

## ACTION DES COMPOSES A 2 CARBONES SUR LE METABOLISME ENDOGENE DE LA LEVURE

par

J. P. Guiraud,<sup>1</sup> C. Bizeau, A. Arnaud, Hélène Saquet & P. Galzy

### Abstract

Ethanol, acetic acid, ethanal, glycolic acid and glycolaldehyde stimulate the oxidation of cell reserves when no multiplication occurs.

### Introduction

La toxicité de l'éthanol à l'égard des cellules humaines pose de graves problèmes. Les mécanismes responsables de cette toxicité sont encore imparfaitement connus malgré de nombreux travaux (Casier 1954, 1958; Le Breton & Trémolières 1957; Trémolières & Carré 1959; Baron & Trémolières 1968). Dans le cas de la levure, l'éthanol produit dans certaines conditions une stimulation de la respiration endogène des cellules qui pourrait expliquer du moins en partie sa toxicité (Bizeau & Galzy 1964; Magagnosc et coll. 1968; Guiraud et coll. 1972).

Il n'est peut-être pas possible de transposer à l'homme la totalité des observations réalisées sur la levure car l'éthanol est un sous produit normal du métabolisme fermentaire de la levure et qu'une croissance de *Saccharomyces cerevisiae* est possible sur un milieu où l'éthanol constitue la seule source de carbone (Galzy 1964). De plus les enzymes respiratoires sont adaptatifs chez la levure (Slonimski 1953, Galzy et coll. 1967) alors qu'ils ont un taux constant chez les mammifères. Cependant, les observations effectuées à propos du métabolisme de l'éthanol chez la levure peuvent aider à comprendre le mécanisme de cette toxicité.

D'autres composés à deux carbones sont capables de provoquer une stimulation de l'oxydation des réserves cellulaires. Nous avons entrepris l'étude systématique de l'action de ces composés sur le comportement des cellules de levure non proliférantes: nous avons étudié les bilans et les vitesses d'oxydation de ces substrats et tenté de mettre en évidence une action sur la respiration endogène.

---

\* Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Centre de Recherches Agronomiques de Montpellier, Institut National de la Recherche Agronomique, 34 - Montpellier - France.

<sup>1</sup> Laboratoire de Biochimie Appliquée (T.P. de Microbiologie), Sciences et Techniques de l'Alimentation, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34 Montpellier, France.

Dedicated to Prof. Onorato Verona on occasion of his 70th birthday.

## Matériel et Méthodes

### *Matériel biologique*

Les expériences ont été réalisées avec deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen:

- une souche haploïde: 276/3d (Ephrussi et coll. 1949), qui est de sige a et n'a aucune exigence particulière;
- une souche diploïde: 183 (Galzy 1964) dont les facteurs de croissance indispensables sont l'adénine, l'histidine, la biotine et l'acide panthoté- nique.

Ces deux souches ont donné des résultats comparables.

### *Conditions de culture*

La souche est conservée sur milieu gélosé à 2 % incliné, en tubes à essais. Ce milieu contient 0,5 % d'extrait de levure Difco et 0,5 % de glucose. Pour chaque expérimentation, une préculture est ensemencée à partir du tube de conservation. Vingt quatre heures après, elle sert à l'ensemencement d'une culture.

Les précultures et cultures sont effectuées sur un milieu synthétique appelé milieu G (Galzy & Slonimski 1957). La source de carbone est le glucose 2 %. Les cultures sont agitées (80 oscillations/mn; amplitude 8 cm) en erlenmeyers remplis au dixième du volume.

L'ensemencement de la culture varie de 10 à 20 · 10<sup>6</sup> cellules/ml. Les cellules sont prélevées en fin de phase exponentielle de croissance.

### *Techniques manométriques*

Les techniques manométriques sont celles de la méthode classique du Warburg (d'après Umbreit et coll. 1964). Les déterminations sont faites à 28 °C sur des cellules mises en suspension dans du phosphate monopotassique M/15, pH 4,5. Le volume du liquide est de 2 ml par fiole. L'absorption du CO<sub>2</sub> est effectuée par 0,2 ml de potasse à 20 % placée dans le diverticule central; pour augmenter la surface d'absorption, un carré (1,8 × 1,8 cm) de papier filtre plissé est ajouté dans ce diverticule. L'agitation des manomètres est de 180 à 230 oscillations simples par minute, arc de 7 cm. Les fioles et les manomètres sont jaugés à 0,02 cm<sup>3</sup> près; le volume total des fioles varie de 10 à 21 cm<sup>3</sup>. Dans toutes les expériences, l'atmosphère est l'air. Les vitesses de respiration sont ramenées à l'heure et au milligramme de matière sèche (QO<sub>2</sub>). La matière sèche est évaluée par mesure des protéines par la réaction du biuret selon Strickland (1951).

Les bilans d'oxydation sont effectués avec des cellules non proliférantes en présence de quantités limitantes de substrat. L'oxydation du substrat est considérée en principe comme terminée lorsque l'absorption d'oxygène dans les cupules d'expérience devient égale ou inférieure à l'absorption dans une cupule témoin qui n'a pas reçu de substrat et qui sert

donc à mesurer l'oxydation des réserves cellulaires. La différence entre l'absorption dans une cupule d'expérience et dans la cupule témoin peut être considérée à priori comme représentant la quantité d'oxygène théoriquement nécessaire pour l'oxydation totale du substrat.

