

Contribution à l'étude de la réponse des levures au stress oxydatif: cas de *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*

L. Fourrat¹, A. Iddar², N. Errafiy¹, C. Gancedo³ et A. Soukri¹

¹ Laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire, Université Hassan II, Faculté des Sciences Ain Chock, Casablanca.

² Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN).

³ Institut d'investigations biomédicales « Alberto Sols » Madrid. Espagne.

Email : fourrat_l@yahoo.fr

Résumé

L'interaction de l'oxygène moléculaire avec la matière vivante pose un paradoxe important. L'oxygène est d'une part toxique car sa réduction incomplète conduit à la génération des espèces activées de l'oxygène. D'autre part, l'oxygène est essentiel à la vie car c'est l'accepteur terminal des électrons de la chaîne respiratoire, responsable de la production d'énergie par la respiration. L'oxygène moléculaire, mais aussi le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) interviennent également comme accepteur d'électrons dans une série de mécanismes biologiques essentiels à la vie. Les mécanismes d'action d'un grand nombre de substances toxiques impliquent une élévation de composés oxygénés dans la cellule, ce qui entraîne le stress oxydatif causant des dommages tissulaires. Il est donc important de chercher à mieux comprendre les mécanismes d'action de certains agents induisant un stress oxydatif afin de contrôler leur toxicité. Nos travaux contribuent à l'avancement des connaissances sur les mécanismes d'action d'une série d'agents toxiques. Il est connu que le phénomène le plus marquant dans cette réponse cellulaire est la modification du métabolisme du carbone, c'est pour cette raison nous avons étudié dans un premier lieu l'effet du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxyde nitrique (NO) et l'herbicide 2,4 dichlorophénoxyacétate (2,4D) sur le métabolisme cellulaire des levures *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*, en particulier sur une enzyme clef du cycle glycolytique la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Nous avons mis en évidence les variations de la sensibilité des cellules de levures en prolifération aux activités cytotoxiques de ces agents.

Mots clés : stress oxydatif, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

Introduction

Le stress oxydatif est un déséquilibre, entre la balance des oxydants et des antioxydants, dû à une exposition des cellules aux espèces réactives de l'oxygène - ROS-, qui oxydent des molécules telles les lipides (Vaughan, 1997), les protéines (Berlett et Stadtman, 1997) et l'ADN (Beckman et Ames, 1997) accélérant ainsi la mort cellulaire. L'exposition de la cellule à certaines molécules peut générer des radicaux libres, provoquant ainsi un stress oxydatif, c'est le cas de l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétate (2,4-D). C'est un herbicide de type chlorophénoxy, sa toxicité a été étudiée chez les mammifères (Amer et Aly, 2001) et également chez la levure *Saccharomyces* (Teixeira et al, 2004). Parmi les ROS, figurent le peroxyde d'Hydrogène et l'oxyde nitrique qui ont fait l'objet d'études traitant leurs effets sur différentes protéines, dont l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase phosphorylante NAD⁺-dépendante (Mohr et al., 1999 ; Grant et al., 1999 ; Soukri et al., 1996). Il s'agit d'une enzyme clé du métabolisme

cellulaire, jouant un rôle important dans la glycolyse en réalisant la phosphorylation oxydative du D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Une des conséquences du stress oxydatif est le blocage de la glycolyse qui peut être dû à une inactivation de la GAPDH suite à l'interaction de radicaux libres avec le résidu cystéine du site actif (Kots, 1992; Colussi et al., 2000).

Notre étude est menée afin de contribuer à la mise en évidence de l'effet du stress oxydatif causé par H₂O₂, NO et 2,4-D sur le métabolisme cellulaire eucaryotique (*Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris* et *Saccharomyces cerevisiae*). Nous avons choisi comme modèle enzymatique la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

Matériel et Méthodes

1. Culture

Les levures *Yarrowia lipolytica* PO1a, *Pichia pastoris* et *Saccharomyces cerevisiae* W303 sont cultivées en présence de 2mM H₂O₂, 1mM Sodium

nitroprusside-SNP-(donneur de NO) et de 1mM 2,4D, dans le milieu YPD (1% extrait de levure, 2% peptone et 2% glucose). Après incubation 18h à 30°C avec agitation à 200 rpm, les cellules ont été observées au microscope photonique puis photographiées à l'aide d'un appareil numérique. Par la suite, les cellules sont collectées par centrifugation à 4000xg pendant 10 min à 4°C et conservées à -20°C.

