

BBA 66210

ALCOOL- ET ALDÉHYDE-DÉSHYDROGÉNASES PARTICULAIRES DE
CANDIDA TROPICALIS CULTIVÉ SUR HYDROCARBURES

J. M. LEBEAULT, B. ROCHE, Z. DUVNJAK ET E. AZOULAY

Laboratoire de Chimie Bactérienne, C.N.R.S., Marseille (France)

(Reçu le 22 juin, 1970)

(Manuscrit révisé reçu le 7 septembre, 1970)

SUMMARY

Some alcohol and aldehyde dehydrogenases of Candida tropicalis cultivated on hydrocarbons

Cell-free extract of a strain of *Candida tropicalis* cultivated on hydrocarbon catalyse in the presence of NAD^+ the oxidation of higher alcohols to the corresponding fatty acids; two enzymes, an alcohol dehydrogenase (alcohol: NAD^+ oxidoreductase, EC 1.1.1.1) and an aldehyde dehydrogenase (aldehyde: NAD^+ oxidoreductase, EC 1.2.1.3), have been studied.

Assay of these enzymes (340-nm spectrometry) fails with substrates barely soluble in water. The assay is therefore carried out with emulsions prepared with Tween-80 or with deoxycholate. Alternatively the substrates were solubilized with dimethyl formamide. K_m values obtained with 1-decanol using the modifications described were 31 mM, 7 mM and 0.7 mM, respectively. Kinetics properties and particularly the variation of the K_m and v_{\max} as a function of chain length of the substrates are reported.

Alkane and the corresponding alcohol and aldehyde are inducers of these enzymes.

INTRODUCTION

L'étude du métabolisme dégradatif des hydrocarbures chez les microorganismes nous avait conduit à proposer un schéma qui impliquait une transformation de l'hydrocarbure en alcool et aldéhyde; nous avons dans le cas précis de *Pseudomonas aeruginosa* montré qu'il existait une alcool et une aldéhyde déshydrogénase^{1,2} directement liées au métabolisme de l'heptane. D'autres auteurs^{3,4} ont par ailleurs mis en évidence l'importance de ces enzymes dans le métabolisme des alcanes.

Reprenant ces études avec différentes souches de levure nous avons constaté que *Saccharomyces cerevisiae* "accoutumé"⁵ aux hydrocarbures possède aussi une alcool-déshydrogénase de nature soluble et spécifiquement induite par les hydrocarbures. De même les extraits acellulaires de *Candida tropicalis* cultivé sur *n*-tétra-

décane peuvent catalyser la transformation de l'alkane en acide gras correspondant et dans cette transformation deux enzymes, une alcool-déshydrogénase (alcool:NAD⁺ oxido-réductase, EC 1.1.1.1) et une aldéhyde-déshydrogénase (aldéhyde:NAD⁺ oxido-réductase, EC 1.2.1.3), sont impliquées. L'étude sommaire de ce système⁶ nous a permis de constater que la majeure partie de ces activités sont localisées dans des particules d'origine mitochondriale.

Nous nous proposons donc dans ce mémoire de préciser la nature de ces enzymes chez *C. tropicalis* et d'en définir la régulation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Organisme

Candida tropicalis, souche 101 (réf. 7) de notre collection.

Cultures

La souche de *C. tropicalis* est cultivée dans un milieu minéral classique contenant: 100 mg/l d'extrait de levure⁷ Difco, le substrat de croissance pouvant être soit le glucose soit le *n*-tétradécane qui dans ce cas précis est ajouté sous forme d'une fine émulsion préparée par traitement aux ultra-sons; les cultures ajustées à pH 5.6 sont incubées à 32° sous agitation vigoureuse et par injection d'air comprimé sous un débit de 6 l/min dans un fermenteur New-Brunswick contenant 5 l de milieu de culture. Les cellules recueillies en phase exponentielle de croissance par centrifugation, lavées 2 fois avec une solution de NaCl 9‰ sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 7.7.

Préparation des extraits enzymatiques

Les suspensions microbiennes soumises pendant 1 min à une sonication dans un sonifieur (9 keycles) puis traitées dans une cellule de pression (French pressure cell) donnent après centrifugation à $500 \times g$ les extraits bruts. L'extrait obtenu est centrifugé à $5000 \times g$ pendant 20 min, le surnageant est à nouveau centrifugé dans une Spinco L4 à $220\,000 \times g$ pendant 90 min, les particules obtenues sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 7.7. Ce culot constitue l'extrait particulaire et le surnageant l'extrait surnageant.

Mesure de l'activité enzymatique

L'activité déshydrogénasique à l'égard des alcools est déterminée à partir de la mesure de la réduction du NAD⁺ à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss. Le système expérimental de 3 ml comprend du NAD⁺ $7 \cdot 10^{-3}$ M, extrait enzymatique (de 0.8 à 1.2 mg de protéine), le substrat insoluble dans l'eau est ajouté au système réactionnel à la concentration finale de $18 \cdot 10^{-3}$ M soit sous forme d'une fine émulsion préparée par traitement aux ultra-sons d'un mélange d'alcool (5%, v/v) dans une solution aqueuse de Tween 80 à 0.5‰ ou de désoxycholate de sodium mM, soit sous forme d'une solution 0.05 M dans la diméthylformamide.

