

BBA 65765

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ FERROCHÉLATASE DES MITOCHONDRIES DE LEVURE

PIERRE LABBE, CHRISTIANE VOLLAND ET PAULETTE CHAIX

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

(Reçu le 21 février, 1968)

SUMMARY

The ferrochelatase activity of yeast mitochondria

Yeast mitochondrial ferrochelatase activity, measured by using a modified test related to this defined by PORRA AND JONES, is 5 times more important than previously reported. Only one pH maximum has been found at pH 7.6. K_m values related to Fe^{2+} or protoporphyrin are in the order of 10^{-5} M. Mitochondrial particles depleted of lipids have a slight ferrochelatase activity, which can mostly be restored by addition of phospholipids. Glutathion added to the reaction mixture seems to have a protective role against phospholipids peroxidation. With high Zn^{2+} concentrations (10^{-3} M), ferrochelatase catalyses zinc insertion into protoporphyrin. Zn^{2+} and Co^{2+} , at concentrations similar to Fe^{2+} (10^{-4} M), inhibit protoheme formation.

INTRODUCTION

La plupart des hémoprotéines ont comme groupement prosthétique, le protohème, qui est un chélate fer-protoporphyrine IX. SHEMAIN a montré que la biosynthèse de la protoporphyrine IX s'effectuait à partir du succinate et de la glycine et l'on connaît maintenant la plupart des enzymes soit particulières, soit solubles qui catalysent les différentes étapes de cette synthèse. L'étape terminale de formation du protohème, c'est-à-dire l'incorporation du fer dans la protoporphyrine est réalisée par la ferrochélatase, enzyme associé aux structures mitochondriales¹. Cet enzyme requiert *in vitro* la présence d'un réducteur (tel que le glutathion) et n'est pleinement actif qu'en absence d'oxygène^{1,2}.

Ayant mis en évidence la présence de zinc-protoporphyrine *in situ* dans les cellules de levures cultivées dans certaines conditions³ nous avons pensé que la ferrochélatase de mitochondries de levures devait posséder comme celle des chromatophores de *Rhodospseudomonas spheroides* la propriété d'incorporer le zinc dans la protoporphyrine. Des essais préliminaires nous ayant montré qu'il en était bien ainsi, en vue de préciser de quelle manière le fer et le zinc entraient en compétition en ce qui concerne leur incorporation dans la protoporphyrine, nous avons jugé indispensable de faire en premier lieu une étude cinétique aussi complète que possible de la ferrochélatase de

mitochondries de levure. Des études de ce genre ont déjà été effectuées par de nombreux auteurs⁴⁻¹² sur des mitochondries d'origines variées, mais les résultats obtenus sont assez divergents et un certain nombre de points restent obscurs. Nous avons donc entrepris cette étude en nous attachant à définir des conditions expérimentales rigoureuses aussi proches que possible des conditions physiologiques.

TECHNIQUES

Préparation de la fraction mitochondriale

Nous avons préparé la fraction mitochondriale à partir de la levure de boulangerie commerciale (*Saccharomyces cerevisiae*) provenant des Etablissements Fould Springer.

Toutes les opérations sont effectuées à 0-4° et réalisées avec du tampon Tris 0.1 M (pH 7.6).

100 g de levure de boulangerie pressée sont lavés 2 fois avec de l'eau distillée par centrifugation.

Des lots de 20 g de levure lavée sont mis en suspension dans 20 ml de tampon, additionnés de 100 g de microbilles de verre (diamètre = 0.45 mm) et broyés 1 min à 4000 périodes/min à l'aide du Zell Homogenisator Braun. Après broyage, on laisse décanter les billes de verre puis on centrifuge 20 min à $2500 \times g$; le surnageant ainsi débarrassé des gros débris cellulaires, constitue l'homogénat. Le culot est mis en suspension dans du tampon, centrifugé dans les mêmes conditions et le surnageant de ce lavage est additionné à l'homogénat précédemment obtenu. L'ensemble 'H' est alors centrifugé 30 min à $78\,000 \times g$ (Rotor 30 Spinco); le surnageant est éliminé, et le culot, constitué principalement de mitochondries plus ou moins éclatées, est remis en suspension, avec un broyeur Potter Elvehjem, dans du tampon, puis sédimenté à nouveau; le lavage du culot mitochondrial est répété une nouvelle fois. La fraction mitochondriale lavée ainsi obtenue est remise en suspension dans 80 ml de tampon. Cette suspension est dialysée une nuit à 0-4° contre 20 vol. de tampon, afin d'éliminer les ions métalliques (Fe^{2+} , Zn^{2+} , etc...) éventuellement présents à l'état libre. Après dialyse, le volume est amené à 100 ml. Cette préparation mitochondriale contient 8 à 10 mg protéines/ml.

Préparation de la pseudosolution de protoporphyrine

La protoporphyrine est obtenue par hydrolyse chlorhydrique de protoporphyrine-diméthylester préparée à partir d'une poudre acétonique de sang de porc selon la technique décrite par FALK¹³. Elle est pseudosolubilisée à l'aide de Tween 80 (1% final) dans du Tris 0.1 M (pH 7.6) (bibl. 1).

