures aérobies en recherchant si les inhibitions observées étaient corrélatives de la mort des cellules; (c) sur l'activité respiratoire et sur les “phosphorylations oxydatives” de la fraction mitochondriale de cellules de levures provenant de cultures aérobies.

(3) Nous avons enfin étudié l'effet de l'addition “*in vitro*” de Zn-protoporphyrine purifiée sur l'activité respiratoire de la fraction mitochondriale de cellules de levures provenant de cultures aérobies et exemptes de Zn-protoporphyrine.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET TECHNIQUES

Cultures

La souche utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* “yeast foam” diploïde.

Les cultures anaérobies et leur récolte sont réalisées dans les conditions précédemment décrites¹. Les cultures aérobies sont réalisées dans des ballons de 6 l contenant 2 l du milieu synthétique H₃ (réf. 2) additionné ou non de ZnSO₄ (2.6 · 10⁻⁶ M). L'homogénéité et l'aération de la culture sont assurées par agitation magnétique et injection d'air à raison de 2 l/min. Les levures sont toujours récoltées au même point de la phase exponentielle de croissance.

Nous appellerons: “levures A(+)Zn” les levures dont la croissance s'est effectuée en aérobiose sur un milieu contenant Zn²⁺ (2.6 · 10⁻⁶ M) et “levures N(+)Zn” les levures dont la croissance s'est effectuée en anaérobiose sur le même milieu. D'après une notation homologue, nous appellerons “levures A(−)Zn” et “levures N(−)Zn” les levures cultivées respectivement en aérobiose et en anaérobiose sur un milieu non additionné de Zn²⁺.

Enrichissement des cellules en Zn-protoporphyrine

Après récolte et lavage, les cellules sont mises en suspension non proliférante (à raison de 3 mg de poids sec de levure par ml) dans du tampon phosphate (KH₂PO₄ 0.067 M) ajusté à pH 4.5 ou à pH 8, en absence de source de carbone. Cette suspension est répartie par fractions de 200 ml dans des ballons à toxine d'une capacité de 2 l. Les ballons, traversés par un courant d'air comprimé, sont agités pendant 3 h ou 6 h à 25° sur un plateau oscillant. Nous appellerons “préincubation” cette aération à différents pH, en absence de source de carbone, permettant d'obtenir un enrichissement contrôlé des cellules en Zn-protoporphyrine.

Adaptation respiratoire des levures provenant de cultures anaérobies

Aussitôt après la récolte ou après un certain temps de “préincubation”, les cellules issues de cultures anaérobies sont aérées pendant 3 h, dans les mêmes conditions

que pour l'enrichissement en Zn-protoporphyrine, mais dans du tampon phosphate à pH 4,5, additionné de glucose 1 %. Nous appellerons "adaptation" cette aération en présence de glucose qui entraîne la synthèse du système respiratoire.

Spectres à basse température

Les spectres hématiniques des levures entières et de la fraction mitochondriale sont réalisés à la température de l'azote liquide par la technique de LABBE ET CHAIX³.

Détermination du taux de létalité des levures

Après comptage (avec un hématimètre) du nombre de cellules contenues dans une fraction aliquote de la suspension de levures étudiée, des volumes connus de cette suspension convenablement diluée, sont ensemencés par étalement dans 10 boîtes de Pétri, sur un milieu gélosé contenant 3 % de glucose. Les colonies sont comptées après 3 jours d'incubation à 25° à l'obscurité. Le nombre de colonies apparues est donné par la moyenne des comptages sur les 10 boîtes. Le taux de létalité des cellules présentes dans la suspension de levures étudiée, est égal au rapport :

$$\frac{\text{nombre de colonies apparues}}{\text{nombre de cellules ensemencées}}$$

Préparation des mitochondries

La lyse de la paroi des cellules de levure par le suc digestif d'*Helix pomatia* et le fractionnement des protoplastes sont effectués d'après la technique d'OHNISHI *et al.*⁴, modifiée par VOLLAND ET CHAIX⁵. Quand il s'agit de levures provenant de cultures sur un milieu synthétique, il est nécessaire de procéder à une incubation préalable des cellules en présence de mercaptoéthylamine⁶.

Vitesses de respiration. Rapport P/O

(a) *Cellules entières*. Les vitesses de respiration des cellules entières ont été mesurées par la technique manométrique de Warburg dans les conditions décrites précédemment¹.