L'activité aldéhyde-déshydrogénase est mesurée dans les mêmes conditions expérimentales.

Les deux activités sont exprimées en nmoles de NAD⁺ réduit par min et par mg de protéine dosée par la technique de LOWRY *et al.*⁸.

Mise en évidence des produits de la réaction

En fin de réaction enzymatique les protéines sont précipitées par addition de H_2SO_4 à 10%, après centrifugation le milieu réactionnel est extrait par un mélange benzène-éther (9:1, v/v) cette solution après concentration est reprise par de l'éther et analysée par chromatographie en couche mince sur gel de silice suivant la technique de MITCHELL ET HUBSCHER⁹ modifiée suivant les données déjà décrites⁶. Les R_F du 1-décanol, du décanal et de l'acide décanoïque sont respectivement de 0.8, 0.5 et 0.2 avec le solvant hexane diéthyléther, acide acétique (100:7:1, v/v/v).

RÉSULTATS

Distribution de l'activité alcool-déshydrogénase de C. tropicalis

Les extraits particuliers après leur séparation par centrifugation des extraits bruts obtenus par traitement des cellules de levures cultivées sur *n*-tétradécane et récoltées en phase exponentielle, catalysent la réduction du NAD^+ en présence de 1-décanol, le $NADP^+$, le 2,6-dichloroindophénol ou le ferricyanure ne peuvent en aucun cas remplacer le NAD^+ .

L'activité spécifique mesurée dans ces conditions est cependant fonction de nombreux paramètres et en particulier du degré d'émulsion du substrat et de la stabilité de cette émulsion en fonction du temps, aussi la valeur de cette activité mesurée dans les premières 30 sec peut varier entre 250 et 600 unités.

TABLEAU I

DISTRIBUTION DES ACTIVITÉS ALCOOL-DÉSHYDROGÉNASE ET ALDÉHYDE DÉSHYDROGÉNASE DANS LES EXTRAITS ACELLULAIRES DE *C. tropicalis* CULTIVÉ SUR *n*-TETRADÉCANÉ

Fraction	Activité alcool-déshydrogénase		Activité aldéhyde-déshydrogénase	
	Activité spécifique*	Activité récupérée (%)	Activité spécifique*	Activité récupérée (%)
Centrifugation à $500 \times g$	S ₁ 164	100	200	100
Centrifugation à $5000 \times g$	S ₂ 346	120	418	120
Centrifugation à $220000 \times g$	S ₃ 102	14	38	11
	P' ₃ 418	71	496	60
	P ₃ 128	9	208	14

* Activité spécifique exprimée en nmoles de NAD^+ réduit par min et par mg de protéine.

Des essais préliminaires de localisation enzymatique ont été réalisés sur différentes fractions séparées par centrifugation différentielle des extraits bruts (Tableau I). Nous constatons qu'après centrifugation à $220\ 000 \times g$ les fractions particulières se divisent en deux couches superposées que l'on peut aisément séparer et qui constituent les fractions P'₃ et P₃ du Tableau I. Plus de 70% de l'activité alcool-déshydrogénase initiale se retrouve dans les particules P'₃ qui sont par ailleurs très riches en activité cytochrome-oxydase. Ce dernier fait est à rapprocher de ce que nous avons déjà décrit dans une précédente publication⁶. Nous avons à partir d'une technique de préparation de protoplastes¹⁰ et de séparation de mitochondries, constaté que plus de 80% de cette activité était localisée dans les mitochondries.

L'analyse qualitative des produits de la réaction d'oxydation du 1-décanol permet de mettre en évidence l'acide décanoïque et des traces d'aldéhyde décyclique. Ces résultats s'expliquent par le fait que ces mêmes extraits particuliers possèdent une activité aldéhyde-déshydrogénase responsable de l'oxydation de l'aldéhyde formé au cours de l'oxydation de l'alcool (Tableau I).

Oxydation des alcools supérieurs par les extraits particuliers de C. tropicalis

Mesurée dans les conditions indiquées avec des extraits particuliers, l'activité est proportionnelle à la concentration en protéines, et l'activité endogène est nulle. L'oxydation du 1-décanol en présence de NAD^+ par les extraits particuliers est directement liée au degré d'émulsion du composé insoluble dans l'eau, nous avons déjà signalé ce phénomène à propos d'une alcool-déshydrogénase de *S. cerevisiae*⁵. Nous avons repris cette même expérience avec les extraits particuliers de *C. tropicalis* en effectuant des mesures d'activité enzymatique avec des émulsions de 1-décanol préparées soit en présence de Tween 80 (0.5%) soit de désoxycholate ($1 \cdot 10^{-3}$ M) soit à partir de solution de 1-décanol dans la diméthylformamide. Le v_{\max} mesuré dans ces conditions est égal à 1250 unités (exprimées en nmoles de NAD^+ réduit par min