Test d'activité enzymatique de la ferrochélatase

Le test que nous avons utilisé est fondé sur le même principe que celui de PORRA ET JONES¹: l'incorporation du fer dans la protoporphyrine est suivie spectrophotométriquement en mesurant l'intensité de l'absorption de la bande α de l'hémochrome de pyridine du protohème réduit.

Des essais préliminaires nous ont conduits à opérer de la façon suivante: dans la cavité principale A des tubes représentés dans la Fig. 1, on introduit au total 4.4 ml dans l'ordre: glutathion (40 μ moles); tampon Tris 0.1 M, (pH 7.6), contenant 5/1000 d'antimousse SISS et préparation mitochondriale (0.5 ml). Dans l'ampoule latérale B,

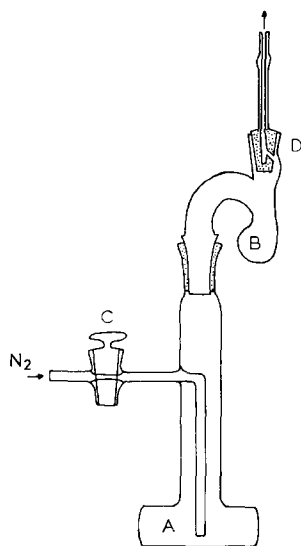


Fig. 1. Schéma des récipients utilisés pour le test d'activité ferrochélatase.

on introduit au total 0.6 ml: 400 m μ moles de FeSO₄ et 280 m μ moles de protoporphyrine.

Tous les essais sont préparés en double.

Les récipients étant maintenus dans la glace et agités, on fait barboter de l'azote (moins de 5 ppm d'O₂) pendant 10 min puis les robinets C et D sont fermés et les récipients agités sont mis en équilibre de température 10 min à 30°.

A un instant donné, le contenu de l'ampoule latérale B est renversé dans la cavité principale A et l'incubation à 30° est poursuivie durant 20 min. Puis les tubes ayant été rapidement retirés du bain marie sont ouverts à l'air, plongés dans la glace, et, additionnés chacun de 0.5 ml de NaOH 1 M et de 0.5 ml de pyridine. Les 6 ml de la solution contenue dans chaque récipient sont vidés par moitié dans 2 cuves de spectrophotométrie ($e = 10$ mm), l'une des cuves (référence) contient la préparation oxydée par 1 goutte de ferricyanure 3 mM; l'autre cuve contient la préparation réduite par quelques cristaux de dithionite.

Le spectre de différence est enregistré, à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur Lérès Spila, de 500 m μ à 580 m μ . La différence ΔE de densité optique entre 541 m μ (minimum d'absorption) et 557 m μ (maximum d'absorption) du protohème de pyridine, permet de calculer la quantité de protohème formé, dans un essai, d'après la relation:

$$\text{protohème (m}\mu\text{moles)} = \frac{10^3 v \Delta E}{\Delta \epsilon_{\text{mM}}} \quad (1)$$

où v = volume total de la solution dans un essai (6 ml), $\Delta \epsilon_{\text{mM}}$ à 541–557 m $\mu = 20.7$ (bibl. 1).

La complexité de ce test et l'instabilité chimique du protohème² expliquent que, pour 2 essais réalisés rigoureusement dans les mêmes conditions, les écarts puissent

atteindre 10 à 20%; nous n'avons retenu que la valeur moyenne d'au moins deux mesures.

Nous avons vérifié que dans ces conditions expérimentales, la formation de protohème en fonction du temps est linéaire au moins durant les 30 premières minutes d'incubation.

Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon FOLIN-LOWRY en utilisant le lysozyme comme protéine de référence²².

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Activité ferrochélatase en fonction du pH

La courbe de l'activité ferrochélatase en fonction du pH (Fig. 2) montre que l'activité maximum est observée vers pH 7.6.

C'est à ce pH que nous nous sommes donc toujours placés. Les valeurs de pH optimum trouvées par les différents auteurs varient notablement. En effet, NISHIDA ET LABBE⁷ dans le cas d'une préparation de ferrochélatase solubilisée par le Tween 20 à partir de mitochondries de foie de mammifère, YONEYAMA *et al.*⁸ dans le cas d'une préparation de ferrochélatase extraite du même matériel par le cholate ont obtenu comme nous-mêmes des courbes d'activité en fonction du pH à un seul maximum, mais situé pour les uns vers pH 7.5, pour les autres vers pH 8.5. En revanche, PORRA ET JONES¹ avec une préparation de ferrochélatase extraite de mitochondries de foie de mammifère avec le Tween 20, ont montré que la courbe d'activité en fonction du pH présentait 2 maxima dans le cas d'incorporation du fer dans la protoporphyrine et un maximum dans le cas d'incorporation du fer dans la mésoporphyrine. D'autre part,