(b) *Mitochondries*. Les vitesses de consommation d'oxygène et les valeurs de P/O des mitochondries ont été déterminées par la méthode polarographique à l'aide d'une électrode de Clark couplée à un Oxygraph Gilson. Le milieu utilisé pour ces mesures est celui décrit par OHNISHI *et al.*⁴, modifié par VOLLAND ET CHAIX⁵. Le substrat de respiration des mitochondries est le succinate; ADP est ajouté de façon à obtenir une concentration finale de 125 μ M. Pour étudier l'effet de la Zn-protoporphyrine purifiée, celle-ci est ajoutée "in vitro" aux mitochondries, sous forme de solution éthanolique, dans la cellule de mesure de l'Oxygraph; la consommation d'oxygène des mitochondries est mesurée avant et après cette introduction; ADP est ajouté 5 min après la Zn-protoporphyrine, et le contrôle respiratoire est comparé à celui d'un témoin non additionné de Zn-protoporphyrine.

Préparation de la Zn-protoporphyrine en solution éthanolique

La Zn-protoporphyrine est extraite d'homogénats de levure incubés à 0-4° pendant plusieurs jours, suivant la méthode de CHAIX ET LABBE⁷. Le dosage de la Zn-protoporphyrine en solution dans l'éthanol est effectué par spectrophotométrie à $\lambda = 417$ nm ($\epsilon_{\text{mM}} = 224$).

Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY *et al.*⁸ en utilisant le lysozyme comme protéine de référence.

RÉSULTATS

(I) *Accumulation de Zn-protoporphyrine dans les cellules de levure et ses effets*(1) *Enrichissement en Zn-protoporphyrine des cellules de levure*

La Zn-protoporphyrine en solution dans l'éthanol est caractérisée par un spectre d'absorption à 3 bandes: $\alpha = 583.5$ nm; $\beta = 545$ nm et $\gamma = 417$ nm⁷; sa présence dans les cellules de levures se manifeste essentiellement dans la zone visible par la bande située à $\lambda = 583.5$ nm.

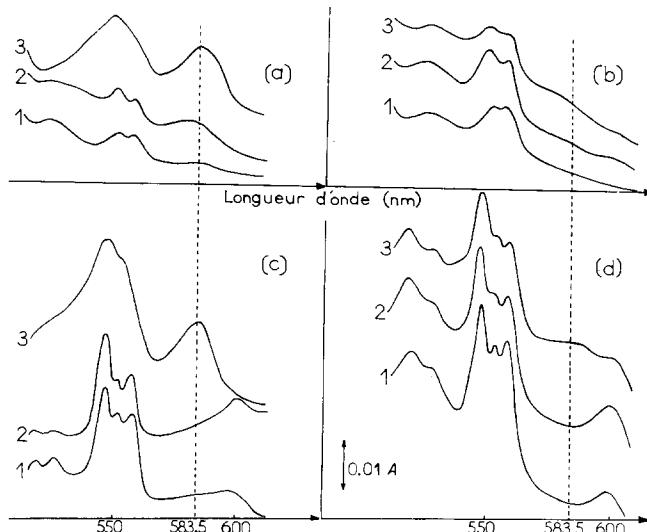


Fig. 1. Enrichissement en Zn-protoporphyrine ($\alpha = 583.5$ et $\beta = 545$ nm) des cellules de levures au cours de leur "préincubation" en présence d'air, à différents pH, en tampon phosphate (0.067 M), sans source de carbone. (Spectres réalisés à basse température.) (a) Levures N (+) Zn. (b) Levures N (-) Zn. 1, au temps 0 de la préincubation; 2, après 3 h de préincubation à pH 4.5; 3, après 3 h de préincubation à pH 8. (c) Levures A (+) Zn. (d) Levures A (-) Zn. 1, au temps 0 de la préincubation; 2, après 6 h de préincubation à pH 4.5; 3, après 6 h de préincubation à pH 8.

La Fig. 1 montre les spectres hématiniques des levures, avant et après leur préincubation à différents pH en absence de glucose. Les levures N (+) Zn provenant de cultures en anaérobiose dans un milieu additionné de Zn^{2+} (Fig. 1a) possèdent au moment de la récolte le cytochrome b_1 , absorbant à 552.5 et 558 nm (Spectre a-1) ainsi qu'une très faible quantité de Zn-protoporphyrine. Une préincubation de ces levures pendant 3 h à pH 4.5 (Spectre a-2) entraîne une légère accumulation de Zn-protoporphyrine. En revanche, la préincubation pendant 3 h à pH 8 (Spectre a-3) entraîne une synthèse si importante de Zn-protoporphyrine que la bande $\beta = 545$ nm de son spectre masque les deux bandes d'absorption du cytochrome b_1 .

