

BBA 65681

PRESENCE ET REGULATION DE LA SYNTHÈSE DE DEUX ALCOOL DES-HYDROGENASES CHEZ LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

L. SCHIMPFESSEL*

Institut de Recherches du Centre d'Enseignement et de Recherches des Industries Alimentaires et Chimiques (C.E.R.I.A.), Bruxelles, et Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Bruxelles, Bruxelles (Belgique)

(Reçu le 18 août, 1967)

SUMMARY

Presence and regulation of the synthesis of two alcohol dehydrogenases from Saccharomyces cerevisiae

(1) *Saccharomyces cerevisiae* is able to synthesize two different alcohol dehydrogenases (alcohol:NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.1) according to the culture carbon substrate: the alcohol dehydrogenase I produced by the yeast grown on glucose (aerobic or anaerobic growth) is the fermentative alcohol dehydrogenase, and the alcohol dehydrogenase II produced by the yeast grown on lactate or ethyl alcohol as a sole source of carbon and energy, is the oxidative alcohol dehydrogenase.

(2) The difference between the two enzymes is shown by the study: (1) of their thermostability, (2) of their substrate specificity.

(3) These two enzymes have common properties: they require NAD as co-factor and have the same optimal pH.

(4) The alcohol dehydrogenase II is repressed by glucose.

INTRODUCTION

La levure *Saccharomyces cerevisiae* peut croître en utilisant l'éthanol comme seule source carbonée, soit que l'éthanol est fourni comme seule source de carbone, soit que la levure après une croissance aérobie sur glucose assimile l'éthanol, produit de la fermentation aérobie, accumulé dans le milieu. Les courbes de croissance prolongée sur glucose témoignent de ce phénomène par l'apparition d'une diauxie.

Le présent travail est consacré à l'étude de la première enzyme de l'assimilation de l'éthanol chez *S. cerevisiae*: l'alcool déshydrogénase (alcool:NAD oxidoréductase, EC 1.1.1.1). En effet, la croissance de la levure sur l'éthanol comporte l'oxydation de l'alcool en acétate avec la formation transitoire d'acétaldéhyde. La présence des en-

* Présente adresse: Service de Biochimie, Faculté de Médecine de l'Université de Bruxelles, Bruxelles, Belgique.

zymes impliquées dans cette oxydation — l'alcool déshydrogénase qui oxyde l'éthanol en acétaldéhyde et l'aldéhyde déshydrogénase qui oxyde l'acétaldéhyde en acétate — a été bien établie chez *S. cerevisiae*.

Si l'alcool déshydrogénase de levure a fait l'objet de très nombreuses études tant sur le plan de sa structure que sur le plan de son mécanisme d'action, en revanche peu de travaux ont porté sur sa régulation. Peu sujette à d'importantes fluctuations, cette enzyme était réputée 'constitutive' chez la levure jusqu'à ces dernières années.

Pourtant en 1957, GALZY ET SLONIMSKI³ ont observé des taux d'activité d'alcool déshydrogénase plus élevés chez *S. cerevisiae* cultivée dans un milieu où le lactate est la seule source de carbone que dans la levure cultivée sur glucose. Cependant, la signification de ces teneurs élevées en alcool déshydrogénase sur lactate n'apparaît pas immédiatement même en considérant le double rôle possible de la réaction catalysée par l'alcool déshydrogénase. Cette observation nous a incités à reprendre l'étude de la régulation de l'alcool déshydrogénase chez la levure. Le détail de nos résultats est présenté dans ce qui suit; un bref aperçu de ceux-ci a été publié^{8,10}. Il existe deux alcool déshydrogénases (I et II) dont les régulations sont indépendantes, et la dérégulation catabolique de la déshydrogénase II est responsable des fortes variations observées. Plus récemment WITT, KRONAU ET HOLZER¹¹ d'une part, HOMMES⁴ d'autre part, sans distinguer les deux formes d'alcool déshydrogénases, ont confirmé les variations de la teneur globale d'alcool déshydrogénase. Ces auteurs ont montré que le taux d'activité de l'alcool déshydrogénase peut varier considérablement chez la levure selon qu'elle dispose ou non de glucose et lorsqu'elle en dispose, suivant la concentration initiale du milieu en glucose. HOLZER en a déduit que la synthèse de l'alcool déshydrogénase est réprimée par le glucose. Cet effet glucose au niveau de l'alcool déshydrogénase permet de contrôler l'intensité de la gluconéogenèse à partir d'éthanol, laquelle devient inutile lorsque la cellule dispose de glucose pour sa croissance.