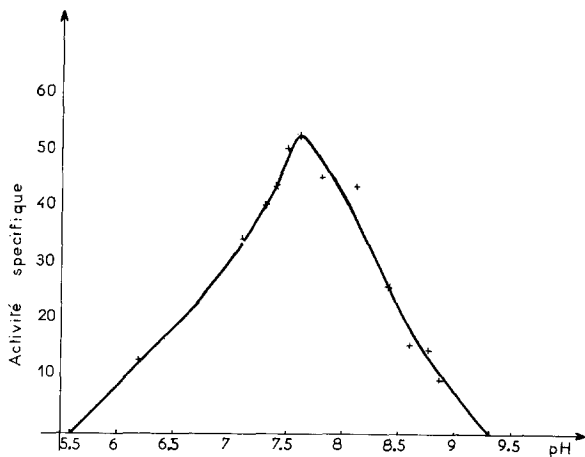


Fig. 2. Activité ferrochélatase (exprimée en μ moles protohème formées /mg protéines par h) en fonction du pH. Entre pH 5.5 et pH 8.5, tampon Tris 0.1 M; entre pH 8.5 et pH 10, tampon glycinate 0.1 M. Le pH des essais a été vérifié à la fin des incubations. Le pouvoir tampon pour les pH < 7 aurait été meilleur avec du tampon phosphate mais celui-ci s'est révélé inadéquat: chute brutale d'activité résultant vraisemblablement de la formation de complexes entre les ions Fe^{2+} et les ions phosphate.

RIETHMULLER ET TUPPY⁴, avec une préparation de ferrochélatase obtenue par action du Triton X 100 sur des mitochondries de levure ont observé deux maxima d'activité en fonction du pH: l'un à pH 7.5, l'autre à pH 9.

Ces divergences s'expliquent du fait que le test enzymatique est très complexe: il fait intervenir un système enzymatique de nature lipoprotéique, un substrat insoluble (la protoporphyrine portant 2 groupements ionisables propionyl), un substrat aisément oxydable Fe^{2+} et le glutathion (agent réducteur). Elles s'expliquent aussi par le fait que ces déterminations de pH optimum ont été effectuées sur des préparations enzymatiques d'origine très diverse, extraites de préparations particulières avec des détergents divers (tels que le Tween 20, le cholate ou le Triton X 100) et en utilisant dans certains cas la mésoporphyrine à la place de la protoporphyrine.

Nos conditions expérimentales (utilisation d'une préparation mitochondriale non traitée par un détergent et de protoporphyrine comme substrat) paraissent plus proches des conditions physiologiques que celles utilisées par les autres auteurs.

Activité ferrochélatase en fonction de la quantité de suspension mitochondriale

L'activité est proportionnelle à la quantité de suspension mitochondriale exprimée en mg de protéines/essai du moins entre 0 et 5 mg de protéines.

Dans les conditions que nous avons utilisées, l'activité spécifique est de 70 μmoles protohème formées/mg protéines par h, c'est-à-dire environ 5 fois plus élevée que celle mesurée par RIETHMULLER ET TUPPY⁴ sur les mitochondries de levure et beaucoup plus élevée également que celle qui a été mesurée par PORRA ET JONES⁵ sur le même matériel en utilisant la mésoporphyrine comme substrat. L'écart important de la valeur d'activité spécifique déterminée par ces auteurs d'une part et par nous-même d'autre part, pourrait s'expliquer par le fait que ces auteurs utilisent du tampon phosphate, alors que nous utilisons le tampon Tris (cf. Fig. 2).

Influence de la concentration en protoporphyrine

Dans nos conditions expérimentales, la vitesse de synthèse du protohème est maximum pour une quantité de protoporphyrine de 400 μmoles par essai. Ces résultats exprimés suivant la représentation de LINEWEAVER ET BURK (Fig. 3) permettent

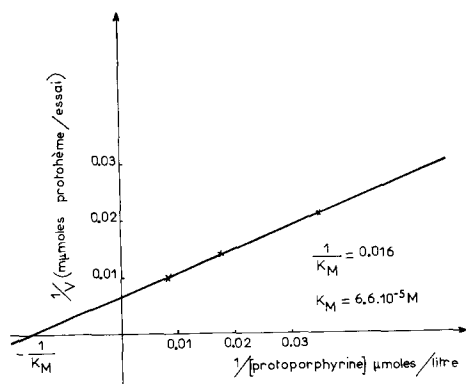


Fig. 3. Variation de l'activité ferrochélatase (déterminée dans les conditions décrites dans TECHNIQUES) en fonction de la concentration en protoporphyrine. (Représentation de LINEWEAVER ET BURK.)

de déterminer un K_m par rapport à la protoporphyrine de l'ordre de $2 \cdot 10^{-5}$ M c'est-à-dire voisin du K_m mesuré par YONEYAMA *et al.*⁶, avec une préparation de ferrochélatase extraite d'érythrocytes de canard, ($8 \cdot 10^{-5}$ M).