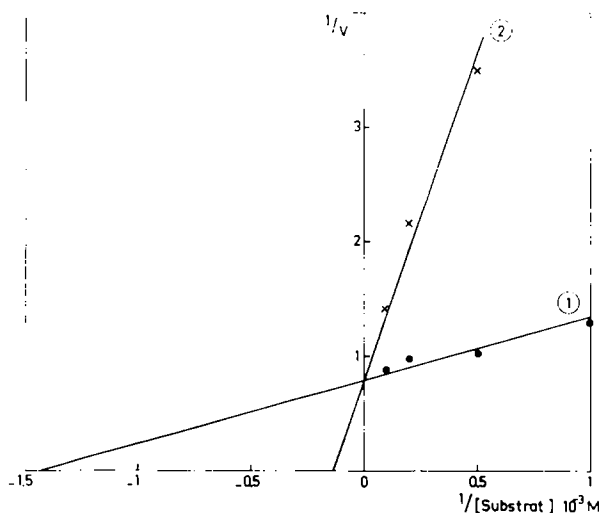


Fig. 1. Influence de la concentration et du degré de dispersion du 1-décanol sur la vitesse initial d'oxydation de ce substrat. Représentation graphique de Lineweaver Burk. Le 1-décanol est introduit dans le mélange réactionnel soit sous forme de solution dans la diméthylformamide (1) soit émulsionné avec du désoxycholate (2).

et par mg de protéine) et reste identique pour les divers types d'émulsion (Fig. 1). Il n'en est pas de même pour les K_m qui sont respectivement égaux à $K_m = 31$ mM (Tween 80), $K_m = 7$ mM (désoxycholate), $K_m = 0.7$ mM (diméthylformamide). Parallèlement l'examen microscopique des différentes émulsions testées montre que les préparations en présence de désoxycholate sont nettement plus fines et plus homogènes que celles préparées avec le Tween 80. Mais il est incontestable que c'est avec des solutions de 1-décanol dans la diméthylformamide que nous obtenons les meilleurs résultats, aussi nous avons systématiquement utilisé cette dernière méthode

TABLEAU II

ACTIVITÉ ALCOOL-DÉSHYDROGÉNASE À L'ÉGARD DES DIFFÉRENTS ALCOOLS DES EXTRAITS ACELLULAIRES DE *C. tropicalis* CULTIVÉ SUR *n*-TETRADÉCANE

Substrat	Activité spécifique*
1-Décanol	1250
2-Décanol	820
5-Décanol	20
9-Décène-1-ol	1200
1,10-Decanediol	1050

* Exprimée en μ moles de NAD^+ réduit par min et par mg de protéine.

pour mesurer l'activité enzymatique. Ce choix est d'autant plus significatif que la préparation d'émulsion avec les α,ω -diols en présence de Tween est impossible et qu'une solubilisation préalable dans la diméthylformamide est nécessaire.

Sur la base de ces considérations, nous avons comparé les vitesses d'oxydation de plusieurs alcools en présence de NAD^+ et d'extrait particulaire.

La spécificité à l'égard de la fonction alcool est illustrée par le Tableau II. Le 2-décanol est oxydé tandis que le 5-décanol ne l'est plus, le 9-décène-1-ol et le 1,10-décanediol sont également substrats. Nous avons d'autre part comparé les vitesses d'oxydation des différents alcools primaires aliphatiques en présence de NAD^+ et d'extrait particulaire et nos observations illustrées par la Fig. 2 montrent que les activités spécifiques obtenues avec les alcools de C_6 à C_{16} sont relativement voisines sauf en ce qui concerne l'hexanol et l'hexadécanol. Il est important de souligner que l'éthanol et les autres alcools à nombre d'atomes de carbone inférieur à 6 ne sont en aucun cas oxydés.

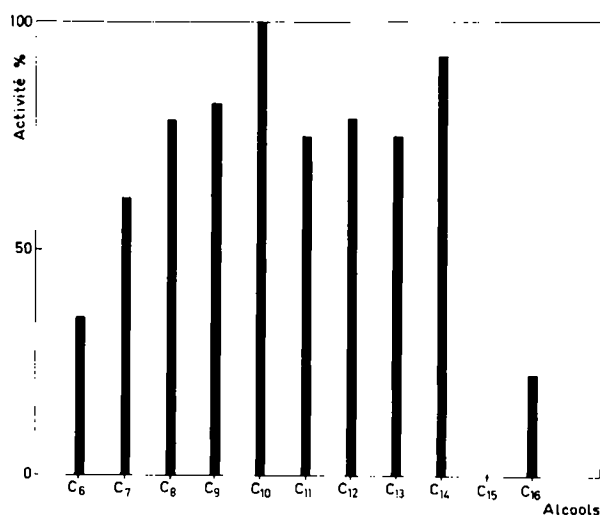


Fig. 2. Influence de la longueur de chaîne des alcools primaires sur l'oxydation de ces alcools, activités exprimées en % de l'activité spécifique mesurée avec le 1-décanol; système standard: 1 mg de protéines particulaires, substrat $18 \cdot 10^{-3}$ M et NAD^+ $7 \cdot 10^{-3}$ M. (Le substrat a été préalablement dissout dans la diméthylformamide mM.)