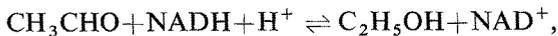
### *Produits utilisés*

| Composé           | Provenance | Qualité                   |
|-------------------|------------|---------------------------|
| Acétamide         | Prolabo    | Pour usages scientifiques |
| Acétonitrile      | Prolabo    | Pour usages scientifiques |
| Acide acétique    | Prolabo    | RP pour analyses          |
| Acide glycolique  | Calbiochem | A grade                   |
| Acide glyoxylique | Prolabo    | RP pour analyses          |
| Acide oxalique    | Prolabo    | RP pour analyses          |
| Acétaldéhyde      | Prolabo    | RP pour analyses          |
| Ethanol           | Prolabo    | RP pour analyses          |
| Glycocolle        | Prolabo    | Pur                       |
| Glycol            | Prolabo    | RP pour analyses          |
| Glycolaldéhyde    | Fluka      | Pur                       |

### *Techniques analytiques*

#### Dosage de l'acétaldéhyde

L'acétaldéhyde est dosée par la méthode de Racker (1950) modifiée par Veringa et Schrijver-Davelaar (1970). Le principe de ce dosage est basé sur la réaction:



qui est catalysée par l'alcool deshydrogénase. On mesure l'augmentation de la densité optique à 340 nm due à l'oxydation du NADH après addition de l'enzyme.

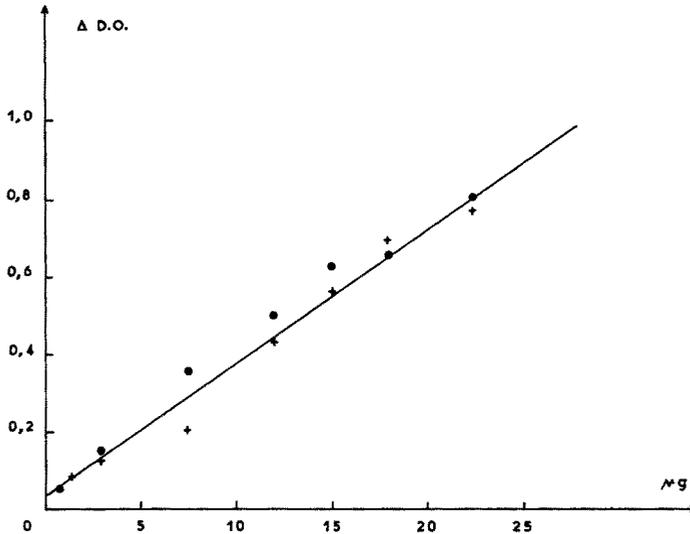
Le mélange réactionnel contient:

- 1 ml d'une solution de phosphate de potassium bipotassique M ajusté à pH 6,5 au moyen d'HCl
- 0,3 ml de NADH 1,5 mM
- l'acétaldéhyde. Celle-ci convenablement diluée est ajoutée à ce mélange et le volume amené à 3 ml.

La densité optique à 340 nm est mesurée pendant 2 à 3 minutes. La cuve de contrôle contient la solution de phosphate de potassium bipotassique M ajusté à pH 6,5 au moyen d'HCl.

La réaction est déclenchée par addition de 0,005 ml d'enzyme dilué au tiers (50  $\mu\text{g}$ ). L'acétaldéhyde est réduite totalement lorsque la densité optique devient constante. La réaction est presque instantanée et la  $\Delta$  DO permet de déterminer la quantité d'acétaldéhyde dans le mélange.

Une courbe d'étalonnage a été établie avec une solution fraîchement préparée d'acétaldéhyde. Le graphique I donne la relation entre la quantité d'acétaldéhyde (exprimée en  $\mu\text{g}$ ) dans la prise d'essai, et la diminu-



Graphique 1: Relation entre la quantité d'acétaldéhyde et la diminution de la densité optique à 340 nm.

En abscisses: quantité d'acétaldéhyde dans les 3 ml d'expérience (en  $\mu g$ ).

En ordonnées: diminution de la densité optique à 340 nm

● 1ère expérience

+ 2ème expérience.

tion correspondante de la densité optique à 340 nm ( $\Delta DO$ ). La densité optique est proportionnelle à la quantité d'acétaldéhyde présente dans la prise d'essai.

Le calcul de la droite de régression a donné:

$$\Delta DO = 0,03547 x + 0,03063 \text{ (moyenne de 4 expériences)}$$

$$\text{soit } x = 28,19 \Delta DO - 0,86$$

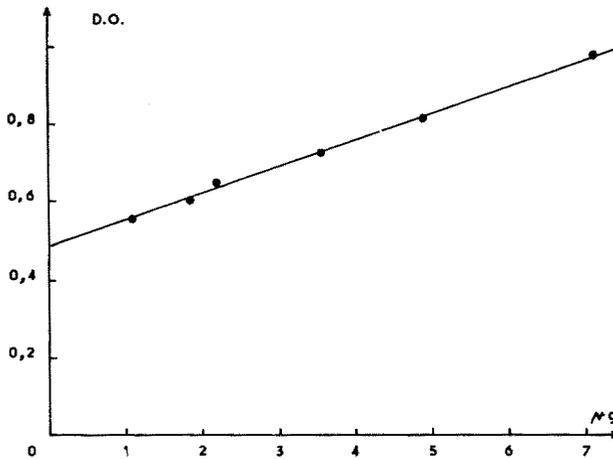
Cette méthode de dosage n'est pas applicable directement aux surnageants des suspensions cellulaires de levure, à cause des produits d'excrétion. Il convient d'effectuer alors une distillation préalable. Celle-ci est réalisée au moyen d'un appareil de microdistillation (réservoir de 10 à 20 ml). Le distillat est recueilli par barbotage dans 5 ml d'eau maintenue à 0 °C afin d'éviter toute évaporation d'acétaldéhyde. Ce distillat est utilisé pour les mesures.