Le présent travail établit chez *S. cerevisiae* l'individualité de deux alcool déshydrogénases impliquées dans des métabolismes différents. Déjà en 1957, EBISUZAKI ET BARRON² décrivaient la présence d'une seconde alcool déshydrogénase chez la levure sans attribuer à cette nouvelle enzyme un rôle particulier dans son métabolisme. En fait, alors que l'alcool déshydrogénase classique de la levure (alcool déshydrogénase I) est directement liée à la glycolyse où elle assure la réoxydation du NADH tout en réduisant l'acétaldéhyde en éthanol, la nouvelle alcool déshydrogénase (alcool déshydrogénase II) assure l'entrée de l'éthanol dans le métabolisme en l'oxydant en acétaldéhyde. C'est principalement la synthèse de cette dernière alcool déshydrogénase qui est sensible à la répression par le glucose. Les deux enzymes ont été différenciées sur la base de leur spécificité enzymatique, de leur thermostabilité et de leur cinétique d'inactivation thermique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souche levurienne

La souche de levure utilisée est une levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) de souche pure, 'Yeast foam' normale diploïde.

Milieux de culture

Le milieu naturel complexe avec glucose contient par l: Yeast extract, 2.5 g;

KH_2PO_4 , 2.7 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.6 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g; glucose, 20.0 g. La solution est amenée à un pH final de 6.5 et stérilisée à l'autoclave.

Le milieu de culture avec éthanol est le même milieu naturel complexe que le précédent mais sans glucose. La solution est amenée à un pH final de 5.0 et stérilisée à l'autoclave. 20 ml d'éthanol stérilisé par filtration sont ajoutés stérilement par l de milieu.

Les milieux de culture avec acétate et lactate sont préparés en substituant au glucose soit 6 g par l d'acétate de potassium, soit 22.4 ml par l d'une solution à 50% de lactate de sodium. Les solutions sont amenées à un pH final de 5.0 et stérilisées.

Croissance des levures

Les croissances, suivies au spectrophotomètre Beckman B à 660 $m\mu$, sont effectuées à 30°. L'aération des cultures est assurée par l'agitation constante des ballons sur l'incubateur mécanique.

Les cultures anaérobiques sont réalisées dans des ballons de 6 l contenant 4 l de milieu agité au moyen d'un barreau magnétique sous atmosphère d'azote. Les cellules sont récoltées, par centrifugation, en phase exponentielle de croissance (degré d'absorption 1.2).

Préparation des extraits

Après centrifugation de la culture à 0° pendant 4 min à $3000 \times g$ les culots de levure sont lavés à l'eau distillée et remis en suspension dans du tampon phosphate 0.05 M (pH 7.7) à raison de 5 g de poids humide environ dans 15 ml de tampon. Cette suspension est alors soumise aux ultrasons pendant 5 min dans un appareil Raytheon (10 Kc-250 W). L'extrait total obtenu est ensuite centrifugé à $3000 \times g$ pendant 5 min: le culot obtenu se compose de deux couches: l'une inférieure, constituée de cellules intactes, l'autre, supérieure, comportant les parois cellulaires. Le liquide surnageant qui constitue l'extrait brut est conservé à 0°. Enfin, l'extrait brut est centrifugé à $100\,000 \times g$ pendant 30 min, il en résulte d'une part, un culot d'aspect gelatinieux que constituent les granulations cytoplasmiques et d'autre part, le liquide surnageant ou fraction soluble.

Les protéines sont déterminées par la méthode du biuret.

Mesure de l'activité de l'alcool déshydrogénase

L'alcool déshydrogénase est dosée dans l'extrait soluble suivant la méthode de RACKER⁷ dans le sens de l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde.

En présence d'un excès d'éthanol, la vitesse de réduction de NAD est proportionnelle à la concentration en enzyme. La formation de NADH est suivie au spectrophotomètre enregistreur Beckman DK₁, sur un chemin optique de 1 cm à la longueur d'onde de 340 $m\mu$.