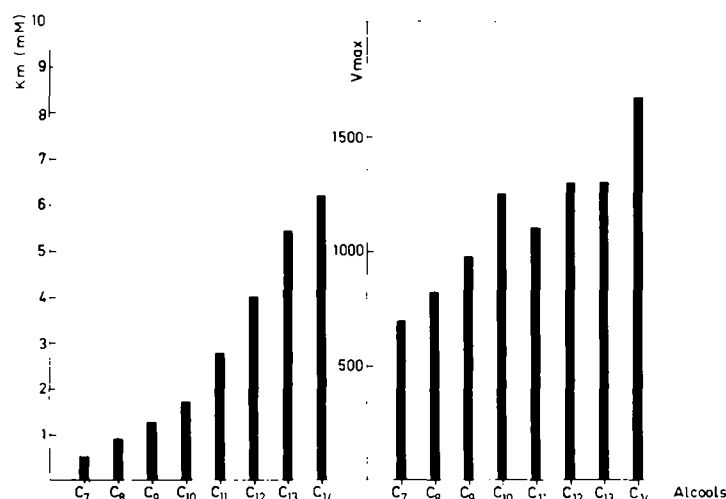


Fig. 3. Influence de la longueur de chaîne des alcools primaires sur les K_m et V_{max} de ces substrats.

Une étude comparative plus rigoureuse, puisque déterminée à partir des K_m et v_{max} calculés pour chacun de ces alcools, est illustrée par les Figs. 3 et 4. On constate ainsi que le tétradécanol donne le v_{max} le plus fort et le K_m le moins efficace par rapport au 1-décanol. La même étude réalisée avec les α,ω -diols donne des K_m qui diminuent et des v_{max} qui augmentent avec la longueur de la chaîne carbonée du substrat soit pour le 1,8-octanediol ($K_m = 2.1$ mM, $v_{max} = 830$) et 1,12-dodecanediol ($K_m = 1.9$ mM, $v_{max} = 1150$).

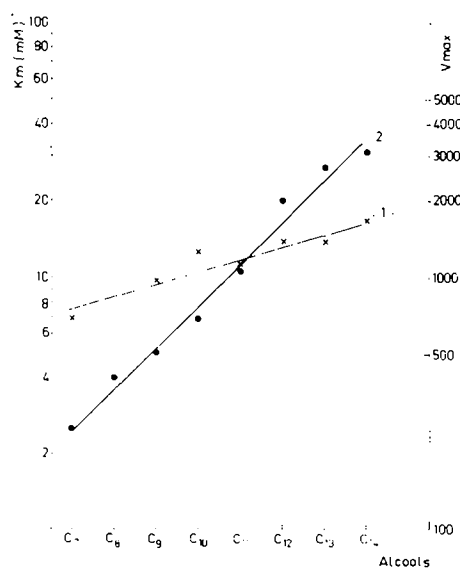


Fig. 4. Variation des K_m (1) et v_{max} (2) en fonction de la longueur de chaîne des alcools (coordonnées semi-logarithmiques).

TABLEAU III

INFLUENCE DES DIFFÉRENTS INHIBITEURS SUR LES ACTIVITÉS, ALCOOL DÉSHYDROGÉNASE MESURÉE À L'ÉGARD DU 1-DÉCANOL ET DU 1,10-DECANEDIOL ET ALDÉHYDE-DÉSHYDROGÉNASE MESURÉE À L'ÉGARD DU DÉCANAL

Inhibiteur (1 mM)	Inhibition (%)		
	Alcool-déshydrogénase		Aldéhyde-déshydrogénase
	1-Décanol	1,10-Décanediol	Décanal
Iodoacétate de sodium	44	37	
Hydroxylamine	32	32	100
Éthylmaléimide	83	81	75
Cystéine	50	54	
HgCl ₂	100	100	100
p-Chloromercuribenzoate	100	100	100
KCN	62	65	51
NaN ₃	33	31	24
Cu ²⁺	50	54	32
Fe ²⁺	84	82	35
Mg ²⁺	35	38	32
Ca ²⁺	30	30	35
β-Mercapto-éthanol	—	—	10

Propriétés de l'alcool-déshydrogénase

En fonction du pH cette activité enzymatique présente un optimum en tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 9.3, ou en tampon glycine NaOH 0.05 M, pH 9.3. Nous n'avons constaté aucune activation ou inhibition en remplaçant le tampon Tris-HCl par un tampon pyrophosphate de sodium à même molarité et même pH.