#### Dosage de l'acide glycolique

L'acide glycolique a été dosé par une méthode colorimétrique basée sur l'action du perchlorure de fer en solution chlorhydrique sur les acides  $\alpha$  hydroxylés (Berg, 1894). Le réactif utilisé est une solution aqueuse contenant pour 100 ml : 0,1 ml d'acide chlorhydrique concentré et 0,1 ml de solution de chlorure ferrique à 45° Baumé.

Le réactif et le produit à doser sont mélangés en quantités équivalentes et l'on effectue la lecture à 360 nm.

La coloration obtenue est stable, tout au moins dans le quart d'heure



Graphique 2: Dosage de l'acide glycolique. Courbe d'étalonnage.

En abscisses: concentration en acide glycolique dans la prise d'essai (en  $\mu\text{M}$ )

En ordonnées: densité optique.

suivant la réaction. Le graphique 2 donne la courbe d'étalonnage. Il exprime les variations de la densité optique en fonction de la concentration en acide glycolique dans la prise d'essai.

La droite de régression a été calculée:

$$\Delta \text{DO} = 0,07055 x + 0,471 \text{ (moyenne de 4 expériences)}$$

$$\text{soit } x = 14,17 \Delta \text{DO} - 6,676$$

#### *Remarques sur la présentation des résultats*

La fluctuation biologique est particulièrement importante pour certains des coefficients métaboliques que nous avons déterminés.

Nous avons donc, chaque fois que c'était nécessaire effectué plusieurs expériences indépendantes. Dans ce cas nous donnerons la moyenne des résultats obtenus  $\bar{x}$ , le nombre d'expériences indépendantes  $n$ , ainsi que l'écart type  $\sigma$  que nous avons déterminé d'après la formule:

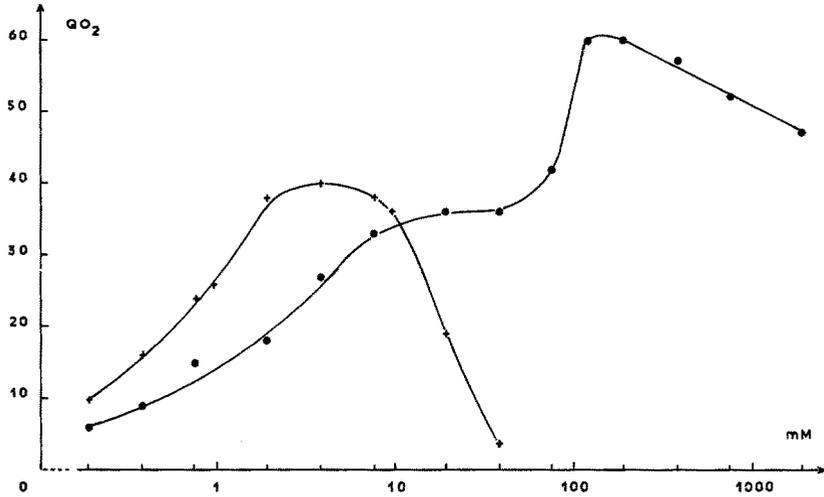
$$\sigma = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

### **Résultats expérimentaux**

Les substrats à 2 carbones présentent des actions différentes sur le métabolisme de la levure. Pour faciliter la présentation des résultats, nous avons groupé les substances à 2 carbones en fonction de leur mode d'action.

#### *Etude de l'action de l'éthanol et de l'acide acétique*

L'éthanol et l'acide acétique sont de bons substrats de croissance pour *Saccharomyces cerevisiae*. Il est possible de cultiver la levure sur des



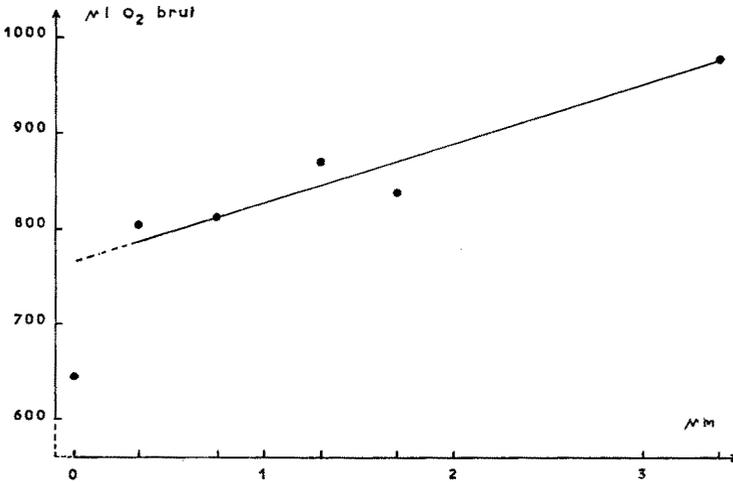
Graphique 3: Variation de la vitesse de respiration en fonction de la concentration en éthanol et acide acétique.