2. Préparation de l'extrait cellulaire

La lyse cellulaire se fait par des billes de verre dont le diamètre est de 0.5 mm. L'extrait obtenu est centrifugé à 15000xg pendant 45 min à 4°C.

3. Impact du SNP, H₂O₂, et 2,4-D sur l'activité de la GAPDH

Pour l'étude de l'impact des agents oxydants SNP (donneur de NO), H₂O₂ et 2,4-D sur la GAPDH de ces trois levures, le milieu de culture (YPD) est additionné de différentes concentrations de ces éléments. Des tests d'activité sont effectués sur l'extrait cellulaire. L'activité de la GAPDH en présence des différents agents additionnés dans le milieu de culture est déterminée par spectrophotométrie à 25°C en mesurant l'apparition de NADH à 340 nm (Iglesias *et al.*, 1987). Le mélange réactionnel contient le tampon Tricine-NaOH 50 mM pH 8.5, NAD⁺ 0,4 mM, DL-G3P 1 mM, Na₂HAsO₄ à 10 mM et une quantité appropriée de la préparation enzymatique dans un volume total de 1 ml. Le DL-G3P est obtenu par hydrolyse acide du sel disodique DL-glyceraldehyde-3-phosphate

diethylacétal suivant les indications du fournisseur (Sigma).

4. Impact du SNP, H₂O₂, et 2,4-D sur l'expression de la GAPDH

Afin d'étudier l'expression de la GAPDH, les extraits cellulaires de *Y. lipolytica*, *P. pastoris* et *S. cerevisiae* cultivés dans différentes conditions (sans ou avec les additifs dans le milieu) sont analysés sur gel de polyacrylamide en présence du SDS et aussi par immunodétection en utilisant l'anticorps purifié anti-GAPDH de *Y. lipolytica*, ce qui permet de déceler les différences d'expression induites par les 4 agents de stress dans le milieu de culture par rapport au témoin.

Résultats et discussion

Après culture dans différentes conditions de stress, les levures *Y. lipolytica*, *P. pastoris* et *S. cerevisiae* semblent répondre à l'action des 3 agents oxydants par un changement structural de la cellule. En effet, l'observation au microscope photonique a montré que sous l'action du stress oxydatif, les cellules adoptent une forme différente par rapport aux cellules témoins (figure 1).

Cette variation est plus remarquable pour les cellules de *Y. lipolytica* sous l'action du NO (forme allongée), et pour *S. cerevisiae* sous l'effet de NO et 2,4-D (fig. 1). D'autre part, les mesures d'activités sont effectuées sur les extraits bruts et les activités de la GAPDH résultant de 6 essais sont représentées dans la figure 2.