Une incubation à 40° pendant 5 min donne une perte d'activité de 80%, et la même incubation à 45° entraîne une inactivation totale. L'action des inhibiteurs résumée dans le Tableau III est particulièrement significative pour le KCN et le NaN₃. Cette action rapproche cet enzyme de l'éthanol-déshydrogénase classique et le différencie de l'enzyme de *S. cerevisiae* actif à l'égard des alcools supérieurs. À l'égard des métaux l'inhibition est dans l'ordre décroissant Fe²⁺ > Cu²⁺ > Mg²⁺. Les mesures d'inhibition effectuées en présence de 1,10-decanediol ou de 1-décanol comme substrat donnent les mêmes résultats.

Il convient de souligner l'inhibition provoquée par l'acide décanoïque qui à la concentration de $1 \cdot 10^{-3}$ M inhibe cette activité de 20 à 25%. Ce résultat est à rapprocher de l'activité alcane-déshydrogénase de cette même levure.

Étude de l'activité aldéhyde-déshydrogénase des extraits particuliers

Nous avons montré que 1-décanol en présence d'extrait particulière et de NAD⁺ était transformé en acide décanoïque, la même expérience réalisée avec comme substrat l'aldéhyde décyclique en solution dans la diméthylformamide conduit aussi à la formation d'acide décanoïque. Ces extraits particuliers peuvent donc catalyser l'oxydation des aldéhydes en présence de NAD⁺. Une étude comparative sur la localisation de cette activité nous a permis de constater qu'elle était fortement liée à l'activité alcool-déshydrogénase, et comme précédemment (Tableau I) 74% de l'activité totale de l'extrait se retrouve dans la fraction particulière.

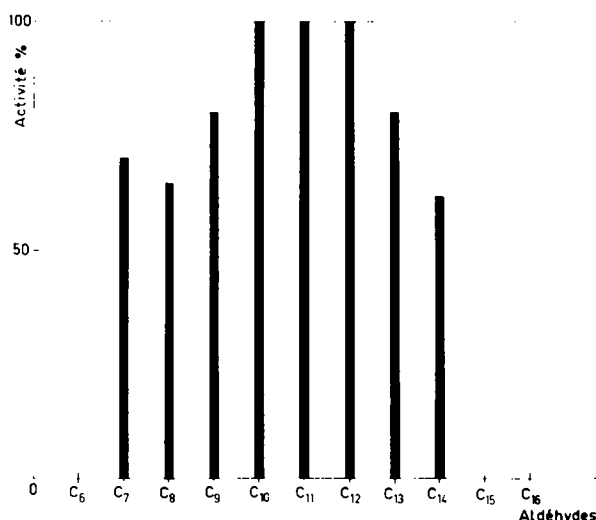


Fig. 5. Activité aldéhyde-déshydrogénase à l'égard des différentes aldéhydes des extraits acellulaires de *C. tropicalis*. L'activité est exprimée en % de l'activité mesurée avec le décanal.

Cet enzyme est NAD-dépendant et en aucun cas le NADP ou les colorants ne peuvent remplacer ce coenzyme, la valeur de la constante de Michaelis à l'égard de cet accepteur d'électron est $K_m = 0.8 \cdot 10^{-3}$ M.

En fonction du substrat et pour une quantité déterminée d'extrait enzymatique, l'activité déshydrogénasique croît en fonction de la concentration en substrat et aucune inhibition par excès de substrat n'est constatée sur l'aldéhyde déshydrogénase de *Pseudomonas aeruginosa*². Comme précédemment l'activité spécifique est fonction du degré d'émulsion du substrat. Ainsi les valeurs des K_m diffèrent en fonction du

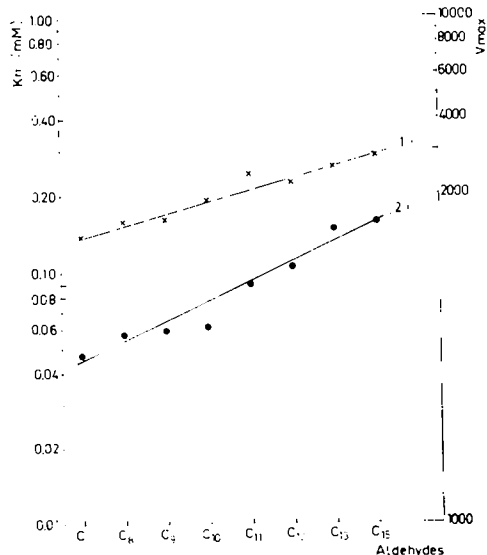


Fig. 6. Variation des K_m (1) et v_{max} (2) en fonction de la longueur de chaîne des aldéhydes (Coordonnées semi-logarithmiques).

type d'émulsion $K_m = 24$ mM (Tween 80) et $K_m = 0.06$ mM (diméthylformamide) et au v_{\max} de 2120 unités. L'activité à l'égard du substrat est illustrée par la Fig. 5. Cependant si l'on se rapporte à la détermination relative des K_m et v_{\max} (Fig. 6) en fonction de la longueur de chaîne, nous retrouvons le même phénomène que celui déjà décrit pour l'alcool-déshydrogénase. L'examen de cette figure met en évidence une variation exponentielle des valeurs des K_m et v_{\max} en fonction du nombre d'atomes de carbone du substrat et que pour un K_m peu efficace correspond un v_{\max} fort. L'oxydation des aldéhydes inférieures n'est pas possible dans les conditions décrites.