Avec 280 mμmoles de protoporphyrine/essai (condition utilisée dans le test, cf. TECHNIQUES), la saturation en substrat n'est pas réalisée. Toutefois, nous nous en sommes tenus dans toutes nos expériences à utiliser cette concentration en protoporphyrine car il s'est avéré que pour des quantités supérieures à 280 mμmoles/essai, il devenait très difficile de mesurer, par le test spectrophotométrique, le protohème formé en raison de la forte densité optique de la préparation.

Influence de la concentration en fer

La vitesse de synthèse du protohème augmente en fonction de la quantité de fer ferreux présent dans le milieu d'incubation jusqu'à 400 mμmoles de fer et diminue ensuite. Nous avons vérifié que ce dernier phénomène n'est pas dû à une variation du pH du milieu d'incubation.

L'excès de fer pourrait agir soit en inhibant la ferrochélatase par excès de substrat, soit en permettant la peroxydation par des traces d'oxygène des lipides mito-

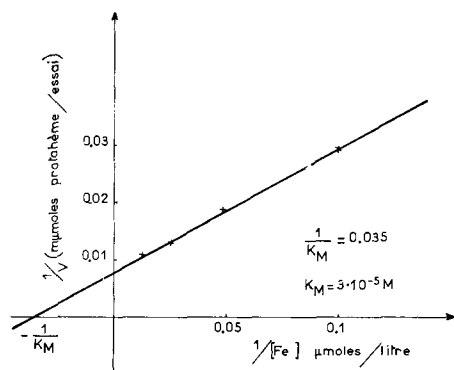


Fig. 4. Variation de l'activité ferrochélatase (déterminée dans les conditions décrites dans TECHNIQUES) en fonction de la concentration en fer. (Représentation de LINEWEAVER ET BURK.)

chondriaux^{14,15} nécessaires, comme nous le montrerons plus loin, à l'activité enzymatique. La courbe (Fig. 4) $1/v = f(1/[Fe])$ permet de déterminer, pour K_m relatif au fer, une valeur de l'ordre de $2 \cdot 10^{-5}$ M c'est-à-dire voisine de celle donnée par YONEYAMA *et al.*⁶ de $7 \cdot 10^{-5}$ M.

Dénaturation thermique

Le Tableau I montre qu'un chauffage à 56° pendant 10 min inactive totalement l'enzyme. Si le chauffage a lieu en présence de protoporphyrine, l'activité enzymatique est conservée. En revanche le fer n'a pas d'effet protecteur.

Nature du réducteur

De même que certains auteurs, nous avons constaté que l'activité ferrochélatase n'est maximum qu'en absence d'O₂ (bibl. 1, 2) et en présence d'un réducteur.

TABLEAU I

DÉNATURATION THERMIQUE

Les essais de dénaturation thermique de la ferrochélatase mitochondriale sont réalisés en ajoutant à 2 ml de suspension de mitochondries 0.1 ml de tampon Tris 0.1 M (pH 7.6) ou 0.1 ml de protoporphyrine (100 μ moles) ou 0.1 ml de FeSO_4 (100 μ moles). Le mélange est maintenu 10 min à 56°, puis refroidi. L'activité est ensuite déterminée sur 0.5 ml de suspension mitochondriale dans les conditions décrites dans TECHNIQUES.

<i>Suspension mitochondriale</i>	<i>Protohème formé par l'essai (μmoles)</i>
Non chauffée	84
Préincubée 10 min à 56°	0
Préincubée 10 min à 56° en présence de protoporphyrine	91
Préincubée 10 min à 56° en présence de Fe^{2+}	0

Nous avons testé l'activité ferrochélatase en atmosphère d'azote et en présence de différents réducteurs (*cf.* Tableau II).

Le glutathion, la cystéine, NADH sont des réducteurs efficaces; le β -mercaptoéthanol également, mais il est inutilisable du fait de sa forte tension de vapeur. Au contraire, l'ascorbate entraîne une inactivation complète de la ferrochélatase.

En conséquence, nos essais ont été réalisés en atmosphère d'azote et en présence de glutathion de préférence à la cystéine qui est d'un emploi délicat. La courbe de la Fig. 5 montre que la quantité optimale de glutathion est de 40 μ moles par essai.

On peut supposer que le glutathion s'oppose à des réactions d'oxydation par les traces d' O_2 : (1) en maintenant le fer à l'état ferreux car le fer ferrique n'est pas substrat de l'enzyme¹; (2) en évitant une dégradation du protohème formé²; (3) en empêchant la peroxydation par le fer et l'oxygène des phospholipides nécessaires à l'activité enzymatique^{14,15}; (4) en activant éventuellement la ferrochélatase si cet enzyme possède des groupements -SH actifs.

TABLEAU II

INFLUENCE DE LA NATURE DU RÉDUCTEUR

Les conditions d'incubation ont été décrites dans TECHNIQUES.