Les activités spécifiques de l'alcool déshydrogénase sont exprimées en unités rationnelles c'est-à-dire en μM de NADH formé par h/mg protéines, compte tenu du coefficient d'extinction molaire de NADH ($6.22 \cdot 10^3$).

RÉSULTATS

Evolution de l'activité d'alcool déshydrogénase au cours de la croissance de S. cerevisiae sur glucose

Une croissance prolongée de *S. cerevisiae* sur glucose comporte essentiellement trois phases distinctes: (1) la phase exponentielle de croissance sur glucose où la levure fermente le glucose en produisant de l'éthanol qui s'accumule dans le milieu; (2) la phase de ralentissement et de latence où l'épuisement du milieu en glucose provoque l'arrêt de la croissance aux dépens de ce sucre, et (3) la phase de croissance exponentielle sur éthanol où la levure assimile l'éthanol accumulé pendant la fermentation (voir Fig. 1).

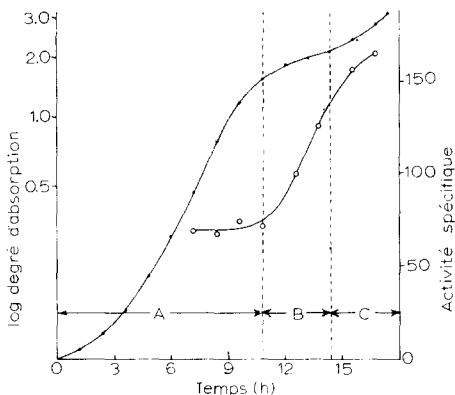


Fig. 1. Croissance de *S. cerevisiae* sur glucose (●) et activités spécifiques d'alcool déshydrogénase (○). Pour le détail des phases voir le texte.

Afin d'établir une éventuelle corrélation entre l'évolution de la physiologie cellulaire pendant cette croissance diauxique et l'équipement enzymatique de la levure, des dosages d'activité de l'alcool déshydrogénase ont été effectués sur des fractions solubles d'extraits de levures récoltées au long de la croissance.

Une augmentation sensible de l'activité spécifique de cette enzyme a lieu pendant les phases (2) et (3) (voir Fig. 1) au moment où la levure, ayant épuisé le glucose présent dans le milieu s'adapte à dégrader l'alcool accumulé.

Source carbonée de culture et taux d'activité d'alcool déshydrogénase

La détermination des taux d'activité de l'alcool déshydrogénase dans des extraits bruts de *S. cerevisiae* après croissance sur différents substrats carbonés a donné les résultats suivants (voir Tableau I).

Les extraits de levures cultivées sur éthanol, lactate, acétate ou glycérol comme seule source de carbone présentent tous des teneurs en alcool déshydrogénase très supérieures aux levures cultivées sur glucose.

Etude comparée des activités d'alcool déshydrogénase chez S. cerevisiae suivant la nature du substrat carboné de culture

Thermostabilité. Afin de déterminer la thermostabilité respective des différentes

TABLEAU I

TAUX D'ACTIVITÉ D'ALCOOL DÉSHYDROGÉNASE SUIVANT LA NATURE DU SUBSTRAT CARBONÉ DE CULTURE

Source carbonée	Durée (g) de croissance (min)	Activité spécifique (unités) d'alcool déshydrogénase de levures récoltées en	
		phase exponentielle	phase stationnaire
Glucose	45	20	60
Ethanol	260	170	250
Lactate	260	200	260
Acétate	160	110	—
Glycérol	260	250	—

préparations d'alcool déshydrogénase, des extraits solubles ont été soumis pendant 5 min à l'action de températures croissantes et leur activité résiduelle est dosée à la température ordinaire (Fig. 2). L'alcool déshydrogénase des extraits provenant des levures cultivées sur éthanol (extrait II) présente une thermostabilité plus élevée que celle des levures aérobiques ou anaérobiques sur glucose (extrait I).

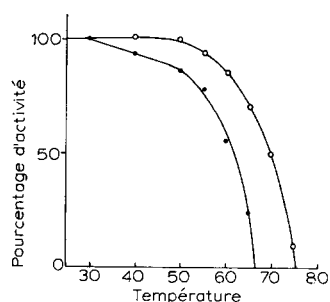


Fig. 2. Activité résiduelle d'alcool déshydrogénase après un traitement thermique de 5 min à différentes températures; ●, extrait de levures cultivées sur glucose; ○, extrait de levures cultivées sur éthanol.