En fonction du pH l'activité aldéhyde-déshydrogénase de *C. tropicalis* présente un optimum en tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 8.5, l'activité mesurée en tampon glycine-NaOH 0.05 M, pH 8.5, est légèrement inférieure. Cet optimum est légèrement inférieur à celui déterminé pour l'alcool-déshydrogénase.

Cet enzyme est comme le précédent thermosensible, mais relativement moins puisqu'une incubation de 5 min à 40° n'entraîne qu'une inhibition de 30% et que des incubations à 45° pendant 30 min ne donnent que 90% d'inactivation.

L'activité enzymatique déterminée en présence d'ATP et de CoA ne donne pas d'ester de ces composés que nous avons recherché suivant la méthode décrite¹¹; de plus aucun de ces deux composés n'active ou n'inhibe la réaction.

D'une manière plus générale l'action des inhibiteurs a été rapportée dans le Tableau III qui permet de constater les nombreuses analogies de cet enzyme avec l'alcool-déshydrogénase. Il convient cependant de souligner par comparaison avec l'alkane-déshydrogénase et l'alcool-déshydrogénase de ces mêmes particules que l'aldéhyde-déshydrogénase est insensible à l'action des acides gras. Il faut enfin signaler l'influence exercée par les composés à groupement -SH et en dehors du CoA qui n'a aucun effet, le β -mercapto-éthanol est très faiblement inhibiteur.

Essais de séparation des activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénases particulières de C. tropicalis

La présence de deux activités enzymatiques de nature particulière nous a incité à entreprendre des essais de solubilisation de ces particules en présence de désoxycholate, ou de digitanine dissoute dans la diméthylformamide, ces traitements se sont révélés inefficaces et ont conduit à la perte des deux activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénases. Des essais de séparation de ces activités particulières ont donc été réalisés en soumettant à une ultracentrifugation cet extrait sur un gradient de concentration linéaire en saccharose de 20 à 80% (p/v) suivant la technique de MARTIN ET AMES *et al.*¹² modifiée par AZOULAY ET PUIG¹³ dans les conditions suivantes: 0.5 ml de l'extrait particulière P, contenant 15 mg de protéine par ml est placé sur 4.5 ml de gradient de saccharose et centrifugé pendant 5 h dans un rotor SW 39 L à 39 000 rev./min (Fig. 7). On peut constater que l'activité aldéhyde-déshydrogénase se répartit dans deux fractions particulières de densité différente alors que l'alcool-déshydrogénase se dissocie en une fraction particulière et une autre de nature soluble. La présence de cette activité de nature soluble est probablement consécutive à une légère solubilisation des particules portant sur environ 1 à 5% des protéines totales, si l'on se réfère à la courbe de protéine de la Fig. 7. Cette activité de nature soluble pourrait aussi correspondre à une autre alcool-déshydrogénase identique à celle qui a été mise en évidence chez *S. cerevisiae*.

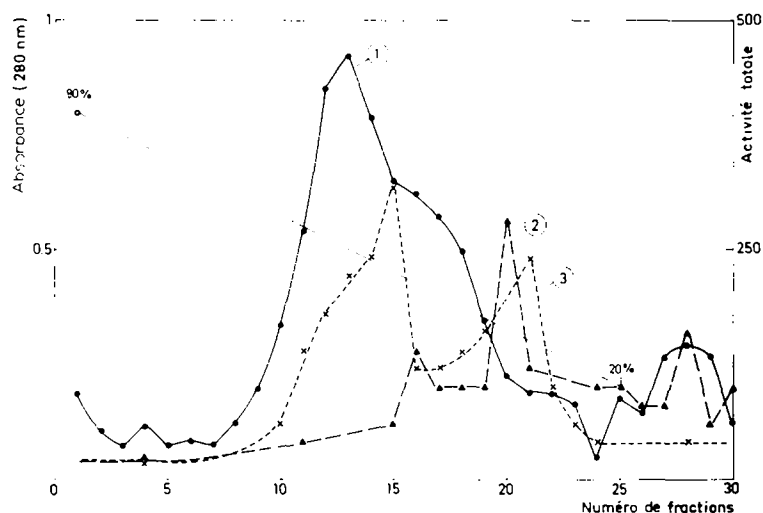


Fig. 7. Profil de sédimentation sur gradient de concentration linéaire de 20 à 80% en saccharose d'un extrait particulier de *C. tropicalis* cultivée sur *n*-tétradécane. Sur les fractions recueillies après 5 h de centrifugation à $170\,000 \times g$ ont été déterminées les protéines (Courbe 1), l'activité alcool-déshydrogénase (Courbe 2), l'activité aldéhyde-déshydrogénase (Courbe 3). Pour les unités d'activités voir *Méthodes*.