Dans le cas des levures N (-) Zn (Fig. 1b) qui ne contiennent à la récolte que du cytochrome b_1 (Spectre b-1), une préincubation de 3 h soit à pH 4.5 (Spectre b-2), soit à pH 8 (Spectre b-3) n'entraîne aucune synthèse de Zn-protoporphyrine.

TABLEAU I
INFLUENCE DE L'ENRICHISSEMENT EN Zn-PROTOPORPHYRINE (PAR PRÉINCUBATION À pH 4.5 OU À pH 8) SUR LA VITESSE DE RESPIRATION ET LE TAUX DE LÉTALITÉ DES LEVURES A(+)Zn ET A(−)Zn

Q_{O_2} = μ l d'oxygène par h par mg de poids sec de levure. L'inhibition du Q_{O_2} est calculée par rapport au Q_{O_2} au temps 0 de la préincubation. Le taux de léthalité représente le pourcentage de cellules incapables de se multiplier à la fin des temps de préincubation indiqués.

Durée de la préincubation (h)	Levures A(+)Zn			Levures A(−)Zn		
	pH 4.5		pH 8		pH 4.5	
	Taux de léthalité (%)	Inhibition du Q_{O_2} (%)	Taux de léthalité (%)	Inhibition du Q_{O_2} (%)	Taux de léthalité (%)	Inhibition du Q_{O_2} (%)
0	4	61	0	4	59	0
3	5	60	0	15	35.5	42
6	5	79	0	30	19	70
				—	—	—
				—	73	0
				—	7	71
				—	5	58
				—	—	0

Les levures A(+)Zn provenant de cultures aérobies dans un milieu additionné de Zn²⁺ (Fig. 1c), possèdent, au moment de la récolte, les cytochromes de la chaîne respiratoire (Spectre c-1) et des traces à peine décelables de Zn-protoporphyrine. La préincubation de ces levures pendant 6 h à pH 4.5 n'entraîne aucune formation décelable de Zn-protoporphyrine (Spectre c-2). Mais la préincubation de ces levures pendant 6 h à pH 8 a pour effet une synthèse très importante de Zn-protoporphyrine (Spectre c-3).

Les Spectres 1, 2 et 3 de la Fig. 1d montrent que la préincubation 6 h à pH 4.5 ou à pH 8 des levures A(−)Zn n'entraîne aucune modification notable du spectre hématinique: ces levures restent dépourvues de Zn-protoporphyrine.

En conclusion, une accumulation de Zn-protoporphyrine peut être obtenue aussi bien chez les levures A(+)Zn que chez les levures N(+)Zn par une aération à pH 8 en absence de glucose. Ces mêmes levures aérées à pH 4.5 en absence de glucose n'accumulent pas de Zn-protoporphyrine. L'aération à pH 4.5 ou à pH 8 des levures A(−)Zn et N(−)Zn n'entraîne aucune synthèse de Zn-protoporphyrine.

(2) *Effet de l'enrichissement en Zn-protoporphyrine sur la vitesse de respiration et le taux de létalité des cellules de levure issues de cultures aérobies*

Le Tableau I permet de comparer les valeurs de Q_{O_2} et les taux de létalité des levures A(+)Zn et A(−)Zn après différentes durées de préincubation en absence de glucose, soit à pH 4.5, soit à pH 8.

Aussi bien dans le cas des levures A(+)Zn que dans le cas des levures A(−)Zn, on voit qu'une préincubation à pH 4.5 (ne provoquant aucune formation décelable de Zn-protoporphyrine) n'entraîne ni inhibition du Q_{O_2} , ni augmentation du taux de létalité. Il y a même, dans ces conditions, une augmentation du Q_{O_2} due au phénomène d'entraînement à la respiration. Ce phénomène est observé également dans le cas des levures A(−)Zn préincubées 6 h à pH 4.5 ou pH 8, qui ne synthétisent pas non plus de Zn-protoporphyrine.

