

LOCALISATION DE L'ALCOOL DESHYDROGENASE MITOCHONDRIALE DE *CANDIDA TROPICALIS*

Michel GALLO, Bernadette ROCHE-PENVERNE et Edgard AZOULAY

*Laboratoire de Structure et Fonction des Biomembranes,
ER 143 – CNRS – U.E.R. de Luminy, 70, Route Léon Lachamp
13288, Marseille, Cedex 2, France*

Received, 2 July 1974

Hydrocarbons induce an alcohol dehydrogenase of mitochondrial origin, which has been specifically localized on the external membrane of *Candida tropicalis* mitochondria.

Classical techniques were used to separate and identify these external membranes from purified mitochondria. These external membranes contain antimycin A-insensitive NADH and NADPH cytochrome *c* reductases but no L-kynurenine hydroxylase activity.

The presence of alcohol dehydrogenase on the external membrane explains why the oxidation of higher alcohols is not coupled to oxidative phosphorylation.

1. Introduction

Les hydrocarbures induisent chez *Candida tropicalis* une voie métabolique localisée spécifiquement dans les mitochondries [1–2] comprenant une ou plusieurs enzymes qui catalysent la transformation des alcools supérieurs en acides gras correspondants. De plus, nous avons montré [3] que ces enzymes couplent la déshydrogénération des alcools à l'oxygène sans passer par la voie phosphorylante de la mitochondrie.

La séparation et la purification des membranes externes et internes des mitochondries constitue un préalable indispensable à l'étude de la compartimentation des enzymes mitochondriales. Cette question a fait l'objet de nombreux travaux portant sur la mise au point de diverses techniques de séparation [4–18]. Pour différencier les membranes internes des membranes externes isolées à partir de mitochondries purifiées sur gradient de sucrose, on fait appel non seulement à des marqueurs enzymatiques mais également à la densité de flottaison. Il nous a donc paru important, à partir de mitochondries purifiées de *C. tropicalis* cultivé sur alcanes, de localiser l'enzyme mitochondriale responsable de la déshydrogénération des alcools supérieurs.

2. Méthodes et résultats

2.1. Organisme

Souche 101 de *C. tropicalis* cultivé sur tétradécane et recueilli en phase exponentielle de croissance [19].

2.2. Isolement des mitochondries

Technique décrite ailleurs en détail et spécialement adaptée aux levures cultivées sur alcanes [20].

2.3. Fractionnement des membranes mitochondriales

Après l'obtention des mitochondries par lyse des protoplastes, le fractionnement est inspiré de la méthode décrite par Bandlow [5]. Les mitochondries, (7 mg/ml) en suspension dans du saccharose à 20% de concentration, sont purifiées sur un gradient discontinu de saccharose comportant 5 couches de 18; 27,5; 39; 51 et 61% lesquelles ont été tamponnées à pH 7,2 avec du Tris-sulfate (20 mM); 1'EDTA (1 mM) et le BSA (1 mg/ml) ont été ajoutés pour protéger les membranes (fig. 1A).

La centrifugation a lieu à 25 000 RPM pendant 120 min dans un Rotor SW 27 (centrifugeuse L₃-50 Beckman). Les mitochondries purifiées se rassemblent dans la bande 39%. Cette fraction est récupérée sous un