Essais de régulation de ces enzymes

Lorsque les cellules de *C. tropicalis* sont cultivées en aérobie sur *n*-tétradécane, leurs extraits particuliers catalysent l'oxydation des alcools et aldéhydes supérieurs en présence de NAD⁺ avec des niveaux enzymatiques moyens de l'ordre de 600 unités (Tableau IV). Cultivées dans les mêmes conditions sur glucose, les niveaux diminuent d'environ 15 fois. Ce résultat est en accord avec ce que nous avons constaté à propos de la souche 101 de *C. tropicalis* qui est capable de respirer les hydrocarbures lorsqu'elle est cultivée sur glucose⁷. La croissance à partir de substrats autres que le glucose et le *n*-tétradécane permet d'obtenir des extraits ayant des activités enzymatiques nettement plus fortes que le niveau de base obtenu avec des cultures sur

TABLEAU IV

ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DES EXTRAITS ACELLULAIRES DE *C. tropicalis* CULTIVÉ SUR DIFFÉRENTS SUBSTRATS

Substrat de croissance	Activité*	
	Alcool- déshydrogénase	Aldéhyde- déshydrogénase
Glucose	39	61
<i>n</i> -Tétradécane	600	647
1-Tétradécène	132	227
1-Tétradécanol	249	275
Tétradécanol	130	173
Acide tétradécanoïque	55	110

* Exprimée en nmols de NAD⁺ réduit par min et par mg de protéine

glucose. Ces observations montrent que ces enzymes sont inductibles et que les inducteurs semblent être successivement le *n*-tétradécane, l'alcool et l'aldéhyde correspondants. Comme cela pouvait être prévu les acides gras n'ont aucun effet sur la synthèse de ces différents enzymes, il reste bien entendu que les acides gras sont des inhibiteurs de l'activité alcool-déshydrogénase.

DISCUSSION

Les extraits de *C. tropicalis* cultivés sur *n*-tétradécane catalysent la transformation du 1-décanol et du décanol en acide décanoïque en présence de NAD^+ . Les activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénases impliquées dans cette transformation ont été localisées dans les fractions particulières qui sédimentent à $220\,000 \times g$, ce résultat est en accord avec des observations déjà décrites⁶ qui nous avait amené à localiser ces deux activités dans des mitochondries de ces levures et plus précisément dans les particules obtenues par traitement de ces mitochondries par la digitonine, on peut donc penser que les deux enzymes sont probablement localisés au niveau des membranes mitochondriales et qu'elles sont fortement associées l'une à l'autre. En effet les essais de séparation après solubilisation de ces particules par différents traitements s'étant avéré inefficaces, nous ne pouvons dans l'état actuel de nos expériences savoir dans quelle mesure ces deux activités enzymatiques peuvent se dissocier. Il est vrai que certains caractères permettent de les distinguer, en particulier la différence de sensibilité à la température, l'alcool-déshydrogénase étant plus thermolabile et totalement inactivée après une incubation de 5 min à 45° ; ainsi qu'une sensibilité très spécifique de cet enzyme à l'égard des acides gras.

Cependant l'alcool- et l'aldéhyde-déshydrogénases sont synthétisées dans les mêmes conditions et l'examen du Tableau IV montre que le niveau le plus élevé est obtenu pour les cellules cultivées sur *n*-tétradécane, les cultures sur glucose donnent un niveau d'activité enzymatique non négligeable et qui correspond au niveau de base synthétisé en l'absence d'inducteur et qui est égal au 1/15 de l'activité induite. Parallèlement il convient de souligner que les cultures sur acide tétradécanoïque n'augmentent pas ce niveau de base ce qui nous permet de penser que l'alcool et l'aldéhyde sont bien des métabolites intermédiaires dans la dégradation du *n*-tétradécane.

La vitesse de réduction du NAD^+ en présence d'extrait particulière de *C. tropicalis* est maximale lorsque l'on utilise des solutions d'alcool ou d'aldéhyde dans la diméthylformamide c'est-à-dire dans des conditions où le degré de dispersion de substrat dans le système réactionnel est le meilleur. L'influence de la dispersion se manifeste d'autre part si l'on compare les K_m obtenus avec différentes émulsions. L'utilisation de solutions dans la diméthylformamide permet de mieux déterminer la spécificité à l'égard du substrat.

Deux constatations s'imposent:

(1) Le v_{\max} augmente avec la longueur de chaîne du substrat et donc avec l'insolubilité de ce composé dans l'eau ce qui est une indication en faveur d'une action catalytique en milieu hétérogène, mais qui va aussi dans le sens du rôle physiologique de cet enzyme dans cette chaîne métabolique de dégradation, spécifique des alcanes de C_{10} à C_{16} chez cette levure.