En abscisses: concentration représentée avec une échelle logarithmique (en mM)

En ordonnées: QO<sub>2</sub> net (μl/heure/mg de matière sèche) (mesures effectuées pendant 15 mn).

● Ethanol

+ Acide acétique.



Graphique 4: Bilan de l'oxydation de l'éthanol.

En abscisses: quantité d'éthanol dans la cupule.

En ordonnées: oxygène total, absorption exprimée en microlitres.

milieux synthétiques avec ces substrats comme seule source de carbone et de conserver la culture indéfiniment par repiquages successifs. Cependant, des concentrations trop élevées en acide acétique peuvent être toxiques.

La levure placée en absence de multiplication cellulaire oxyde l'éthanol et l'acide acétique dès le premier contact dans l'appareil de Warburg. Le graphique 3 représente les variations des  $QO_2$  éthanol et  $QO_2$  acide acétique mesurés pendant les 15 premières minutes en fonction de la concentration en substrat. L'activité respiratoire augmente avec la concentration en éthanol jusqu'à la concentration 190 mM. L'inhibition par un excès de substrat n'apparaît qu'au delà de 1000 mM. Par contre, dans le cas de l'acide acétique, le maximum est obtenu dès la concentration de 3,8 mM et l'inhibition commence au delà; à la concentration 80 mM, l'inhibition de la respiration est totale. Ce fait explique que l'acide acétique ne permette la croissance que dans une zone assez étroite de concentrations.

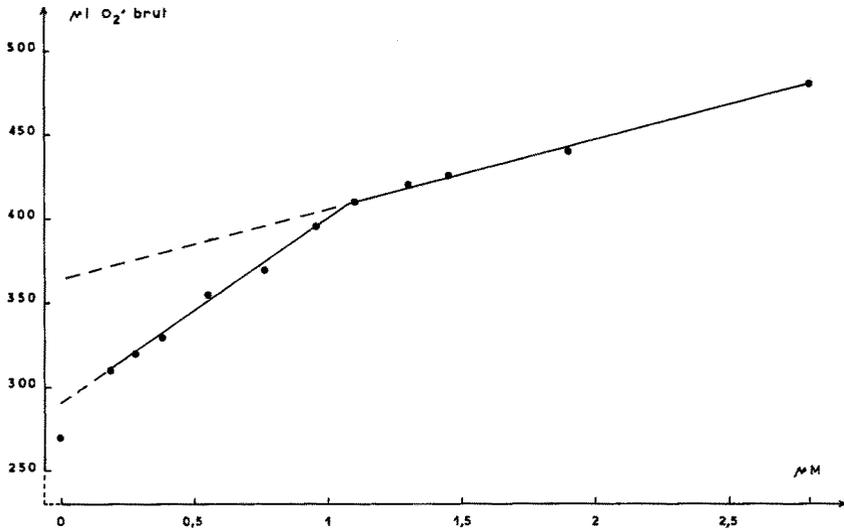
Les bilans d'oxydation ont été étudiés pour une gamme de concentrations comprises entre 0 et 1,9 mM. Le graphique 4 représente l'absorption totale d'oxygène au cours de l'expérience pour diverses concentrations en éthanol. Le bilan d'oxydation peut être en principe donné par la pente de la droite: il est voisin de 1. L'extrapolation au zéro de la droite de régression montre que la respiration endogène est plus élevée en présence d'éthanol que dans la cupule témoin n'ayant reçu aucun substrat.

| Concentration en substrat (en mM/l) | 0,19 | 0,38 | 0,76 | 0,94 | 1,90 |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|
| Bilan moyen                         | 1,86 | 2,09 | 1,71 | 1,51 | 1,09 |
| n                                   | 8    | 8    | 8    | 8    | 8    |
| $\sigma$                            | 0 39 | 0 86 | 0 44 | 0 49 | 0 36 |

Tableau I - Bilans d'oxydation de l'éthanol

Les bilans apparents ont été calculés pour chaque concentration en tenant compte de l'activité endogène mesurée. Le tableau I donne les moyennes des résultats obtenus dans plusieurs expériences indépendantes. Les bilans apparents sont toujours supérieurs à l'unité, ce qui ne peut s'expliquer que par la stimulation du métabolisme endogène.

Le graphique 5 représente l'absorption totale d'oxygène au cours de l'expérience pour diverses concentrations en acide acétique. Pour des concentrations comprises entre 1 et 3 mM, la pente de la droite donne

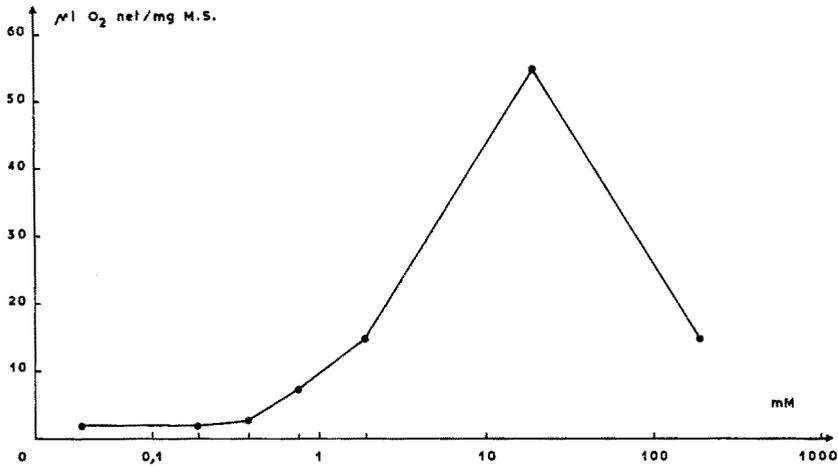


Graphique 5: Bilan de l'oxydation de l'acide acétique.  
 En abscisses: quantité d'acide acétique dans la cupule.  
 En ordonnées: oxygène total, absorption exprimée en microlitres.