A

B

C

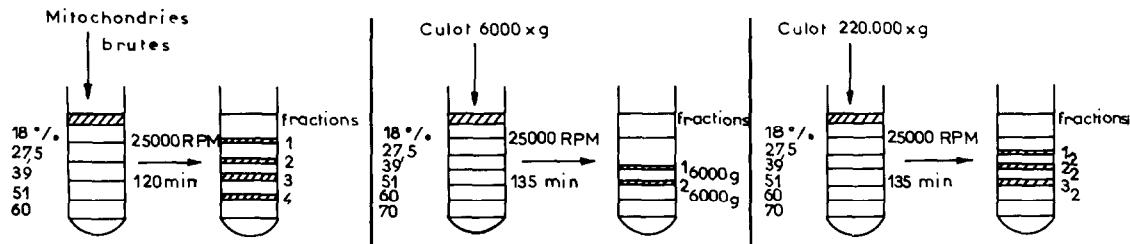


Fig. 1. Schéma de purification des mitochondries de *C. tropicalis* et des membranes internes et externes. A: Les mitochondries (15 mg) sont déposées au sommet d'un gradient comprenant 5 couches de 5 ml de saccharose. La centrifugation a lieu à 25 000 rpm pendant 120 min, les fractions 1, 2, 3 et 4 sont récupérées à partir du sommet du tube. Les fractions 3 et 4 correspondant respectivement à 39 et 51% de saccharose renferment les mitochondries purifiées; B: Le culot récupéré à 6000 g (cf. Méthodes et Résultats) est déposé au sommet d'un gradient comprenant 6 couches de 4,2 ml de saccharose. La centrifugation a lieu à 25 000 rpm pendant 135 min. Les fractions 1_{6000 g} et 2_{6000 g} récupérées respectivement à 39 et 51% de saccharose contiennent les mitochondries abîmées et les membranes internes; C: Le culot 220 000 g isolé du surnageant résultant de la centrifugation à 6000 g. (cf. Méthodes et résultats) est traité de la même manière que le culot 6000 g (1B). Les fractions 1₂, 2₂ et 3₂ récupérées respectivement à 27,5, 39 et 51% de saccharose contiennent les membranes externes, les mitochondries abîmées et les membranes internes.

volume minimum et mise à incuber à 0° C pendant 5 min dans un milieu isotonique, pour permettre le 'gonflement' des mitochondries, contenant 0,14 M de saccharose, 5 mM de KC1, 20 mM de Tris-sulfate pH 7,2 et 10 µg de valinomycine. Après cette incubation trois volumes d'un milieu contenant 1,8 M de sucrose, 4 mM d'ATP, 4 mM de SO₄Mg, 0,1% de BSA et 20 mM de Tris-sulfate pH 7,2, sont ajoutés afin de favoriser la contraction des mitochondries. Une homogénéisation, dans des conditions relativement douces, à l'aide d'un Potter muni d'un piston en Téflon, pendant 5 min à 0° C, facilite le détachement de la membrane externe de la mitochondrie. Le mélange est ensuite dilué à la concentration finale de 36% en saccharose (~ 1 M) en utilisant une solution de Tris-sulfate 20 mM pH 7,2, puis soumis à une centrifugation différentielle.

Une première centrifugation à basse vitesse (7 100 rpm = 6000 g) permet de récupérer un premier culot qui contient en plus des mitochondries intactes, des mitochondries partiellement endommagées. (fig. 1B).

Une centrifugation à haute vitesse (49 000 rpm = 220 000 g) du surnageant récupéré, permet de con-

centrer sous forme de culot, les membranes internes et externes des mitochondries. (fig. 1C).

Ce culot, repris avec une solution tamponnée de saccharose et homogénéisé, est déposé au sommet d'un gradient discontinu de sucrose comportant 6 couches de 18, 275, 39, 51, 60 et 70% puist est centrifugé à 25 000 rpm pendant 135 min. Le culot 6000 g subit également le fractionnement sur gradient de saccharose.

Les mitochondries brutes obtenues à partir de protoplastes lysés, sont dans un premier temps purifiées sur gradient de saccharose (fig. 1A). Les mitochondries pures sont récupérées dans la fraction 3 et soumises au traitement permettant la séparation des membranes internes et externes.

Dans la fig. 1B et C, nous avons schématisé le fractionnement sur gradient discontinu de saccharose des culots 6000 g et 220 000 g. Après centrifugation, on recueille deux fractions F₁ × 6000 g et F₂ × 6000 g provenant du culot 6000 g, qui sont respectivement sédimentées à 39 et 51%. Les fractions F_{1,2}, F_{2,2}, F_{3,2} isolées respectivement à 27,5, 39 et 51% de saccharose sont issues de la fraction 220 000 g.

2.4. Mesure des activités enzymatiques

La mesure des activités cytochrome *c* oxydase (EC 1.9.3.1) NADH et NADPH cytochrome *c* réductase (EC 1.6.2.1 et EC 1.6.2.3) insensibles à l'antimycine et celle de l'alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1) ont déjà été décrites [20]. La L-cynurenine hydroxylase (EC 1.14.1.2) a été mesurée selon Bandlöw [5].

2.5. Répartition des marqueurs enzymatiques

Dans le tableau 1, nous avons rassemblé les valeurs des activités cytochrome *c* oxydase, NADH cytochrome *c* réductase, NADPH cytochrome *c* réductase mesurées en présence et en absence d'antimycine A, L-cynurenine hydroxylase et alcool-déshydrogénase. Cette dernière activité a été mesurée à l'égard du décanol. Les quatre premières enzymes servent de marqueur pour déterminer l'origine de la membrane purifiée sur gradient. L'intégrité des mitochondries a été vérifiée en mesurant la cytochrome *c* oxydase en milieu hypo- (tampon mannitol 0,045 M) et hyperosmotique (tampon mannitol 0,45 M).