En revanche, la diminution du Q_{O_2} , (42 % après 3 h; 70 % après 6 h de préincubation), des levures A(+)Zn préincubées à pH 8, est corrélative d'un enrichissement en Zn-protoporphyrine. Chez ces levures, le taux de létalité est également augmenté (15 % après 3 h; 30 % après 6 h de préincubation). Toutefois, la diminution observée du Q_{O_2} ne s'explique pas entièrement par l'élévation du taux de létalité, et il apparaît que des cellules de levure encore capables de se multiplier possèdent une activité respiratoire déficiente.

(3) *Activité respiratoire et phosphorylations oxydatives de la fraction mitochondriale de levures plus ou moins enrichies en Zn-protoporphyrine*

Nous avons cherché à savoir si la Zn-protoporphyrine décelée dans les cellules de levure se retrouvait ou non dans la fraction mitochondriale, et quels étaient les effets de l'accumulation de la Zn-protoporphyrine sur la respiration et la phosphorylation des mitochondries isolées.

Le spectre des mitochondries isolées de levures A(+)Zn préincubées 6 h à pH 4.5 (Fig. 2, Spectre a), ne révèle pas d'accumulation de Zn-protoporphyrine. Celui des mitochondries isolées des mêmes levures préincubées 6 h à pH 8 (Fig. 2, Spectre b) montre qu'au cours de la préincubation à pH 8, la Zn-protoporphyrine s'est accumulée dans la fraction mitochondriale. Ce pigment n'est décelable dans aucune autre fraction sub-cellulaire.

Nous pouvons en conclure que la Zn-protoporphyrine s'accumule en grande

quantité dans les mitochondries. Comme dans le spectre des mitochondries chargées en Zn-protoporphyrine (Fig. 2b), les bandes α des cytochromes n'apparaissent pas, la question se posait de savoir si ceux-ci étaient présents ou s'ils avaient été détruits. Il a été possible d'y répondre en détruisant "in situ" la Zn-protoporphyrine par photolyse en présence d'oxygène*. Les mitochondries chargées en Zn-protoporphyrine et illuminées pendant 30 min, présentent le spectre donné Fig. 2c où l'on voit que les

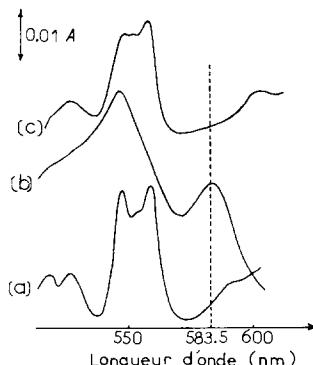


Fig. 2. Spectres à basse température de la fraction mitochondriale de levures A (+) Zn préincubées: (a) 6 h à pH 4.5. (b) 6 h à pH 8. (c) Même fraction qu'en (b) ayant subi une illumination de 30 min en présence d'oxygène.

bandes d'absorption dues à la Zn-protoporphyrine (545 et 583.5 nm) ont totalement disparu, alors que les bandes d'absorption des cytochromes se détachent clairement.

La respiration des mitochondries chargées en Zn-protoporphyrine (provenant de levures A (+) Zn préincubées à pH 8) est presque totalement inhibée (*cf.* Tableau II): le Q_{O_2} est à peine mesurable et ces mitochondries ne phosphorylent plus. Autrement dit, l'accumulation de Zn-protoporphyrine dans les mitochondries entraîne des altérations très importantes de leur système respiratoire.

TABLEAU II

ACTIVITÉS RESPIRATOIRES, P/O, ET COEFFICIENT DE CONTRÔLE RESPIRATOIRE EN PRÉSENCE DE SUCCINATE, DE MITOCHONDRIES ISOLÉES À PARTIR DE LEVURES PLUS OU MOINS ENRICHIES EN ZN-PROTOPORPHYRINE

Q_{O_2} = natomes d'oxygène par min par mg de protéines mitochondrielles.

Levures	Préincubation de 6 h	Zn-protoporphyrine dans les cellules entières	Q_{O_2} des mitochondries	Coefficient de contrôle respiratoire	P/O
A (-) Zn	pH 4.5 pH 8	Non décelable Traces	80 43	3.0 2.7	1.6 1.4
A (-) Zn	pH 4.5 pH 8	Traces Grandes quantités	39 2	2.2 1	— 0

* Des essais préliminaires nous avaient en effet montré que le spectre de la Zn-protoporphyrine en solution éthanolique disparaît à la lumière blanche en présence d'oxygène.