Quant à l'extrait sur lactate, il pourrait être composé d'un mélange des deux types d'alcool déshydrogénase.

La température d'inactivation ou température à laquelle un traitement de 5 min

TABLEAU II

TEMPÉRATURE D'INACTIVATION DE L'ALCOOL DÉSHYDROGÉNASE SUIVANT L'ORIGINE DE L'EXTRAIT

Origine de l'extrait	Température d'inactivation	Type d'alcool déshydrogénase
Glucose/air	59°	alcool déshydrogénase I
Glucose/N ₂	60°	alcool déshydrogénase I
Ethanol	70°	alcool déshydrogénase II
Lactate	66.5°	alcool déshydrogénase I et II

suffit pour inactiver à 50 % l'activité initiale d'alcool déshydrogénase (d'après KAPLAN⁶) est déduite de ces mesures de thermostabilité (Tableau II).

Cinétique d'inactivation thermique

Dans le but d'évaluer quantitativement la thermorésistance relative des alcool déshydrogénases, des extraits solubles de levure sur glucose (I) et sur éthanol (II), préalablement dilués de manière à renfermer les mêmes concentrations en protéines,

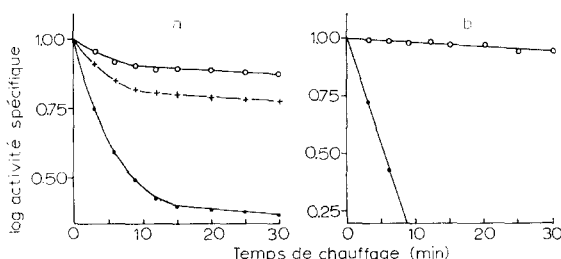


Fig. 3. Dénaturation thermique des alcool déshydrogénases à 61°. a. Cinétiques d'inactivation thermique de l'alcool déshydrogénase I (●), de l'alcool déshydrogénase II (○) et d'un mélange (+). b. Droites d'inactivation des alcool déshydrogénase I (●) et II (○) calculées d'après les données de a.

ainsi qu'un mélange des deux extraits, sont soumis à l'action de la chaleur, à températures définies (53°, 57°, et 61°) pendant divers intervalles; leur activité résiduelle est ensuite mesurée à température ordinaire¹².

La Fig. 3a représente les cinétiques d'inactivation à 61°. La thermodénaturation donne lieu tant pour les extraits traités séparément que pour le mélange, à des cinétiques complexes qui démontrent l'hétérogénéité des 3 échantillons. Mais alors que l'alcool déshydrogénase présente dans l'extrait I (glucose) est inactivée à plus de 90 % après 12 min à 61°, l'enzyme de l'extrait II (éthanol) conserve après ce traitement près de 90 % de son activité initiale. Ceci confirme que les alcool déshydrogénases présentes dans les deux types d'extraits diffèrent au moins par leur thermostabilité. Les droites d'inactivation des deux types d'alcool déshydrogénases ont été calculées d'après les données expérimentales (Fig. 3b) et permettent la détermination de la demi-vie respective des deux composants (Tableau III).

Ces valeurs se retrouvent tant pour les composants de l'extrait sur glucose que pour ceux de l'extrait sur éthanol, ce qui confirme l'identité des deux composants qui constituent l'extrait dans les deux cas.

TABLEAU III

DEMI-VIE DES ALCOL DÉSHYDROGÉNASES À 61°

Type d'alcool déshydrogénase	Demi-vie à 61°
Alcool déshydrogénase I	1 min 39 sec
Alcool déshydrogénase II	87 min 45 sec

TABLEAU IV

TENEUR DES DIFFÉRENTS EXTRAITS EN ALCOOL DÉSHYDROGÉNASES I ET II

Origine de l'extrait	Alcool déshydrogénase I (%)	Alcool déshydrogénase II (%)
Glucose/air (phase exponentielle)	93	7
Glucose/air (phase stationnaire)	64	36
Glucose/azote	98	2
Ethanol	37	63
Lactate	55	45

L'extrapolation au temps zéro des portions linéaires des deux courbes permet de déterminer le pourcentage des composants thermosensible (alcool déshydrogénase I) et thermorésistant (alcool déshydrogénase II) dans les différents extraits (Tableau IV).