L'examen de ce tableau montre que:

- Les mitochondries brutes, et celles de la fraction 3 purifiées sur gradient de sucrose, n'ont pas d'activité cytochrome *c* oxydase, sauf lorsque la mesure est effectuée en tampon hypotonique (Tris 0,05 M) ce qui signifie que les mitochondries ainsi préparées sont intactes.
- Ces mitochondries purifiées possèdent une activité NADH et NADPH cytochrome *c* réductase sensibles à l'antimycine A et une activité alcool déshydrogénase.
- Ces mitochondries intactes ont une densité de flottaison de 1,18 (39% sucrose, fraction 3).
- Ces mitochondries et plus précisément la fraction 1₂ qui contiendraient les membranes externes n'ont pas d'activité L-cynurenine hydroxylase, considérée comme un marqueur de la membrane externe des mitochondries de mammifères.
- L'alcool déshydrogénase se retrouve presque intégralement dans la fraction 1₂ purifiée qui est sédimenée dans la zone 27% de saccharose (Dté 1,12) et qui ne contient pas d'activité cytochrome *c* oxydase. En revanche, cette fraction présente les activités NADH et NADPH cytochrome *c* réductase toutes deux insensibles à l'antimycine A.
- La fraction 2_{6000 g} (fig. 1B) et la fraction 3₂ (fig. 1C), qui ne franchissent pas la zone de concentration de 60% en saccharose et sont donc dans la zone

51% (Dté 1,23), contiennent les membranes internes des mitochondries. En effet, le rapport de l'activité cytochrome *c* oxydase mesurée en tampon mannitol sur celle mesurée en tampon Tris est voisin de l'unité, (tableau 1) démontrant ainsi que l'on a bien isolé des membranes internes.

3. Discussion

Après avoir purifié sur gradient de saccharose, les mitochondries de *C. tropicalis*, nous avons appliqué la méthode décrite par Bandlöw [5] dans le but de séparer les membranes internes et externes des mitochondries. Dans ces conditions opératoires spécialement mises au point pour des mitochondries de levure, les membranes ne sont pas endommagées, contrairement à ce qui se passe dans les traitements où l'on combine le gonflement des mitochondries dans un milieu hypotonique (20 mM) avec l'action des détergents ou celle des ultrasons. Il est important de souligner qu'à la suite d'aussi longues manipulations le rendement en membranes externes isolées est très faible et il ne nous a pas été possible d'entreprendre, avec ces membranes, des études morphologiques et spectroscopiques.

Cependant, les observations qui viennent d'être rapportées montrent que l'alcool déshydrogénase mitochondriale induite par les hydrocarbures qui se retrouve presque intégralement associée aux activités NADH et NADPH cytochrome *c* réductase insensibles à l'antimycine peut être considérée comme spécifiquement localisée dans la membrane externe des mitochondries. De ce fait cette enzyme peut servir de marqueur de la membrane externe de ces mitochondries et cette caractéristique peut être étendue aux levures qui se développent sur alcanes.

La fraction 1₂ contenant les membranes externes est dépourvue d'activité L-cynurenine hydroxylase. De plus, nous avons volontairement écarté la mono-amine oxydase, qui selon plusieurs auteurs [5,6] est absente dans les mitochondries de levure. Le fait que les hydrocarbures induisent, au niveau de la membranes externe une alcool déshydrogénase permet de comprendre pourquoi l'oxydation mitochondriale des alcools supérieurs n'est pas couplée à l'oxydation phosphorylante chez cette levure.

Tableau 1
Répartition des marqueurs enzymatiques dans les membranes internes et externes et dans les mitochondries de *C. tropicalis*