une valeur du bilan voisine de 0,65; l'extrapolation au zéro montre une forte stimulation de l'oxydation des réserves en présence d'acide acétique. Pour des concentrations plus faibles inférieures à 1 mM, la pente de la droite permet d'estimer le bilan qui est environ de 1,4; l'extrapolation de la droite au zéro donne une valeur de la respiration endogène voisine de la valeur expérimentale. La seule explication possible est une stimulation de l'oxydation des réserves pratiquement proportionnelle à la concentration en acide acétique entre 0,19 et 1 mM et constante ensuite.

| Concentration en substrat (en mM/l) | 0,19 | 0,28 | 0,37 | 0,55 | 0,76 | 0,94 | 1,10 | 1,30 | 1,45 | 1,90 | 2,80 |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Bilan Moyen                         | 1,80 | 1,98 | 1,68 | 1,65 | 1,53 | 1,43 | 1,61 | 1,27 | 1,30 | 0,98 | 0,89 |
| n                                   | 8    | 3    | 8    | 8    | 8    | 5    | 3    | 5    | 3    | 8    | 5    |
| $\sigma$                            | 0,64 | 0,36 | 0,25 | 0,32 | 0,30 | 0,32 | 0,11 | 0,27 | 0,11 | 0,23 | 0,16 |

Tableau II Bilans d'oxydation de l'acide acétique



Graphique 6: Variation de la respiration en fonction de la concentration en éthanol.  
 En abscisses: concentration représentée en échelle logarithmique (en mM).  
 En ordonnées: absorption nette d'oxygène pendant la durée de l'expérience (10 h) exprimée en  $\mu\text{l}$  par mg de matière sèche.

Le calcul des bilans apparents d'oxydation pour diverses concentrations a été effectué (tableau II). Ces résultats confirment la stimulation de l'oxydation des réserves par l'acide acétique.

#### *Etude de l'action de l'éthanal*

L'éthanal permet une multiplication cellulaire lorsqu'il constitue la seule source de carbone. Mais contrairement à l'éthanol ou à l'acide acétique, il n'assure qu'une croissance faible. Il n'est pas possible de maintenir une souche de levure sur éthanal pendant plusieurs repiquages successifs.

La levure placée en absence de multiplication cellulaire oxyde l'éthanal dès le premier contact avec une vitesse assez élevée ( $QO_2 = 10$  à  $40$  le premier quart d'heure). Mais la vitesse d'oxydation décroît très vite et devient nulle après 2 à 8 heures selon les conditions d'expérience et, en particulier, la concentration. Le graphique 6 présente les variations de l'absorption d'oxygène en fonction de la concentration en substrat en fin d'expérience par mg de matière sèche; ces valeurs sont corrigées de l'activité endogène. L'absorption d'oxygène est maximale pour une concentration voisine de 19 mM; pour les concentrations supérieures, l'éthanal provoque rapidement une forte inhibition: en définitive, la zone de concentration permettant une oxydation du substrat est assez étroite, plus encore que dans le cas de l'acide acétique.

Les bilans apparents d'oxydation ont été calculés (tableau III) pour des concentrations comprises entre 0,19 et 19 mM. L'éthanal ayant une

|                       |      |      |      |      |      |       |
|-----------------------|------|------|------|------|------|-------|
| Concentration en mM/l | 0,19 | 0,38 | 0,76 | 1,1  | 1,9  | 19    |
| Bilan corrigé         | 1,34 | 1,31 | 1,28 | 1,11 | 1,06 | 0,551 |
| n                     | 5    | 5    | 5    | 5    | 5    | 5     |
| G                     | 0,26 | 0,31 | 0,35 | 0,26 | 0,23 | 0,16  |

Tableau III — Bilans d'oxydation de l'acétaldéhyde corrigés des pertes par évaporation

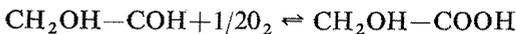
température d'ébullition faible (20°8 C) il en résulte des pertes par distillation. L'éthanal se retrouve en partie dans le diverticule contenant la potasse. Nous avons effectué une estimation expérimentale de ces pertes et nous en avons tenu compte pour le calcul des bilans donnés dans le tableau III. Le bilan apparent est dans ces conditions supérieur à l'unité. Malgré l'imprécision de ces résultats il semble certain que l'éthanal stimule l'oxydation des réserves cellulaires.

#### *Etude de la glycolaldéhyde et de l'acide glycolique*

Ces deux substrats ne permettent pas la croissance lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone.