(4) *Effet de l'enrichissement en Zn-protoporphyrine sur l'“adaptation respiratoire” et le taux de létalité de cellules de levure provenant de cultures anaérobies*

Cette étude est réalisée sur des cellules de levures provenant de cultures anaérobies préincubées à pH 4.5 ou pH 8, en absence de glucose, aussitôt après la récolte. Après des temps plus ou moins longs de préincubation, elles sont centrifugées, puis remises en suspension et aérées en tampon glucosé à pH 4.5*.

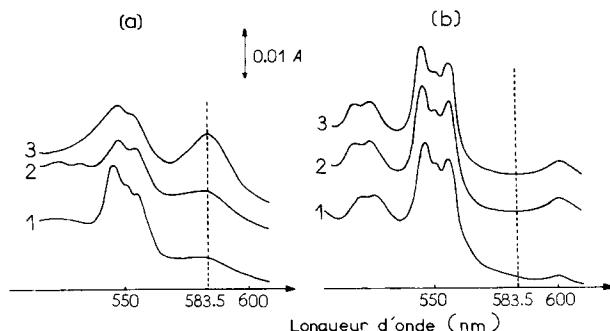


Fig. 3. Spectres hématiniques de levures issues de cultures anaérobies, préincubées à pH 4.5 ou à pH 8 et adaptées ensuite pendant 3 h. (a) Levures N(+)Zn. (b) Levures N(−)Zn. 1, levures témoin non préincubées; 2, levures préincubées 3 h à pH 4.5; 3, levures préincubées 3 h à pH 8.

Les levures N(+)Zn (Fig. 3a) faiblement ou fortement chargées en Zn-protoporphyrine (par préincubation de 3 h à pH 4.5 ou à pH 8) présentent respectivement après 3 h d'adaptation, les Spectres a-2 et a-3 qui révèlent une nette inhibition de la synthèse des cytochromes quand on les compare au Spectre a-1 des mêmes levures adaptées 3 h sans avoir subi de préincubation.

Les Spectres b-2 et b-3 de la Fig. 3 des levures N(−)Zn montrent que, quel

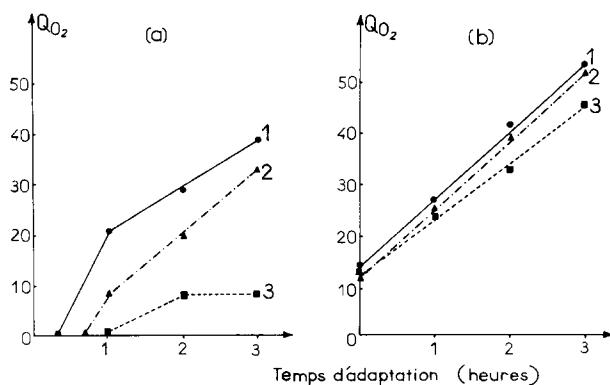


Fig. 4. Accroissement du Q_{O_2} au cours de l'adaptation (en présence d'air et de glucose) de levures issues de cultures anaérobies et ayant subi une préincubation à pH 4.5 ou à pH 8. (a) Levures N(+)Zn. (b) Levures N(−)Zn. 1, levures témoin non préincubées, adaptées pendant 3 h; 2, levures préincubées 3 h à pH 4.5, adaptées ensuite pendant 3 h; 3, levures préincubées 3 h à pH 8, adaptées ensuite pendant 3 h.

* Tous les essais ont montré que chez les levures N(+)Zn aussi bien que chez les levures N(−)Zn, le pH du milieu d'“adaptation” est sans influence ni sur la synthèse des cytochromes, ni sur l'activité respiratoire.

que soit le pH auquel s'est effectuée la préincubation, il n'y a aucune inhibition de la synthèse des cytochromes par rapport aux levures témoin non préincubées (Spectre b-1).

Les résultats de l'étude cinétique de l'apparition de l'activité respiratoire au cours de l'adaptation des levures N(+)Zn et N(−)Zn préincubées à pH 4.5 ou à pH 8 sont présentés sur la Fig. 4. On voit, comme nous l'avions déjà signalé¹, que l'adaptation démarre beaucoup plus rapidement chez les levures N(−)Zn (Courbes b, Fig. 4) que chez les levures N(+)Zn (Courbes a, Fig. 4). On voit de plus que les levures N(+)Zn enrichies en Zn-protoporphyrine par préincubation à pH 8 (Courbe a-3) ont une activité respiratoire après 3 h d'adaptation fortement inhibée par rapport à celle des levures N(−)Zn préincubées elles-aussi à pH 8 (Courbe b-3) mais exemptes de Zn-protoporphyrine. En outre, dans le cas des levures N(+)Zn (Courbes a-2 et a-3), la préincubation 3 h à pH 8 inhibe encore plus fortement l'apparition de l'activité respiratoire que la préincubation à pH 4.5.