| | NADH cyt. c réductase* | | | | NADPH cyt. c réductase* | | | | L-Cynurenine hydroxylase* | | | | Cytochrome c oxydase* | | | |
|--|------------------------|------|----------------|-------------------|-------------------------|------|----------------|--------------|---------------------------|------|----------------|-----------------------|-----------------------|------|------|---|
| | Sans Ant. A | | Avec Ant. A | | Sans Ant. A | | Avec Ant. A | | Sans Ant. A | | Inhibi- tion % | | 1** | | 2*** | |
| | Sans | Avec | Inhibi- tion % | déshydro- génase* | Sans | Avec | Inhibi- tion % | hydroxylase* | Sans | Avec | Inhibi- tion % | Cytochrome c oxydase* | 1** | 2*** | 2/1 | |
| Mitochondries brutes | 517 | 210 | 60 | 1445 | 680 | — | — | — | 0 | 0 | 0 | 486 | 8 | | | |
| Mitochondries purifiées sur gradient de saccharose | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fraction 1 (18%) | 65 | 65 | 0 | 337 | 162 | 0 | — | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | — |
| Fraction 2 (27,5%) | 122 | 123 | 0 | 845 | 1430 | 0 | — | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | — |
| Fraction 3 (39%) | 96 | 32 | 70 | 1830 | 518 | 170 | 66,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 162 | 8 | | | |
| Fraction 4 (51%) | 486 | 97 | 80 | 1110 | 152 | 42 | 72 | 0 | 62 | 157 | 2,5 | | | | | |
| Fraction 1 _{6000 g} (39%) | 113 | 40,5 | 65 | 605 | — | — | — | — | 49 | 196 | 4 | | | | | |
| Fraction 2 _{6000 g} (51%) | 146 | 32 | 78 | 290 | — | — | — | — | 132 | 148 | 1,1 | | | | | |
| Fraction 1 ₂ (27,5%) | 290 | 292 | 0 | 9640 | 1296 | 1140 | 12,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| Fraction 2 ₂ (39%) | 194 | 65 | 66,5 | 1685 | 243 | 81 | 66 | — | 32 | 454 | 14 | | | | | |
| Fraction 3 ₂ (51%) | 227 | 48,5 | 79 | 964 | 24,3 | 4,8 | 80 | — | 243 | 292 | 1,2 | | | | | |

* Les activités sont exprimées en nmoles · mg⁻¹ protéines.

** Mesurée en tampon mannitol 0,45 M pH 7,5.

*** Mesurée en tampon Tris 0,05 M pH 7,5.

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'une aide financière de la Société Française des Pétroles BP et de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (AC membranes contrat N° 7173045).

Bibliographie

- [1] Lebeault, J. M., Roche, B., Duvnjak, Z. and Azoulay, E. (1970) *Arch. Mikrobiol.*, 72, 140–153.
- [2] Gallo, M., Bertrand, J. C., Roche, B. et Azoulay, E. (1973) *Biochim. Biophys. Acta.*, 296, 624–638.
- [3] Gallo, M. and Azoulay, E. (soumis à *Biochimie*).
- [4] Ernster, L. and Kuylenstierna, B. (1970) *Amer. Chem. Soc.*, 165, 172–212.
- [5] Bandlow, W. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 282, 105–122.
- [6] Accoceberry, B. and Stahl, A. (1972) *Compt. Rendu*, 274, Série D, 3135–3138.
- [7] Cassady, W. E. and Wagner, R. P., (1971) *J. Cell. Biol.*, 49, 536–541.
- [8] Meunier, D., Pianeta, C. and Coulomb, P. (1971) *Compt. Rendu*, 272 série D, 1376–1379.
- [9] Moreau, F. and Lance, C. (1972) *Biochimie* 54, 1335–1348.
- [10] Bachmann, E., Allman, D. W. and Green, D. E. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 115, 153–164.
- [11] Tipton, K. F. (1967) *Biochim. Biophys. Acta.*, 135, 910–920.
- [12] Schnaitman, C., Erwin, V. G. and Greenawalt, J. W. (1967) *J. Cell. Biol.*, 32, 719–735.
- [13] Watanabe, H. (1971) *J. Biochem.*, 69, 275–281.
- [14] Parsons, D. F., Williams, G. R., Thompson, W., Wilson, D. and Chance, B. in: *Mitochondrial structure and compartmentation* (Quagliariello, E. Papa, S. Slater, E. C. and Tager, J. M., eds.), pp. 29–73, Adriatica Editrice, Bari.
- [15] Sottocasa, G. L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. and Bergstrand, A. (1967) *J. Cell. Biol.*, 32, 415–438.
- [16] Heidrich, H. G., Stahn, R. and Hanning, K. (1970) *J. Cell. Biol.*, 46, 137–150.
- [17] Colbeau, A., Nachbaur, J. and Vignais, P. M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 249, 462–492.
- [18] Neupert, W. and Ludwig, G. D. (1971) *Eur. J. Biochem.*, 19, 523–532.
- [19] Duvnjak, Z., Roche, B. and Azoulay, E. (1970) *Arch. Mikrobiol.*, 72, 135–139.
- [20] Gallo, M., Roche, B., Aubert, L. and Azoulay, E. (1973) *Biochimie*, 55, 195–203.
- [21] Lebeault, J. M., Meyer, F., Roche, B. and Azoulay, E. (1970) *Biochim. Biophys. Acta.*, 220, 386–395.