Spécificité enzymatique

La comparaison des vitesses d'oxydation de divers alcools, dans des conditions standards, par les fractions solubles des extraits de levures a permis d'établir les spectres de spécificité des différents extraits.

Les alcools utilisés comprennent des molécules en C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ et C₈. Il s'agit respectivement des alcools méthylique, éthylique, *n*-propylique et isopropylique, *n*-butylique, *sec*-butylique et isobutylique, *n*-amylique et *n*-octylique; de plus, l'éthylène glycol et le glycérol ont également servi de substrat. Les conditions de dosage

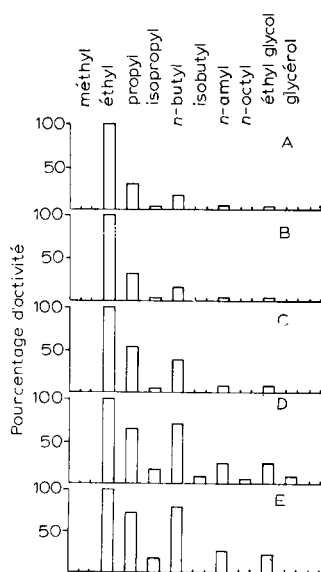


Fig. 4. Spectres de spécificité de l'alcool déshydrogénase des différents extraits de levures. A, glucose/air; B, glucose/azote; C, glucose/air-fin de croissance; D, éthanol; et E, lactate.

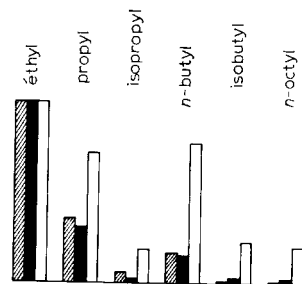


Fig. 5. Spectres de spécificité de l'alcool déshydrogénase I (■), de l'alcool déshydrogénase II (□) et de l'alcool déshydrogénase cristallisée commerciale (▨).

sont semblables à celles décrites pour le dosage de l'alcool déshydrogénase avec des concentrations en alcools identiques à la concentration en éthanol.

Les résultats sont groupés sous forme de graphiques où les activités sont exprimées en pourcent de l'activité pour l'éthanol prise comme 100% (voir Fig. 4).

Les activités d'alcool déshydrogénase d'extraits de *S. cerevisiae* présentent des différences significatives de leur spécificité à l'égard des alcools étudiés selon la nature du substrat carboné de culture: si les activités d'alcool déshydrogénase d'extraits de levures cultivées sur glucose tant en aérobiose qu'en anaérobiose présentent une grande similitude entre elles, elles se distinguent nettement des extraits de levures issues de cultures sur l'éthanol ou le lactate comme seule source de carbone, ces dernières activités se comportant l'une et l'autre semblablement.

Quant au changement de source carbonée qui s'effectue naturellement en fin de croissance aérobique sur glucose, il s'accompagne d'une modification de la spécificité de l'extrait vis-à-vis des alcools, qui est le reflet d'une variation de sa composition en alcool déshydrogénases.

La Fig. 5 réunit en un même graphique les activités de l'alcool déshydrogénase de levure cristallisée commerciale Boehringer (valeurs données par BARRON ET LEVINE¹) et les activités relatives des deux préparations solubles de *S. cerevisiae* cultivée sur glucose d'une part (alcool déshydrogénase I) et sur éthanol d'autre part (alcool déshydrogénase II).

Les activités de l'alcool déshydrogénase I sont comparables à celles de l'alcool déshydrogénase cristallisée, tandis que les activités de l'alcool déshydrogénase II s'en distinguent par une oxydation renforcée des alcools supérieurs.

Oxydation de l'alcool cinnamylique

EBISUZAKI ET BARRON² ont décrit la présence d'une seconde alcool déshydrogénase chez la levure qu'ils nomment également alcool déshydrogénase II. Parmi les alcools oxydables par cette nouvelle enzyme figure l'alcool cinnamylique qui est oxydé 10 fois plus rapidement par l'alcool déshydrogénase II que par l'alcool déshydrogénase classique.