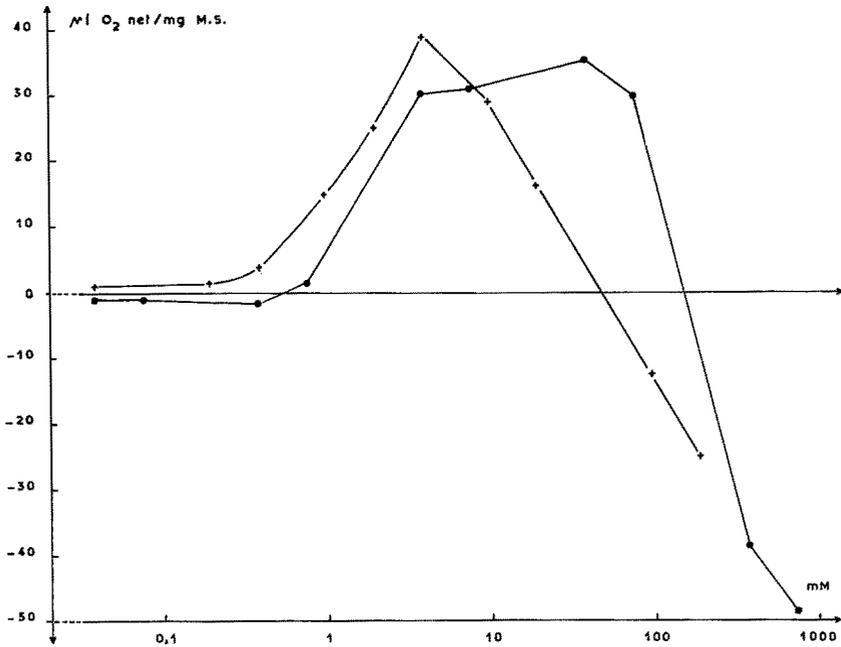
Le graphique 7 donne, pour la glycolaldéhyde et l'acide glycolique, les variations de l'absorption nette d'oxygène par mg de matière sèche en fonction de la concentration en substrat. Les expériences durent 10 heures. Dans le cas de la glycolaldéhyde l'absorption est faible jusqu'à la concentration de 0,40 mM, augmente rapidement jusqu'à 4 mM et diminue ensuite pour s'annuler à une concentration voisine de 60 mM. Dans le cas de l'acide glycolique l'absorption nette est nulle (ou négative) jusqu'à la concentration de 0,5 mM, augmente jusqu'aux environs de 40 mM et diminue ensuite très rapidement.

La glycolaldéhyde est oxydée au cours de ces expériences. On trouve dans les cupules de l'acide glycolique provenant de cette oxydation. Le bilan a été calculé en tenant compte de la réaction d'oxydation:



Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau IV. Ces bilans sont nettement supérieurs à l'unité ce qui traduit une forte stimulation par la glycolaldéhyde de l'oxydation des réserves cellulaires.

L'acide glycolique n'est pas oxydé par les cellules de levure et se retrouve en fin d'expérience. L'action sur l'oxydation des réserves est donc importante puisque l'excès d'absorption d'oxygène observé en présence d'acide glycolique est uniquement provoqué par cette stimulation. Les bilans apparents calculés en admettant l'oxydation totale de l'acide



Graphique 7: Variation de la respiration en fonction de la concentration en glycolaldéhyde et acide glycolique.

En abscisses: concentration représentée en échelle logarithmique (en mM).

En ordonnées: absorption nette d'oxygène pendant la durée de l'expérience (10 h) exprimée en  $\mu\text{l}$  par mg de matière sèche.

● Acide glycolique

+ Glycolaldéhyde.

| Concentration en substrat (en mM/l) | 0,19 | 0,18 | 0,76 | 0,94 | 1,5 | 1,9 | 3,8  | 9,4 |
|-------------------------------------|------|------|------|------|-----|-----|------|-----|
| Bilan moyen                         | 9    | 5,6  | 5,5  | 6,8  | 5,4 | 4,6 | 4,02 | 1,2 |
| n                                   | 5    | 5    | 6    | 6    | 6   | 5   | 5    | 4   |
| $\sigma$                            | 2,6  | 1,3  | 1,1  | 0,7  | 1,5 | 0,6 | 2    | 0,8 |

Tableau IV - Bilans d'oxydation de la glycolaldéhyde

| Activation du métabolisme endogène |         |    |
|------------------------------------|---------|----|
| Concentration                      | $\mu$ l | %  |
| 19 $\mu$ M                         | 19      | 4  |
| 190                                | 20      | 4  |
| 380                                | 31      | 6  |
| 760                                | 68      | 11 |
| 1,1 mM                             | 96      | 14 |
| 1,5                                | 140     | 20 |
| 1,9                                | 126     | 21 |
| 3,8                                | 224     | 56 |
| 7,6                                | 229     | 58 |
| 38                                 | 264     | 67 |
| 76                                 | 218     | 55 |

Tableau V - Action sur le métabolisme endogène provoqué par l'acide glycolique

glycolique sont très nettement supérieurs à l'unité; il est inutile de les donner puisqu'il n'y a pas oxydation du substrat. Nous donnons dans le tableau V les valeurs absolues exprimées en  $\mu$ l de la stimulation du métabolisme endogène par l'acide glycolique; cette stimulation a été également chiffrée en pourcentage de l'activité respiratoire endogène.

#### *Etude du glyocolle et de l'acide oxalique*

Le glyocolle ne permet pas la croissance lorsqu'il constitue la seule source de carbone ou la seule source d'azote. L'acide oxalique ne donne pas non plus de croissance.