TABLEAU III

INFLUENCE DE L'ENRICHISSEMENT EN ZN-PROTOPORPHYRINE (PAR PRÉINCUBATION À pH 4.5 OU À pH 8) SUR L'ADAPTABILITÉ DES LEVURES N(+)Zn ET LEUR TAUX DE LÉTALITÉ

L'adaptabilité des levures est représentée par la valeur de Q_{O_2} obtenue après 3 h d'adaptation. $Q_{O_2} = \mu\text{l d'oxygène par h par mg de poids sec de levure.}$

Durée de la préincubation (h)	pH 4.5			pH 8		
	Taux de léthalité (%)	Adaptation 3 h		Taux de léthalité (%)	Adaptation 3 h	
		Q_{O_2}	Inhibition du Q_{O_2} (%)		Q_{O_2}	Inhibition du Q_{O_2} (%)
0	5	54	0	5	39	0
1	10	49	10	18	29	25
3	13	45	20	60	8	80

En comparant (*cf.* Tableau III) les pourcentages d'inhibition de l'activité respiratoire (mesurée après une adaptation de 3 h) et les pourcentages de léthalité des levures N(+)Zn ayant subi des préincubations plus ou moins longues soit à pH 4.5, soit à pH 8, on voit qu'une préincubation à pH 4.5 influence peu l'adaptabilité et le taux de léthalité. En revanche, une préincubation à pH 8 provoque une très forte inhibition de l'adaptabilité (Q_{O_2} après adaptation diminué de 80 %) et un accroissement du taux de léthalité qui atteint 60 %. Il apparaît donc (comme dans le cas des levures A(+)Zn préincubées à pH 8), que l'inhibition des activités respiratoires ne s'explique pas complètement par la mort des cellules.

(5) *Etude des levures N(+)Zn ayant amorcé un début "d'adaptation respiratoire" avant d'être enrichies en Zn-protoporphyrine*

Comme le montrent les expériences résumées dans les Tableaux I et II, l'effet létal corrélatif d'un enrichissement en Zn-protoporphyrine est moins prononcé chez des levures possédant leur système respiratoire que chez celles qui en sont dépourvues. Pour préciser cette observation, nous avons tout d'abord fait subir à des levures N(+)Zn une amorce d'adaptation en présence de glucose, puis les cellules ainsi

traitées ont été enrichies en Zn-protoporphyrine par aération à pH 8 en absence de glucose.

Nous avons mesuré le taux de létalité à la fin de cette aération. Les résultats obtenus montrent qu'une "adaptation" préalable de 30 min fait passer le taux de létalité (mesuré après 3 h d'aération à pH 8) de 60 % à 17 %. Il apparaît donc bien que l'effet létal corrélatif de l'enrichissement en Zn-protoporphyrine est d'autant plus faible que la synthèse du système respiratoire de la levure est plus complète.

(II) *Etude des effets exercés par la Zn-protoporphyrine ajoutée "in vitro" à des mitochondries exemptes de ce pigment*

Il nous a paru intéressant d'examiner les effets de l'addition de Zn-protoporphyrine purifiée en solution éthanolique, à des mitochondries isolées à partir de levures A(—)Zn exemptes de ce pigment, et chez lesquelles il existe un bon couplage entre oxydation et phosphorylation: avec le succinate comme substrat, $P/O = 1.8$; contrôle respiratoire = 3.4. Dans ces conditions, l'addition de quantités croissantes de Zn-protoporphyrine supprime progressivement le contrôle respiratoire, qui disparaît totalement pour une concentration en Zn-protoporphyrine égale à $2.7 \cdot 10^{-7} M$ (Fig. 5). Nous n'avons pas observé jusqu'ici d'effets significatifs de la Zn-protoporphyrine à de telles concentrations sur la vitesse de consommation d'oxygène des mitochondries en absence d'ADP, (état 4).