L'étude de la spécificité enzymatique fut étendue à l'alcool cinnamylique afin d'établir une éventuelle identité entre l'alcool déshydrogénase II d'EBISUZAKI ET BARRON et l'alcool déshydrogénase II thermorésistante mise en évidence dans les divers extraits de levures au cours de la présente recherche.

Le Tableau V groupe les activités relatives pour l'alcool cinnamylique des diffé-

TABLEAU V

OXYDATION DE L'ALCOOL CINNAMYLIQUE PAR LES DIFFÉRENTS EXTRAITS

<i>Origine de l'extrait</i>	<i>Activité d'oxydation de l'alcool cinnamylique</i>
Glucose/N ₂	4
Glucose/air (phase exponentielle)	4
Glucose/air (phase stationnaire)	26
Ethanol	36
Lactate	30

TABLEAU VI

SPÉCIFICITÉ ENZYMATIQUE AVANT ET APRÈS UN TRAITEMENT THERMIQUE À 61° PENDANT 15 min

Alcools	Avant	Après
<i>n</i> -Propanol	31	49
<i>n</i> -Butanol	15	36
Isobutanol	1.6	3.9
Alcool cinnamylique	6.5	21
Octanol	1.4	9.2

rents extraits compte tenu de ce que l'on a attribué la valeur 100 à l'activité vis-à-vis de l'éthanol.

Ces résultats, rapprochés de ceux d'EBISUZAKI ET BARRON, semblent indiquer qu'il y a identité entre les deux enzymes au moins sur la base de l'activité à l'égard de l'alcool cinnamylique.

Dénaturation thermique et spécificité enzymatique

Soumis à un traitement thermique à 61° pendant 15 min, la fraction soluble d'un extrait de levures cultivées sur glucose perd 90% de son activité d'alcool déshydrogénase. Ce traitement thermique modéré réalise l'inactivation sélective de l'enzyme la plus thermosensible, l'alcool déshydrogénase I, sans dénaturer simultanément l'autre composante, l'alcool déshydrogénase II (d'après la Fig. 3a).

Immédiatement après ce traitement les échantillons sont refroidis dans la glace et les activités d'oxydation des différents alcools sont ensuite mesurées à la température ordinaire.

Le Tableau VI groupe les résultats de spécificité avant et après le traitement thermique.

La spécificité de l'activité résiduelle est sensiblement modifiée dans le sens d'une oxydation accrue des alcools supérieurs. Au contraire, un traitement thermique sem-

TABLEAU VII

ACTIVITÉ DES DEUX ALCOOL DÉSHYDROGÉNASES AU LONG DE LA CROISSANCE PROLONGÉE DE *Saccharomyces cerevisiae* SUR GLUCOSE

Degré d'absorption	Activité d'alcool déshydrogénase (unités)			% en alcool déshydrogénase II
	Initiale	Après dénaturation thermique (alcool déshydrogénase II)	Alcool déshydrogénase I calculée par différence	
0.400	72.7	2.4	70.3	3.3
0.840	68.6	2.45	66	3.6
1.200	57.4	2.9	54.5	5.1
1.560	89.3	5.5	83.7	6.2
1.700	90.5	8.4	82	9.3
1.860	100.5	17.7	83	17.6
1.940	119.6	23.4	96	19.5
2.290	156	50	106	32
3.200	170	61	109	36

blable effectué sur un extrait soluble de levures cultivées sur éthanol n'en modifie pas la spécificité.

Vitesses différentielles de synthèse des alcool déshydrogénases au cours de la croissance prolongée sur glucose

La résistance de l'alcool déshydrogénase II à l'inactivation lors d'un traitement thermique modéré a permis d'évaluer sa concentration relative dans les extraits de levures récoltées aux diverses densités optiques.

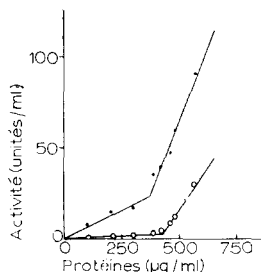


Fig. 6. Vitesse différentielle de synthèse des alcool déshydrogénases. ●, alcool déshydrogénase totale; ○, alcool déshydrogénase II.