<i>Atmos- phère</i>	<i>Nature du réducteur (40 μmoles dans l'essai)</i>	<i>Protohème formé par l'essai (μmoles)</i>
Azote	Glutathion	71
	cystéine	103
	ascorbate	0
	NADH	42
	sans réducteur	17
Air	glutathion	21
	sans réducteur	0

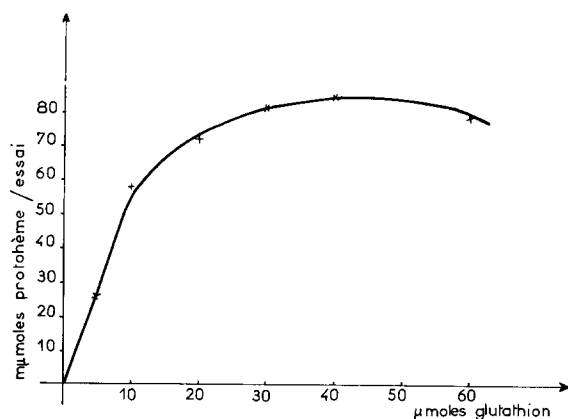


Fig. 5. Variation de l'activité ferrochélatase (déterminée dans les conditions décrites dans TECHNIQUES) en fonction de la concentration en glutathion. La légère perte d'activité pour de fortes concentrations en glutathion est due à un abaissement du pH du milieu d'incubation.

Pour éprouver cette dernière hypothèse, nous avons examiné l'action d'agents alkylants ($\text{ICH}_2\text{-COOH}$ et $\text{ICH}_2\text{-CONH}_2$). L'inhibiteur (10^{-3} M final) est mis dans la cavité principale A, le glutathion dans l'ampoule latérale B. Le passage d'azote ayant été réalisé, les essais sont incubés 20 min à 30° puis le mélange de A et de B est effectué et l'incubation est poursuivie 20 min. Le dosage est ensuite effectué normalement. Dans de telles conditions opératoires, nous n'avons constaté aucune inactivation par ces agents. Cette absence d'inhibition conduit à penser que la ferrochélatase de mitochondries de levures ne doit pas posséder de groupements -SH actifs.

Des expériences analogues réalisées par LABBE ET HUBBARD⁹ sur une préparation de ferrochélatase extraite de mitochondries de foie de rat par le Tween 20 avaient donné des résultats assez peu concluants. Le fait que NADH puisse remplacer le glutathion (Tableau II) comme cela avait déjà été observé⁷, n'est pas non plus en faveur de la présence de groupements -SH actifs.

Rôle des phospholipides

Considérant que la ferrochélatase était un enzyme particulière dont le substrat (la protoporphyrine) était liposoluble nous avons supposé que les phospholipides étaient nécessaires à l'activité de cet enzyme.

Une préparation mitochondriale traitée par l'acétone aqueuse selon la technique de FLEISCHER *et al.*¹⁶, ne subit aucune perte d'activité.

En revanche, une préparation mitochondriale traitée par le butanol selon la méthode de MORTON²¹ nous a permis d'éliminer les phospholipides et de constater une perte d'activité ferrochélatase.

Une suspension dialysée de mitochondries provenant de 100 g de levures (*cf.* TECHNIQUES) est centrifugée 30 min à $78\,000 \times g$. Les culots de mitochondries placés dans un broyeur de Potter à piston de verre sont homogénéisés dans 30 ml de *n*-butanol (refroidi à -20°) pendant 5 min à l'aide d'un moteur. L'homogénat ainsi obtenu est ensuite centrifugé 5 min à $25\,000 \times g$. Le butanol (jaune) est éliminé et le culot est soumis dans les mêmes conditions à une 2ème extraction suivie d'une centrifugation.

TABLEAU III

INFLUENCE DE L'ÉLIMINATION DES PHOSPHOLIPIDES SUR L'ACTIVITÉ FERROCHÉLATASE

Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte. Un essai témoin réalisé avec les phospholipides seuls n'a donné aucune formation de protohème.

Nature du système enzymatique testé	Volume total des fractions (ml)	μmoles protohème formées/h par ml	μmoles protohème formées/h au total
MI	100	487	48 700
MD	50	87	4 350
S	50	100	5 000
MD + P	50	421	21 050
S + P	50	259	13 000

MI, suspension mitochondriale initiale.

MD, suspension mitochondriale délipidifiée.

S, fraction solubilisée après traitement par le butanol.

P, phospholipides.

Le culot est alors soumis, 2 fois de suite, au traitement suivant : homogénéisation dans 25 ml de tampon Tris 0.1 M (pH 7.6), avec un broyeur Potter muni d'un piston de téflon puis centrifugation de la suspension ainsi obtenue 30 min à $78\,000 \times g$. Les 2 surnageants sont réunis (S) et conservés alors que le culot final représentant les mitochondries délipidifiées est mis en suspension dans 50 ml de tampon Tris 0.1 M (pH 7.6).

Cette préparation mitochondriale ainsi délipidifiée MD ne conserve que 10% de l'activité ferrochélatase initiale (Tableau III). Une partie de l'activité ferrochélatase (10%) se retrouve dans la fraction S.

Il était intéressant de voir si l'addition de phospholipides à l'une ou l'autre de ces 2 fractions permettait de restaurer l'activité ferrochélatase.