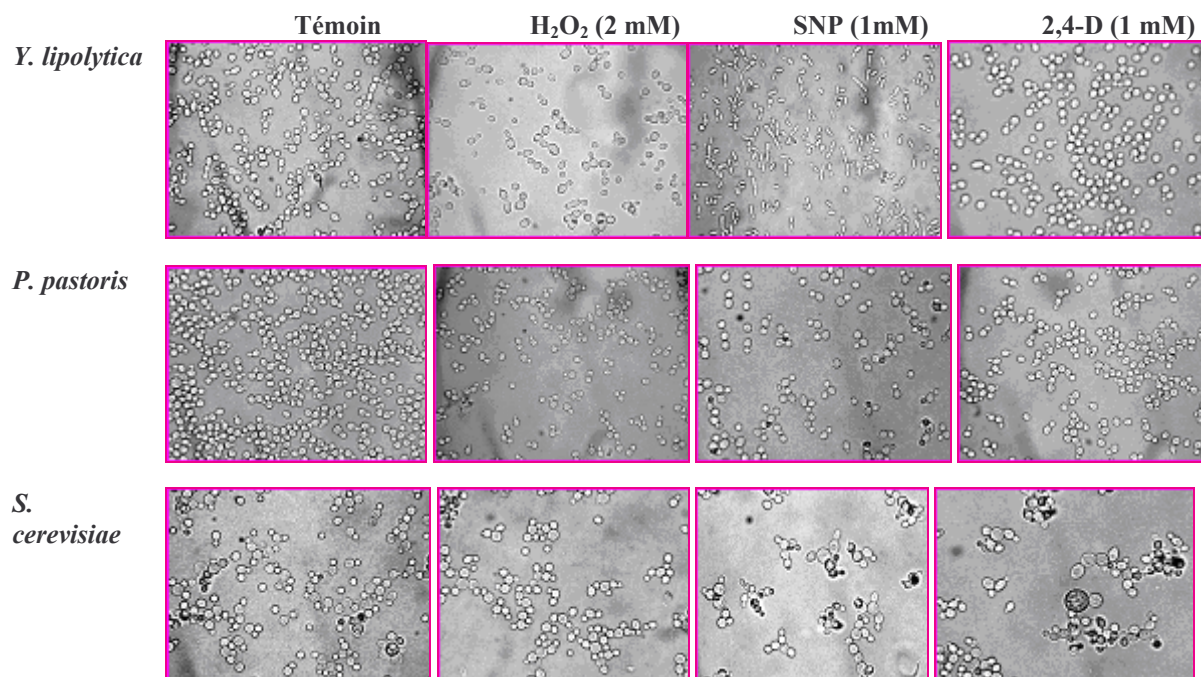


Figure 1 : Cellules de levures observées au microscope photonique. *Y. lipolytica*, *P. pastoris* et *S. cerevisiae* cultivées sans additifs (témoin) ou traitées par H₂O₂ 2mM, SNP 1mM et 2,4D 1mM.

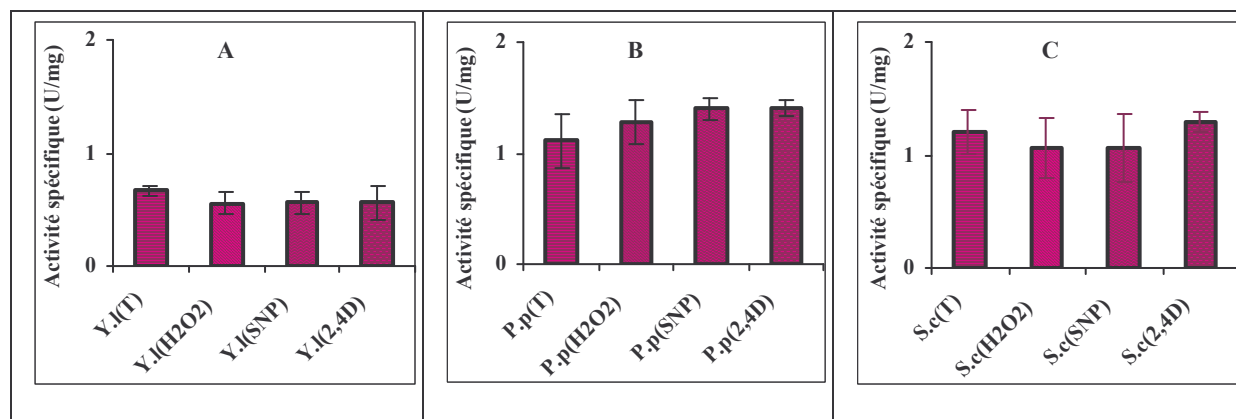


Figure 2: Activités spécifiques de la GAPDH (U/mg de protéine) dans les extraits bruts de *Y. lipolytica* (A), *P. pastoris* (B) et *S. cerevisiae* (C). Les levures témoins sont cultivées sur le milieu YPD seul et les levures traitées sont cultivées en présence de H₂O₂ (2mM), de SNP (1mM) et du 2,4D (1mM).

D'après les résultats on remarque que l'activité de la GAPDH demeure inchangée par rapport au témoin et ce indépendamment de l'agent additionné et de la concentration utilisée. L'effet du NO et H₂O₂ *In vivo* diffère d'un système cellulaire à un autre. Chez le modèle eucaryotique *Dictyostelium discoideum*, l'action du SNP mis en contact avec les cellules est immédiate en inhibant l'activité de la GAPDH, mais cette activité reprend son niveau normal après quelques min d'incubation (Tao et al, 1994). Chez les monocytes U937, H₂O₂ a un effet inhibiteur sur la GAPDH. L'enzyme reprend également son activité après 2 h (Colussi et al., 2000).