Les échantillons d'extraits solubles sont placés pendant 15 min à 61° puis refroidis rapidement dans la glace. Leur activité résiduelle est ensuite mesurée à température ordinaire.

Les activités avant et après ce traitement ainsi que le pourcentage des échantillons en alcool déshydrogénase II sont consignés dans le Tableau VII.

Une représentation graphique de la vitesse différentielle de synthèse des différentes alcool déshydrogénases au cours de la croissance de *S. cerevisiae* sur glucose est obtenue en portant la quantité d'alcool déshydrogénase synthétisée par rapport à la quantité de protéines synthétisées (Fig. 6).

Il y apparaît une nette discontinuité dans la synthèse de l'alcool déshydrogénase

TABLEAU VIII

VITESSES DIFFÉRENTIELLES DE SYNTHÈSE ET TAUX DE DÉRÉPRESSION DES ALCOL DÉSHYDROGÉNASES

Enzymes	Phases	Vitesses différentielles de synthèse (unités/100 µg)	Taux de dérépression
Alcool déshydrogénase totale	Exponentielle	6	5.4
	Stationnaire	32.5	
Alcool déshydrogénase I	Exponentielle	5.7	2.2
	Stationnaire	12.5	
Alcool déshydrogénase II	Exponentielle	0.3	66.0
	Stationnaire	20	

globale qui est principalement le reflet de l'amorce de la synthèse de l'alcool déshydrogénase II.

Enfin, ces résultats permettent de chiffrer en unités d'activité par 100 μg de protéines, les vitesses différentielles de synthèse des différentes alcool déshydrogénases et d'évaluer le taux de dérépression des diverses enzymes au cours de la transition phase exponentielle-phase stationnaire (Tableau VIII).

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

L'étude comparée des activités d'alcool déshydrogénase présentes chez *S. cerevisiae* cultivée sur différents substrats carbonés démontre l'existence chez cette levure de deux protéines différentes à activité d'alcool déshydrogénase: l'alcool déshydrogénase I, présente principalement dans la levure en croissance tant aérobie que qu'anaérobie sur glucose et l'alcool déshydrogénase II, responsable de la majeure partie de l'activité d'alcool déshydrogénase des extraits de levure sur éthanol. Quant à l'activité d'alcool déshydrogénase de l'extrait de levure sur lactate, elle résulte de la présence dans l'extrait d'un mélange des deux types d'enzymes.

En se développant différemment chez la levure suivant la nature du milieu de culture, il semble que les deux enzymes puissent relever de deux métabolismes distincts. Ainsi, l'alcool déshydrogénase I principalement produite par la levure qui assimile le sucre selon un métabolisme essentiellement fermentaire, doit fonctionner *in vivo* dans le sens physiologique, à savoir la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol. C'est l'alcool déshydrogénase fermentative dont la spécificité est marquée pour l'acétaldéhyde qui constitue vraisemblablement son unique substrat physiologique. D'autre part, l'alcool déshydrogénase II qui se développe lorsque la levure croît sur éthanol comme seule source carbonée, appartient au métabolisme oxydatif en fonctionnant principalement dans le sens de l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde. C'est l'alcool déshydrogénase oxydative qui possède une spécificité étendue aux alcools en C_3 et C_4 et pourrait également jouer un rôle dans la détoxification de la cellule vis-à-vis des alcools supérieurs.

L'évolution de la teneur des cellules de levure en les deux alcool déshydrogénases au cours de la croissance aérobie sur glucose confirme le rôle imputé aux deux enzymes.

Mise à part l'étude déjà citée d'EBISUZAKI ET BARRON, peu de travaux avaient conduit leurs auteurs à envisager la possibilité d'une hétérogénéité de l'alcool déshydrogénase de la levure.

Dans une revue récente, SUND ET THEORELL⁹ estiment que les résultats actuels ne permettent pas de conclure définitivement à l'existence de deux alcool déshydrogénases différentes chez la levure.

Avec l'application de critères tels que la thermostabilité et la spécificité, ce travail apporte des arguments supplémentaires en faveur de l'hétérogénéité de l'alcool déshydrogénase chez la levure. De plus, l'étude comparée de la vitesse d'oxydation de l'alcool cinnamylique par les deux enzymes établit une similitude entre l'alcool déshydrogénase II décrite par EBISUZAKI ET BARRON, et l'alcool déshydrogénase oxydative, ce qui paraît confirmer définitivement l'existence de deux enzymes différentes chez *S. cerevisiae*.