Pour extraire les phospholipides mitochondriaux nous avons utilisé une technique de FLEISCHER *et al.*¹⁶ en prenant la précaution de sécher le résidu obtenu sous jet d'Azote U. Ces phospholipides mitochondriaux (correspondant à 100 g de levures) sont dissous dans 1.5 ml de butanol puis additionnés de 8 ml de Tris 0.1 M (pH 7.6). Après évaporation du butanol par passage d'Azote U pendant 3 h à 25°, la préparation est amenée à un volume de 10 ml avec du tampon Tris et homogénéisée au Virtis pendant 15 min à la vitesse maximum (préparation P).

Les essais tendant à restaurer l'activité ferrochélatase des mitochondries délipidifiées ou du surnageant S sont effectués de la manière suivante : à 5 ml de S ou de la suspension mitochondriale sont ajoutés 0.5 ml de la suspension de phospholipides; le mélange est incubé à 30°, 30 min avec agitation et l'on teste l'activité ferrochélatase sur 0.5 ml de ce mélange.

Le Tableau IV montre que l'addition de phospholipides P de mitochondries de levures aux préparations délipidifiées MD et à la fraction S solubilisée permet de récupérer au total environ 70% de l'activité ferrochélatase.

L'importance du rôle des phospholipides dans l'activité ferrochélatase a déjà été mise en évidence par MAZANOWSKA, NEUBERGER ET TAIT¹¹, à propos des activités

TABLEAU IV

INCORPORATION DE Fe^{2+} DANS LA PROTOPORPHYRINE EN PRÉSENCE D'AUTRES IONS MÉTALLIQUES

Tous les essais contiennent 400 μmoles FeSO_4 . Le métal inhibiteur est introduit dans l'ampoule latérale contenant le fer et la protoporphyrine. Le protohème formé est dosé dans les conditions décrites dans TECHNIQUES.

Nature du métal ajouté	Métal ajouté dans l'essai (μmoles)	Protohème synthétisé par l'essai (μmoles)
—	—	81
Ni	200	78
	400	77
	800	71
	4000	65
Zn	200	67
	400	46
	800	16
	4000	0
Co	200	54
	400	39
	800	32
	4000	6

fer-et zinc-protoporphyrine chélatase des chromatophores de *R. sphaeroides*: l'élimination des lipides entraîne une perte d'activité fer et zinc chélatase, l'activité initiale est restaurée quand on ajoute des lipides extraits des chromatophores ou de l'acide phosphatidique.

D'une façon générale, le rôle des phospholipides dans le métabolisme de la mitochondrie et de tous les systèmes particuliers est très important mais encore mal éclairci. Les phospholipides agiraient soit dans le maintien même de la structure enzymatique soit en favorisant l'approche du site actif de l'enzyme par un substrat liposoluble.

Dans le cas de la ferrochélatase, on peut supposer que le rôle des phospholipides serait de solubiliser la protoporphyrine et de maintenir ainsi une concentration élevée en substrat au niveau de l'enzyme. L'élimination des phospholipides aurait donc pour conséquence d'abaisser la concentration locale en protoporphyrine qui serait alors limitante pour la réaction enzymatique. Signalons que SUGITA¹⁷ à propos de la ferrochélatase d'érythrocytes de canard, a montré que la protoporphyrine fixée sur les particules était utilisée préférentiellement à la protoporphyrine libre.

Effets des ions métalliques sur la ferrochélatase

La présence de la protoporphyrine zinc, dans les cellules de levure³ nous a conduit à rechercher si la ferrochélatase de levure pouvait, *in vitro*, incorporer le zinc à la place du fer dans la protoporphyrine et si le zinc, ou d'autres ions métalliques, avait des effets inhibiteurs sur l'incorporation du fer.

Incorporation du zinc dans la protoporphyrine. La cinétique de la formation de la protoporphyrine zinc est estimée spectrophotométriquement en suivant l'augmen-

tation de densité optique à $\lambda = 585 \text{ m}\mu$ (longueur d'onde du maximum d'absorption de la bande α de la protoporphyrine zinc³).

Des essais préliminaires nous ont montré que l'incorporation du zinc était favorisée par la présence d'un réducteur tel que le glutathion ($40 \text{ }\mu\text{moles/essai}$) sans que des conditions anaérobies soient nécessaires. Chaque cuve contient dans un volume total de 3 ml: $40 \text{ }\mu\text{moles}$ de glutathion, $280 \text{ m}\mu\text{moles}$ de protoporphyrine, 1 ml de suspension mitochondriale, Tris 0.1 M (pH 7.6). La cuve mesure contient de plus $400 \text{ m}\mu\text{moles}$ de ZnSO_4 ajouté au temps zéro, après 10 min de préincubation à 30° .