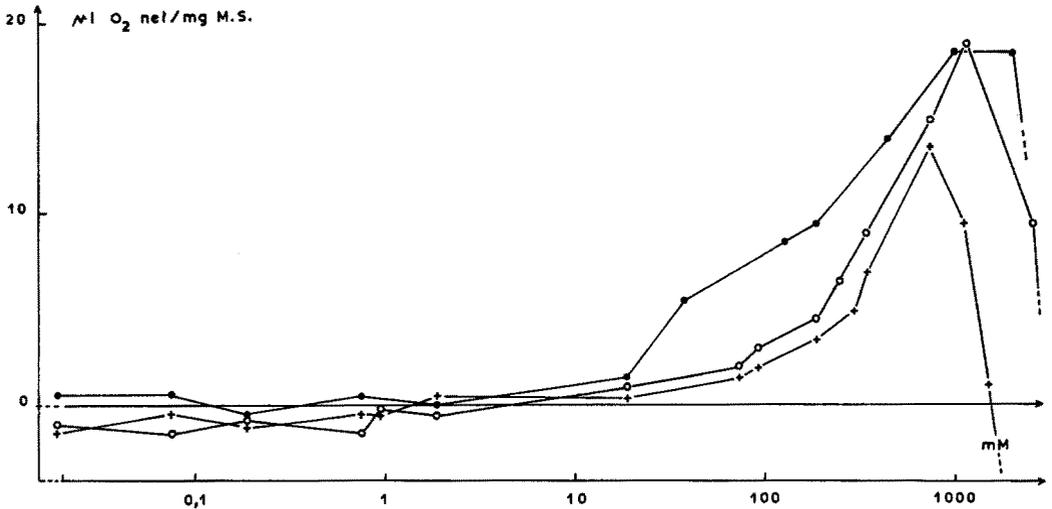
Le glyocolle n'est pas oxydé pour des concentrations comprises entre 0,19 mM et 1000 mM. L'acide oxalique n'est pas oxydé aux mêmes concentrations et présente même un effet légèrement dépressif sur la respiration endogène.

Ces deux substrats n'ont donc pas d'action stimulante sur l'oxydation des réserves cellulaires.

#### *Etude de l'éthylène glycol, de l'acétonitrile, de l'acétamide et de l'acide glyoxylique*

Ces substrats ne permettent pas la croissance lorsqu'ils constituent la seule source de carbone. L'acétonitrile et l'acétamide ne sont également pas des sources d'azote assimilable.

La variation de l'absorption nette d'oxygène par la levure en fonction de la concentration en substrat a été étudiée. Le graphique 8 présente les résultats obtenus pour l'éthylène glycol, l'acétonitrile et l'acétamide pour des expériences durant 10 heures. Les résultats obtenus en fin



Graphique 8: Variation de la respiration en fonction de la concentration en éthylène glycol, acétamide et acétonitrile.

En abscisses: concentration représentée en échelle logarithmique (en mM).

En ordonnées: absorption nette d'oxygène pendant la durée de l'expérience (10 h) exprimée en µl par mg de matière sèche.

● Ethylène glycol

+ Acétonitrile.

○ Acétamide

d'expérience sont ramenés au mg de matière sèche. Les absorptions d'oxygène corrigées de l'activité endogène sont nulles jusqu'à la concentration de 10 mM. Elles augmentent lentement avec la concentration jusqu'à 1000 mM environ puis diminuent aux concentrations supérieures et deviennent rapidement négatives. L'absorption d'oxygène ne devient significativement différente de l'activité endogène que pour des concentrations très élevées. A ces concentrations, le calcul d'un bilan est impossible. L'absorption nette d'oxygène ne correspond qu'à l'oxydation théorique d'une fraction infime du substrat présent. Ces trois substrats ne sont donc probablement pas oxydés par la levure. Il n'est pas impossible que l'absorption obtenue soit due à l'oxydation d'impuretés.

Cependant, il n'est pas possible d'exclure qu'il y ait une action de ces substrats sur l'oxydation des réserves endogènes aux fortes concentrations.

Les mêmes expériences ont été effectuées dans le cas de l'acide glyoxylique. Ces expériences ne durent que 3 heures; en effet, au delà de 3 heures l'absorption d'oxygène devient toujours égale ou plus faible dans les cupules d'expérience en présence de l'acide glyoxylique que dans les cupules témoins. L'absorption nette d'oxygène en présence d'acide glyoxylique est positive entre 0,76 mM et 190 mM mais l'activité ainsi observée est toujours très faible. Il n'est pas possible d'en tirer des conclusions sur les variations de l'action respiratoire en fonction de la concentration. L'absorption nette d'oxygène n'est que légèrement supéri-

eure aux erreurs d'expérience. En définitive, il est permis de penser que l'acide glyoxylique n'est pas, comme les trois substrats précédents, oxydé par la levure. Il est possible que l'acide glyoxylique stimule très légèrement l'oxydation des réserves; cette hypothèse expliquerait l'absorption nette d'oxygène, faible mais reproductible, observée à certaines concentrations.

### Discussion et conclusion

Tous les substrats à 2 carbones ne présentent pas la même action sur l'oxydation des réserves cellulaires. Plusieurs groupes peuvent être définis:

- L'éthanol, l'éthanal et l'acide acétique sont métabolisés par la levure, permettent la croissance dans certaines conditions, et ont une action stimulante sur l'oxydation des réserves. En fait, l'éthanol et l'éthanal sont oxydés avec, comme intermédiaire, l'acide acétique. Il n'est donc pas impossible que l'action stimulante sur l'oxydation des réserves soit liée, soit à une action inductrice de l'acide acétique, soit à un couplage entre les voies d'oxydation respectives de certaines réserves et de l'acétate.