Ainsi, la présence de deux alcool déshydrogénases chez la levure constitue-t-elle

un nouvel exemple du dédoublement d'une enzyme impliquée dans deux voies métaboliques ayant une étape en commun pour en garantir la coordination⁶.

En ce qui concerne la régulation des alcool déshydrogénases, les expériences décrites suggèrent que la synthèse de l'alcool déshydrogénase II est réprimée par le glucose. En effet, cette enzyme apparaît soit en fin de croissance sur glucose, soit en croissance sur un substrat tel que le lactate ou l'éthanol. Les faits observés par GALZY ET SLONIMSKI³ correspondent donc à la dérépression de l'alcool déshydrogénase oxydative provoquée par l'absence de glucose. Quant à la répression de l'alcool déshydrogénase par le glucose décrite par WITT, KRONAU ET HÖLZER¹¹ l'évaluation des taux de dérépression nous suggère que c'est l'alcool déshydrogénase oxydative qui est principalement réprimée lors de la croissance de la levure sur glucose. Par contre, l'épuisement du milieu en glucose ne modifie que faiblement le taux de synthèse de l'enzyme fermentative dont la régulation semble l'apparenter aux enzymes constitutives.

En conclusion, la levure *S. cerevisiae* synthétise deux alcool déshydrogénases différentes tant par leur thermostabilité que par leur spécificité. Leur séparation physique et leur purification sont actuellement à l'étude. Ce dédoublement des enzymes qui rend possible une régulation indépendante des deux fonctions auxquelles participe l'alcool déshydrogénase soulève le problème de l'origine et de l'évolution de ces déshydrogénases dans le cadre de la chaîne de différenciation évolutive qui a donné naissance aux types extrêmement nombreux de la famille des levures.

RÉSUMÉ

Saccharomyces cerevisiae peut synthétiser deux alcool déshydrogénases différentes suivant la nature de la source carbonée de culture: une alcool déshydrogénase I produite par la cellule en croissance aérobique ou anaérobique sur glucose (alcool déshydrogénase fermentative) et une alcool déshydrogénase II produite par la levure en croissance sur un substrat respiratoire tel que le lactate ou l'éthanol (alcool déshydrogénase oxydative).

Les deux alcool déshydrogénases ont été différenciées par l'étude de: (1) leur dénaturation thermique; (2) leur spécificité aux substrats.

Ces deux enzymes ont des propriétés communes: elles exigent toutes deux le NAD comme cofacteur et ont même pH optimum.

L'alcool déshydrogénase II est réprimée par le glucose.

REMERCIEMENTS

Nous sommes très reconnaissants à Monsieur J. M. WIAME de l'intérêt qu'il a constamment apporté à ce travail.

Nous remercions également l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.) qui nous a donné les moyens de réaliser ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. S. G. BARRON ET S. LEVINE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 41 (1952) 175.
- 2 K. EBISUZAKI ET E. S. G. BARRON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 69 (1957) 555.

- 3 P. GALZY ET P. P. SLONIMSKI, *Compt. Rend.*, 245 (1957) 2556.
- 4 F. A. HOMMES, *Arch. Biochem. Biophys.*, 114 (1966) 231.
- 5 N. O. KAPLAN, dans V. BRYSON ET H. J. VOGEL, *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York, 1965, p. 243.
- 6 H. L. KORNBERG, *15th Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, University Press, Cambridge, 1965, p. 8.
- 7 E. RACKER, *Methods in Enzymology*, 1 (1955) 500.
- 8 L. SCHIMPFESSEL, Thèse de Doctorat, 1964.
- 9 H. SUND ET H. THEORELL, *The Enzymes*, 7 (1963) 25.
- 10 J. M. WIAME, *Régulations chez les Micro-organismes*, Coll. Intern. C.N.R.S. No. 124, 1965 p. 381.
- 11 I. WITT, R. KRONAU ET H. HOLZER, *Biochim. Biophys. Acta*, 118 (1966) 522.
- 12 T. YURA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45 (1959) 197.

Biochim. Biophys. Acta, 151 (1968) 317-329