La vitesse d'incorporation du zinc dans la protoporphyrine est constante pendant au moins 20 min. La quantité de protoporphyrine zinc formée est mesurée en

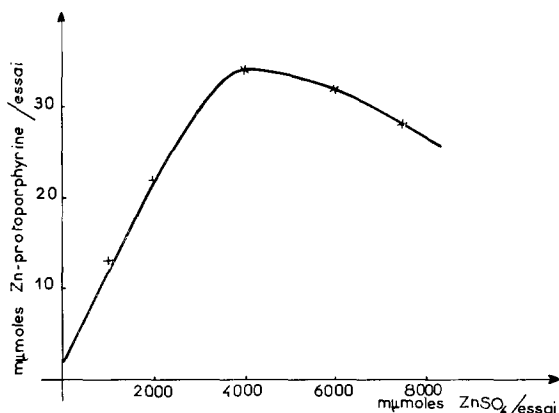


Fig. 6. Variation de l'activité Zn-chélatase en fonction de la quantité de ZnSO_4 (les conditions expérimentales sont décrites dans le texte). Pour de fortes concentrations en ZnSO_4 , on observe une baisse du pH qui peut être la cause de la baisse d'activité.

prenant ϵ_{mM} à $585 \text{ m}\mu = 14.7$ (bibl. 3). On voit sur la courbe de la Fig. 6 que l'optimum d'activité d'incorporation du zinc est obtenu pour une quantité de $4000 \text{ m}\mu\text{moles}$ de zinc dans l'essai, alors que la quantité optima de fer est de $400 \text{ m}\mu\text{moles}$.

La quantité optima de protoporphyrine est la même que celle trouvée pour l'incorporation du fer ($560 \text{ m}\mu\text{moles}$). L'activité spécifique de la ferrochélatase pour l'incorporation du zinc est environ 4 fois inférieure à celle trouvée pour l'incorporation du fer. Nous avons constaté, comme dans le cas du fer, que l'activité zincchélatase est détruite par un chauffage de 10 min à 56° , et que cette activité est conservée si le chauffage est effectué en présence de protoporphyrine. L'incorporation enzymatique du zinc dans la protoporphyrine a déjà été signalée par différents auteurs^{10,18,19} mais les résultats obtenus, suivant l'origine de l'enzyme, la nature du substrat porphyrinique, la présence ou non d'un réducteur et sa nature, sont très variables.

Inhibition de l'incorporation du fer dans la protoporphyrine par Zn^{2+} , Co^{2+} et Ni^{2+} . Certains auteurs ont observé que ces ions métalliques divalents étaient inhibiteurs de l'incorporation du fer par la ferrochélatase^{10,12}. Nous avons d'abord vérifié que, dans des essais ne contenant pas de fer mais contenant des quantités de nickel ou de cobalt inférieures ou égales à $4000 \text{ m}\mu\text{moles}$ par essai, il n'y a pas formation mesurable de nickel- ou cobalt-protoporphyrine.

Dans des essais contenant à la fois Fe^{2+} et Zn^{2+} ou Fe^{2+} et Co^{2+} , à concentrations égales (400 $\mu\text{moles/essai}$) il y a une inhibition de l'incorporation du fer d'environ 50% par rapport aux essais homologues sans Zn^{2+} ou Co^{2+} . Si, la quantité de fer restant fixée à 400 $\mu\text{moles/essai}$, on fait varier la quantité de zinc ou de cobalt dans l'essai, de 100 à 4000 μmoles , il y a inhibition progressive de l'incorporation du fer jusqu'à inhibition presque totale pour 4000 μmoles de zinc ou de cobalt par essai (Tableau IV). Dans les mêmes conditions, en revanche, le nickel (jusqu'à 4000 μmoles par essai) semble sans effet.

Il est difficile pour le moment, de dire si l'inhibition de l'incorporation du fer par le zinc ou le cobalt est compétitive ou non, parce que les ions métalliques ajoutés peuvent avoir des effets très complexes sur les particules mitochondriales. D'après NEUBERGER ET TAIT¹⁰ l'inhibition par le zinc serait non compétitive dans le cas de la ferrochélatase de chromatophores de *R. spheroides*.

Ces faits sont à rapprocher des expériences D'OHANIAN ET CHAIX²⁰ qui ont montré que les levures cultivées en anaérobiose sur milieu déficient en zinc et aérées à l'état non proliférant en présence de glucose synthétisent les cytochromes de la chaîne respiratoire à une vitesse bien plus élevée que les mêmes levures cultivées sur un milieu additionné de zinc; d'après nos résultats, *in vitro*, on peut supposer que dans ce dernier cas, le zinc se trouve à l'intérieur de la cellule à une concentration suffisante pour inhiber partiellement l'incorporation du fer dans la protoporphyrine, et ralentir la synthèse des cytochromes.

CONCLUSION

Les mitochondries de levure de boulangerie contiennent une ferrochélatase dont l'activité spécifique est 5 fois supérieure à celle précédemment déterminée.

Le pH optimum d'activité de la ferrochélatase est situé vers pH 7.6 et les valeurs de K_m sont à peu près identiques ($\simeq 10^{-5}$ M) pour la protoporphyrine et le fer, ce qui permet de penser que la ferrochélatase est un enzyme possédant une assez grande spécificité vis-à-vis de ses deux substrats.