Concernant l'impact des agents de stress sur l'expression de la GAPDH, la figure 3 présente le profil électrophorétique des extraits bruts des 3 espèces cultivées en milieu YPD et en milieu YPD additionné de H₂O₂, SNP et 2,4-D. Aucune différence d'expression n'est observée au niveau de la GAPDH (36 kDa).

Ceci a été confirmé par western blot en utilisant un anticorps polyclonal anti-GAPDH de *Y. lipolytica*. D'un autre côté, pour mieux comprendre l'action des agents oxydants, nous avons étudié l'effet *in vitro* de H₂O₂, NO et 2,4-D sur la GAPDH extraite de ces levures. Les résultats ont montré une inactivation de l'enzyme. La protection de la GAPDH remarquée *in vivo* est due à un système de défense antioxydant. Ainsi, dans le but de comprendre le mécanisme d'action des ROS sur ces espèces eucaryotiques, nous envisageons d'étudier d'une part, les enzymes de stress et leur système antioxydant, et d'approfondir d'autre part, le rôle de la GAPDH dans ce mécanisme.

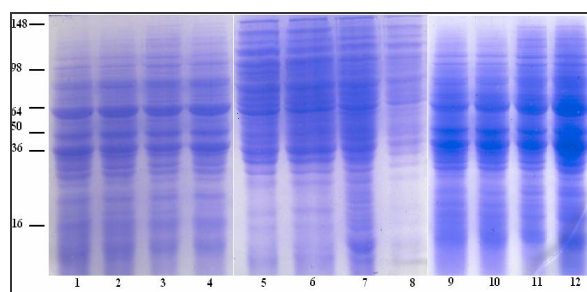


Figure 3: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (PAGE-SDS) montrant les extraits bruts de *Y. lipolytica* (1 :témoin ; 2 :traitée par H₂O₂ 2mM ; 3 :traitée par SNP 1mM ; 4 :traitée par 2,4D 1mM), *P. pastoris* (5 :témoin ; 6 :traitée par H₂O₂ 2mM ; 7 :traitée par SNP 1mM ; 8 :traitée par 2,4D 1mM) et *S. cerevisiae* (9 :témoin ; 10 :traitée par H₂O₂ 2mM ; 11 :traitée par SNP 1mM ; 12 :traitée par 2,4D 1mM). 40 µg de protéines ont été déposés par ligne. La GAPDH correspond à la bande de 36 kDa.

Bibliographie

- Amer SM, Aly FA 2001. Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse. *Mutat. Res.* 494: 1-12.
- Beckman KB et Ames BN (1997) Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272 : 19633–19636.
- Berlett BS et Stadtman ER. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272 : 20313–20316.
- Colussi C, Albertini MC, Coppola S, Rovidati S, Galli F, et Ghibelli L. 2000. H₂O₂-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis. *The FASEB Journal.* 14 : 22.

- Grant CM, Quinn KA, et Dawes IW. 1999. Differential Protein S-Thiolation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Isoenzymes Influences Sensitivity to Oxidative Stress. *Molecular and Cellular Biology*, p. 2650-2656, Vol. 19, No. 4
- Iglesias A, Serrano A, Guerrero, MG et Losada M. 1987. Purification and properties of NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 925 : 1-10.
- Kots AY, Skurat AV, Sergienko EA, Bulgarina TV et Severin ES. 1992. Nitroprusside stimulates the cysteine-specific mono(ADP-ribosylation) of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *FEBS Lett.* 300 : 9-12.
- Mohr S, Hallak H, de Boitte A, Lapetine EG et Brune B. 1999. Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 274 : 9427-9430.
- Soukri A, Hafid N, Valverde F, Elkebbaj MS et Serrano A. 1996. Evidence for a posttranslational covalent modification of liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in hibernating *Jaculus orientalis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1292 : 177-187.
- Tao Y., Howlett A. et Klein C. 1994. Nitric oxide regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in *Dictyostelium discoideum* cells and lysates. *Eur. J. Biochem.* 224 : 447-454.
- Teixeira M.C., Telo J.P., Duarte N.F. et Correia I. 2004. The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. *Biochim. Biophys. Res.* 324: 1101-1107.
- Vaughan M (1997) Oxidative modification of macromolecules minireviews series. *J Biol Chem*, 272 : 1853.