(2) Ces extraits catalysent avec la même efficacité l'oxydation des alcools

primaires et des α,ω -diols; la question que l'on peut se poser à ce propos est de savoir si ces deux types d'alcool sont des substrats d'un même enzyme. De nombreuses observations vont dans ce sens en particulier l'action des inhibiteurs et la thermolabilité. Il est important de souligner que cette oxydation des α,ω -diols supérieurs en présence de NAD^+ n'est possible que pour des solutions de ces composés dans la diméthylformamide. Il résulte de nos observations que l'alcool-déshydrogénase mise en évidence dans ces levures se différencie de l'alcool-déshydrogénase induite par les hydrocarbures chez *P. aeruginosa* étudiée par VAN DER LINDEN ET HUYBREGTSE⁴ du fait que l'affinité de cette enzyme augmente avec la longueur de chaîne contrairement à ce que nous avons constaté; que par ailleurs elle est incapable de réduire le NAD^+ et n'est actif qu'avec le dichlorophénolindophénol ou avec le cytochrome *c* de cœur de bœuf. Cependant dans les deux cas, les α,ω -diols sont de bons substrats de ces enzymes et l'on peut s'interroger sur la signification physiologique d'une telle oxydation et en particulier du lien existant avec la dégradation des hydrocarbures; à moins de penser à un processus d'oxydation des deux groupements méthyls des extrémités de la chaîne hydrocarbonée. Des expériences préliminaires déjà décrites⁶ nous ont permis de constater que cette alcool-déshydrogénase de nature particulière existe aussi chez *S. cerevisiae* SAT ce qui implique que les hydrocarbures induisent deux alcool-déshydrogénases spécifiques des alcools supérieurs. La question que l'on peut se poser est de savoir s'il en est de même chez *C. tropicalis*. Les essais de séparation effectués sur les extraits enzymatiques sont en faveur de l'existence d'une alcool-déshydrogénase de nature soluble que nous nous proposons d'étudier afin de vérifier la validité de notre hypothèse.

RÉSUMÉ

Les extraits acellulaires d'une souche de *Candida tropicalis*, cultivée sur hydrocarbures, catalysent, en présence de NAD^+ l'oxydation des alcools supérieurs en acides gras correspondants; deux enzymes: une alcool déshydrogénase (alcool: NAD^+ oxido-réductase, EC 1.1.1.1) et une aldéhyde déshydrogénase (aldéhyde: NAD^+ oxido-réductase, EC 1.2.1.3) ont été étudiées.

Il a été impossible d'effectuer des mesures d'activité enzymatique par spectrophotométrie (340 nm) dans le cas de ces substrats faiblement solubles dans l'eau. Aussi ces mesures ont elles été effectuées soit à partir d'émulsions préparées avec du Tween 80 ou du désoxycholate, soit à partir de solutions dans la diméthylformamide. Dans ces conditions expérimentales K_m obtenues pour le 1-décanol sont respectivement 31 mM, 7 mM et 0.7 mM. Les propriétés cinétiques et particulièrement les variations des K_m et des v_{\max} en fonction de la longueur de chaîne hydrocarbonée des substrats ont été étudiées. Les alcanes, les alcools et aldéhydes correspondants constituent les meilleurs inducteurs de ces enzymes.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la Société Française des Pétroles B.P. pour son aide financière, et Mme M. C. Villeminot pour son assistance.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. AZOULAY ET M. T. HEYDEMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 73 (1963) 1.
- 2 M. T. HEYDEMAN ET E. AZOULAY, *Biochim. Biophys. Acta*, 77 (1963) 545.
- 3 J. N. BAPTIST, R. K. GOLSON ET M. J. COON, *Biochim. Biophys. Acta*, 69 (1963) 40.
- 4 A. C. VAN DER LINDEN ET R. HUYBREGTSE, *Antonie van Leeuwenhoek*, 35 (1969) 344.
- 5 B. ROCHE ET E. AZOULAY, *European J. Biochem.*, 8 (1969) 426.
- 6 J. M. LEBEAULT, B. ROCHE, Z. DUVNJAK ET E. AZOULAY, *Arch. Mikrobiol.*, 72 (1970) 140.
- 7 Z. DUVNJAK, B. ROCHE ET E. AZOULAY, *Arch. Mikrobiol.*, 72 (1970) 135.
- 8 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 9 M. P. MITCHELL ET C. HUBSCHER, *European J. Biochem.*, 7 (1968) 90.
- 10 J. M. LEBEAULT, B. ROCHE, Z. DUVNJAK ET E. AZOULAY, *J. Bacteriol.*, 100 (1969) 1218.
- 11 Z. DUVNJAK, J. M. LEBEAULT, B. ROCHE ET E. AZOULAY, *Biochim. Biophys. Acta*, 202 (1970) 447.
- 12 R. G. MARTIN ET B. N. AMES, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1372.
- 13 E. AZOULAY ET J. PUIG, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 33 (1968) 1019.

Biochim. Biophys. Acta, 220 (1970) 373-385