La nécessité de l'addition dans le milieu d'incubation d'un réducteur comme le glutathion ne peut pas s'expliquer par la présence de groupements -SH actifs dans la ferrochélatase. Beaucoup plus vraisemblablement le glutathion permet le maintien du fer à l'état ferreux et surtout empêche les réactions de dégradation du protohème d'une part, des phospholipides d'autre part en présence de traces d'oxygène.

Les phospholipides jouent un rôle essentiel dans l'activité ferrochélatase puisque la délipidification entraîne une perte d'activité de l'ordre de 80%. L'addition de phospholipides mitochondriaux restaure l'activité à 70%. La nécessité des phospholipides pour l'activité ferrochélatase pourrait s'expliquer par le caractère lipophile de la protoporphyrine.

En présence d'assez fortes quantités de zinc (4000 $\mu\text{moles/essai}$) et en absence de fer, la ferrochélatase incorpore le zinc dans la protoporphyrine; pour des quantités plus faibles en zinc (400 $\mu\text{moles/essai}$), il n'y a pas de formation de zinc-protoporphyrine.

Nous avons constaté une inhibition d'environ 50% en présence de quantités de cobalt ou de zinc égales à celle du fer (400 $\mu\text{moles/essai}$), mais pratiquement aucune inhibition en présence d'une quantité équivalente de nickel.

Pour effectuer une étude plus précise des propriétés de la ferrochélatase des mitochondries de levure, il serait nécessaire de réaliser une mise en solution de l'enzyme et une purification ultérieure.

REMERCIEMENTS

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

RÉSUMÉ

L'activité ferrochélatase des mitochondries de levure mesurée à l'aide d'un test modifié par rapport à celui proposé par PORRA ET JONES est 5 fois plus forte que celle déterminée antérieurement. Un seul pH optimum est trouvé pour pH 7.6. Les K_m relatifs à Fe^{2+} ou à la protoporphyrine sont de l'ordre de 10^{-5} M. Les particules mitochondriales délipidifiées présentent une activité ferrochélatase très abaissée, susceptible d'être en grande partie restaurée par addition de phospholipides. Il semble que le glutathion, ajouté dans le test ait un rôle de protection vis-à-vis de la peroxydation des phospholipides. En présence de concentrations élevées en zinc (10^{-3} M), la ferrochélatase catalyse l'incorporation de Zn^{2+} dans la protoporphyrine. Zn^{2+} et Co^{2+} , à des concentrations voisines de celle de Fe^{2+} (10^{-4} M) inhibent l'incorporation de Fe^{2+} dans la protoporphyrine.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. J. PORRA ET O. T. G. JONES, *Biochem. J.*, 87 (1963) 181.
- 2 R. J. PORRA, K. S. VITOLS, R. F. LABBE ET N. A. NEWTON, *Biochem. J.*, 104 (1967) 321.
- 3 P. CHAIX ET P. LABBE, *Colloque International sur les Mécanismes de Régulations des Activités Cellulaires chez les Microorganismes*, Marseille, 1963, C.N.R.S., Paris, 1965, p. 481.
- 4 G. RIETHMULLER ET H. TUPPY, *Biochem. Z.*, 340 (1964) 413.
- 5 R. J. PORRA ET O. T. G. JONES, *Biochem. J.*, 87 (1963) 186.
- 6 Y. YONEYAMA, H. OYAMA, H. SUGITA ET H. YOSHIKAWA, *Biochim. Biophys. Acta*, 62 (1962) 261.
- 7 G. NISHIDA ET R. F. LABBE, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 519.
- 8 Y. YONEYAMA, A. TAMAI, T. YASUDA ET H. YOSHIKAWA, *Biochim. Biophys. Acta*, 105 (1965) 100.
- 9 R. F. LABBE ET N. HUBBARD, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 185.
- 10 A. NEUBERGER ET G. H. TAIT, *Biochem. J.*, 90 (1964) 607.
- 11 A. M. MAZANOWSKA, A. NEUBERGER ET G. H. TAIT, *Biochem. J.*, 98 (1966) 117.
- 12 R. F. LABBE ET N. HUBBARD, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 130.
- 13 J. E. FALK, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier, Amsterdam, 1964, 2, p. 132(b).
- 14 R. C. Mc KNIGHT, F. E. HUNTER ET W. H. OEHLERT, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 3439.
- 15 A. L. LEHNINGER ET D. P. BECK, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 2038.
- 16 S. FLEISCHER, G. BRIERLEY, H. KLOUWEN ET D. B. SLAUTTERBACK, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 3264.
- 17 Y. SUGITA, *J. Biochem. Tokyo*, 51 (1962) 436.
- 18 H. N. LITTLE ET M. I. KELSEY, *Federation Proc.*, 23 (1964) 223.
- 19 A. JOHNSON ET O. T. G. JONES, *Biochim. Biophys. Acta*, 93 (1964) 171.
- 20 L. OHANIAN ET P. CHAIX, *Biochim. Biophys. Acta*, 128 (1966) 228.
- 21 R. K. MORTON, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 25.
- 22 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.