Quoiqu'il en soit, les résultats concernant le contrôle respiratoire indiquent que la Zn-protoporphyrine purifiée ajoutée aux mitochondries entraîne une perturbation extrêmement rapide du processus des phosphorylations.

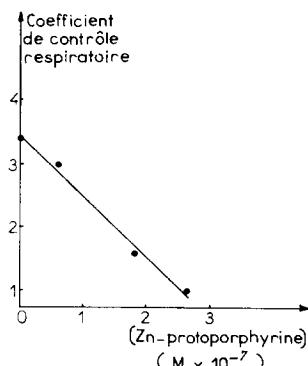


Fig. 5. Contrôle respiratoire des mitochondries après 5 min de contact avec la Zn-protoporphyrine dans la cellule de mesure de l'Oxygraph. Quantité de protéines dans les essais: 0.32 mg.

DISCUSSION

Il avait été précédemment montré^{1,14} que les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast Foam) provenant de cultures anaérobies sur milieu synthétique additionné de Zn^{2+} ($2.5 \cdot 10^{-6} M$) (levures N(+)-Zn) contiennent de la Zn-protoporphyrine alors que les levures provenant de cultures sur un milieu non additionné de Zn^{2+} (levures N(-)-Zn) n'en contiennent pratiquement pas.

Nous avons mis au point une méthode d'enrichissement en Zn-protoporphyrine

chez les levures N(+)Zn et A(+)Zn, par simple aération de celles-ci à pH 8 en absence de substrat carboné: la formation de Zn-protoporphyrine dans ces conditions s'explique d'une part par le fait que le système enzymatique de synthèse de la protoporphyrine, plus actif à pH 8 qu'à pH 4,5, est présent aussi bien dans la cellule de levure cultivée en aérobiose que chez celle cultivée en anaérobiose⁹, d'autre part par le fait que la ferrochétatase, enzyme lié à la membrane interne mitochondriale^{10,11}, est capable d'incorporer le zinc à la place du fer dans la protoporphyrine chez, la levure¹².

Nous avons montré que l'accumulation de la Zn-protoporphyrine par les cellules de levure entraîne des perturbations importantes:

(1) *Au niveau du fonctionnement du système respiratoire.* Chez la levure cultivée en aérobiose, l'accumulation de Zn-protoporphyrine entraîne une forte diminution de l'activité respiratoire. La Zn-protoporphyrine accumulée est localisée intégralement dans la fraction mitochondriale dont la respiration est pratiquement nulle. Le spectre d'absorption de cette fraction mitochondriale ne présente que les bandes d'absorption de la Zn-protoporphyrine; toutefois, la photolyse "in situ" de ce pigment démasque la présence des cytochromes de la chaîne respiratoire. L'addition "in vitro" de Zn-protoporphyrine à des mitochondries couplées provoque une inhibition irréversible du contrôle respiratoire.

Etant donné le caractère lipophile du chélate Zn-protoporphyrine et l'inhibition complète de la respiration qu'entraîne sa présence au sein des mitochondries, il est probable que l'accumulation de Zn-protoporphyrine conduit à une désorganisation de la structure mitochondriale, selon un mécanisme qui reste à élucider.

(2) *Au niveau de la synthèse du système respiratoire.* Chez la levure cultivée en anaérobiose et enrichie en Zn-protoporphyrine, la synthèse des enzymes respiratoires est inhibée et l'activité respiratoire mesurée après 3 h d'adaptation reste très faible. Comme le protohème et la Zn-protoporphyrine sont des molécules de structure très voisine, on peut supposer qu'il existe une compétition entre ces deux substances lors de la formation des cytochromes au cours de l'"adaptation respiratoire". Ceci expliquerait à la fois l'inhibition observée chez les levures N(+)Zn préincubées à pH 8, et l'inhibition de l'"adaptation respiratoire" observée chez les levures N(+)Zn non préincubées, chez lesquelles on décèle une faible quantité de Zn-protoporphyrine¹. Dans le cas de l'inhibition de l'"adaptation respiratoire" des levures enrichies en Zn-protoporphyrine, il est possible que cette molécule inhibe à la fois la synthèse et le fonctionnement du système respiratoire néoformé.