- La glycolaldéhyde et l'acide glycolique ne permettent pas la croissance et stimulent fortement l'oxydation des réserves cellulaires de la levure. La glycolaldéhyde est oxydée par la levure mais avec accumulation d'acide glycolique. L'hypothèse d'un couplage de l'oxydation de certaines réserves avec l'oxydation du substrat est donc impossible dans le cas de l'acide glycolique et hautement improbable dans le cas de la glycolaldéhyde. Il n'est pas impossible d'ailleurs que la glycolaldéhyde n'agisse qu'en tant que précurseur de l'acide glycolique.

- L'acide glyoxylique ne permet pas la croissance et n'est pas oxydé par la levure. Il n'est pas certain que l'acide glyoxylique agisse sur l'oxydation des réserves, mais une faible stimulation semble se produire à certaines concentrations.

- Tous les autres substrats, acide oxalique, glycolcolle, éthylène glycol, acétonitrile et acétamide ne semblent pas stimuler l'oxydation des réserves.

En définitive, l'hypothèse d'un couplage obligatoire entre l'oxydation des réserves et de certains substrats à deux carbones est à rejeter. Une deuxième hypothèse pourrait être émise: les substrats stimulant l'oxydation des réserves auraient une action inductrice liée à une structure chimique commune. Si les deux substrats les plus importants (acide glycolique et acide acétique) ont en commun la fonction acide, ils présentent par ailleurs des propriétés physiques et chimiques très différentes. De plus, plusieurs substrats à 2 carbones à fonction acide ne stimulent pas l'oxydation des réserves.

Il est précieux pour le déroulement ultérieur du travail de pouvoir disposer d'un substrat actif sur le métabolisme endogène qui ne soit pas métabolisé par la levure (acide glycolique). Le fait de connaître plusieurs substrats présentant la même action pourra également faciliter la recherche des mécanismes impliqués dans ce phénomène.

### Zusammenfassung

Athanol, Essigsäure, Athanal, Glycolsäure und Glycolaldehyd begünstigen die Oxydation der Zellreserven in Abwesenheit von Vermehrung.

### Remerciements

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de Jacques Albert.

### Références

- Baron, P. & J. Trémolières (1968) Influence de l'éthanol administré à dose toxique sur les échanges respiratoires du rat. *Nutr. Dieta.* 10: 229-239.
- Berg, A. (1894) Sur une réaction des acides alcools. *Bull. Soc. Chim.* 11 (3): 882.
- Bizeau, C. & P. Galzy (1964) Bilan de l'oxydation de l'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 258: 5280-5282.
- Casier, H. (1954) Etude du métabolisme de l'alcool éthylique au moyen d'alcool éthylique radioactif  $\text{CH}_3\text{-C}^{14}\text{H}_2\text{-OH}$  chez la souris. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1994: 173-214.
- Casier, H. (1958) Métabolisme de l'alcool éthylique et alcool métabolisé fixé par l'organisme. *Revue médicale de la Suisse Romande* 79 (2): 87-95.
- Ephrussi, B., H. Hottinguer & J. Tavlitzki (1949) Action de l'acriflavine sur les levures. II Etude génétique du mutant petite colonie. *Ann. Inst. Pasteur* 76: 419.
- Galzy, P. (1964) Variations génétiques de la levure au cours de la croissance sur des substrats non glucidiques. *Heredity* 19 (4): 731-733.
- Galzy, P. (1964) Etude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. Thèse, Paris.
- Galzy, P. & P. Slonimski (1957) Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *C. R. Acad. Sci. Paris* 245: 2423-2426.
- Galzy, P., C. Bizeau & Françoise Vezinhet (1967) Les enzymes de la levure. Facteurs agissant sur leur production et leurs caractères. *Ann. Nutr. Aliment.* 21 (3): 41-66.
- Guiraud, J. P., Françoise Vezinhet, P. Galzy & J. Albert (1972) Influence des conditions préalables de culture sur le métabolisme de l'éthanol et de l'acide acétique par la levure. *Arch. Mikrobiol.* 82: 101-110.
- Le Breton, E. & J. Trémolières (1957) L'utilisation de l'alcool par l'homme. Aspect énergétique, physiologique et nutritionnel. *Ann. Rech. Méd. (Path. Biol.)* 33: 81-101.
- Magagnosc, M., P. Galzy & J. Albert (1968) Influence de la nutrition des cellules de levure sur le bilan d'oxydation de l'éthanol et de l'acide acétique. *Ann. Nutr. Alim.* 22: 1-9.
- Racker, E. (1950) Crystalline alcohol dehydrogenase from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 184: 313-319.
- Slonimski, P. P. (1953) La formation des enzymes respiratoires de la levure. Thèse, 1-203, Masson éd. Paris.
- Strickland, L. H. (1951) The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. Gen. Microbiol.* 5: 698.
- Trémolières, J. & L. Carré (1959) Physiologie de l'utilisation de l'alcool dans l'organisme. *Rev. Alcool.* 5: 199-228.
- Umbreit, W. W., R. H. Burris & J. F. Stauffer (1964) *Manometric techniques*. Fourth edition. Burgess Publishing Company.
- Veringa, A. H. & H. Schrijver-Davelaar (1970) Enzymatic determination of acetaldehyde in starter, yoghurt and butter. *Neth. Milk Dairy J.* 24: 34-44.

#### Keywords:

Métabolisme  
endogène  
levure