L'accumulation de Zn-protoporphyrine par la levure entraîne aussi pour une grande partie des cellules une incapacité à se multiplier. Nous avons décrit ce phénomène sous le nom de "létalité des cellules". Mais le taux de létalité reste toujours inférieur au taux d'inhibition du Q_{O_2} (Q_{O_2} mesuré après la préincubation des levures A(+)Zn ou après 3 h d'adaptation des levures N(+)Zn préincubées). De plus, l'écart entre taux d'inhibition du Q_{O_2} et taux de létalité est plus grand chez les levures A(+)Zn, ou chez les levures N(+)Zn ayant subi un début d'adaptation, que chez les levures N(+)Zn. Tout se passe comme si la présence du système respiratoire rendait les cellules moins vulnérables aux effets de la Zn-protoporphyrine.

ELKIND ET SUTTON¹³ avaient montré que, dans des conditions de préincubation analogues aux nôtres, les cellules de levures accumulent un pigment dont la présence entraîne leur photolétalité; le spectre d'action ou le spectre d'absorption de ce pigment (maxima à $\lambda = 545$ et 583 nm) et le spectre d'absorption de la Zn-protoporphyrine

coincident. Il s'avère donc que l'agent responsable de la photolétalité observée par ces auteurs est la Zn-protoporphyrine. Nous avons vu d'ailleurs qu'en présence d'oxygène le spectre de cette molécule disparaît à la lumière. Toutefois, étant donné les précautions prises pour éviter les effets de la lumière au cours de nos expériences, il est difficile de mettre entièrement sur le compte d'une photolyse de la Zn-protoporphyrine les pourcentages de létalité observés. La Zn-protoporphyrine pourrait donc exercer un effet létal par un mécanisme autre que celui de sa photolyse.

Des études "in vivo" et "in vitro" sont en cours pour préciser le rôle de différents facteurs tels que concentration en Zn-protoporphyrine, oxygène et lumière, dans les perturbations observées chez les cellules chargées en Zn-protoporphyrine.

RÉSUMÉ

Les cellules de levure provenant de culture aérobie ou anaérobie sont capables de synthétiser de grandes quantités de Zn-protoporphyrine par aération à l'état non proliférant dans du tampon phosphate à pH 8.

Chez les cellules provenant de culture aérobie, l'accumulation de Zn-protoporphyrine inhibe l'activité respiratoire et provoque une certaine létalité. Chez les levures provenant de culture anaérobie, cette accumulation entraîne une très forte inhibition de la synthèse des cytochromes et l'inhibition de l'adaptation respiratoire, ainsi qu'une létalité importante des cellules.

La Zn-protoporphyrine s'accumule dans les mitochondries. Ces mitochondries surchargées en Zn-protoporphyrine présentent une inhibition totale de leur activité respiratoire. L'addition "in vitro" de Zn-protoporphyrine purifiée à des mitochondries non surchargées en Zn-protoporphyrine entraîne l'abolition du contrôle respiratoire.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une aide du C.N.R.S. (Equipe de Recherche Associée No. 172).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 L. OHANIANC ET P. CHAIX, *Biochim. Biophys. Acta*, 128 (1966) 228.
- 2 B. EPHRUSSI, P. SLONIMSKI, Y. YOTSUYANAGI ET J. TAVLITZKI, *Compt. Rend. Lab. Carlsberg Ser. Phys.*, 26 (1956) 87.
- 3 P. LABBE ET P. CHAIX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51 (1969) 1642.
- 4 T. OHNISHI, K. KAWAGUCHI ET B. HAGIHARA, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 1797.
- 5 C. VOLLAND ET P. CHAIX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52 (1970) 581.
- 6 E. A. DUELL, S. INOUE ET M. F. UTTER, *J. Bacteriol.*, 88 (1964) 1762.
- 7 P. CHAIX ET P. LABBE, *Coll. Intern. sur les Mécanismes de Régulations des Activités Cellulaires chez les Microorganismes*, Marseille, 1963, C.N.R.S., Paris, 1965, p. 481.
- 8 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 9 P. LABBE ET P. CHAIX, à paraître.
- 10 M. S. JONES ET O. T. G. JONES, *Biochem. J.*, 113 (1969) 507.
- 11 R. MCKAY, R. DRUYAN, G. S. GETZ ET M. RABINOWITZ, *Biochem. J.*, 114 (1969) 455.
- 12 P. LABBE, C. VOLLAND ET P. CHAIX, *Biochim. Biophys. Acta*, 159 (1968) 527.
- 13 M. M. ELKIND ET H. SUTTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 72 (1957) 96.
- 14 L. OTTANIANC ET P. CHAISE, *Biochim. Biophys. Acta*, 170 (1968) 435.