

PARTICIPATION DU CYTOCHROME P_{450} DANS L'OXYDATION DES ALCANES CHEZ *CANDIDA TROPICALIS*

M. GALLO, J.C. BERTRAND et E. AZOULAY

Laboratoire de Chimie Bactérienne, C.N.R.S.

et

*Laboratoire de Microbiologie écologique, Faculté des Sciences,
31, chemin Joseph-Aiguier, Marseille, France*

Received 11 September 1971

Candida tropicalis strain 101 possesses a hydroxylase system when grown on tetradecane as the carbon source which is active towards hydrocarbons and fatty acids. This system including cytochrome P_{450} and NADPH-cytochrome *c* reductase has been localized exclusively in the microsomal fraction.

1. Introduction

Les levures du genre *Candida* (*C. tropicalis* souche 101) [1] métabolisent les alcanes successivement en alcool, aldéhyde et acide gras correspondant selon 2 voies distinctes, l'une de nature mitochondriale [2] et l'autre de nature soluble [3]. Nous avons par ailleurs montré que les extraits particuliers préparés à partir de cette souche catalysent en présence de NAD et d'ATP l'oxydation du décane en decanol dans des systèmes totalement dépourvus d'oxygène [4]. Cependant, réalisée dans de telles conditions, la réaction conduit à une quantité de coenzyme réduit 100 fois plus importante que la quantité d'alcool accumulé; de plus il a été constaté [5] que les extraits provenant de ces mêmes cellules possèdent une activité hydroxylase spécifique des acides gras où interviennent à la fois un cytochrome P_{450} , une NADPH-cytochrome *c* réductase et l'oxygène. Dans ce mémoire nous nous proposons de préciser la nature du système responsable de l'oxydation des alcanes chez *C. tropicalis*, sa localisation sub-cellulaire et sa régulation.

2. Méthodes et résultats

2.1. Préparation des extraits

Les caractères de la souche 101 de *C. tropicalis* utilisée ainsi que les conditions de culture sur hydrocarbures ont déjà été décrits [1]. La préparation des extraits a été réalisée à partir de cellules cultivées en aérobiose, lavées et remises en suspension dans une solution de Mannitol (0,22 M), EDTA (0,5 mM), Albumine de boeuf Sigma (0,05%), pH 7,6, dans les conditions suivantes: la suspension microbienne refroidie à 0°, soumise à l'action des ultra-sons pendant 20 sec, est ensuite traitée dans une cellule de pression (French pressure cell). Après traitement le mélange est centrifugé à 4000 trs/min pendant 15 min, le surnageant récupéré et centrifugé à 49 000 trs/min pendant 90 min (Rotor T150 Spinco L4), donne un culot qui, repris dans du tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 constitue l'extrait particulier contenant par ml 10 mg de protéines dosées selon la méthode de Lowry et al. [6].

2.2. Mesure des activités enzymatiques

Les activités alcool et aldéhyde déshydrogénase (alcool: NAD⁺ oxydo réductase EC 1.1.1.1) (aldéhyde: NAD⁺ oxydo réductase EC 1.2.1.3) ont été déterminées selon Lebeault et coll. [2, 3].

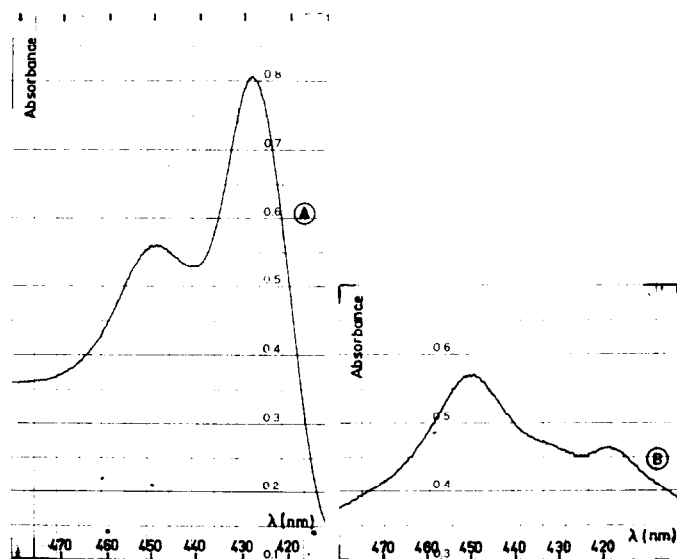


Fig. 1. Spectre différentiel oxydé-réduit après traitement au CO de l'échantillon réduit. A: extrait particulaire (10 mg protéines). B: Fraction II (21% saccharose, 4 mg protéines).

Tableau I
Fractionnement sur gradient de saccharose des extraits particulaires de *C. tropicalis*.

Extrait-fraction	Protéines mg/ml	Activités enzymatiques (unités)					
		Cyt. P_{450} nmoles/mg prot.	NADPH cyt. <i>c</i> red. *	NADH cyt. <i>c</i> red. *	Cyt. <i>c</i> oxydase*	Alcool- déshydro- génase*	Aldéhyde déshydro- génase*
Particulaire brut	9,6	0,05	156 à 195	13,5	106	350	300
Surnageant brut	5,1	0	80	0	0	1730	87
Fraction 0	0,31	0	65	0	0	8000	15
Fraction I (15% sacch.)	1,2	0,15	470	0	0	840	13
Fraction II (21% sacch.)	3	0,25	172	12	8,2	40	0
Fraction III (38% sacch.)	2,25	0	6,2	6,2	0	610	0
Fraction IV (43% sacch.)	1,6	0	24,3	5,2	0	720	42
Fraction V (culot)	2,35	0	25	140	82,5	2600	80

* Les activités sont exprimées en nmoles de coenzyme (alcool- et de aldéhyde-déshydrogénases) ou de cytochrome *c* réduit ou réoxydé par min et mg de protéines.

Tableau 2
Hydroxylation du décane et des acides décanoïques et laurique.

Substrat	Conditions	Activité spécifique**	
		Unités	Activité maximum
Décane	complet (NADPH, aérobie)*	2,4	100
	NADH remplace NADPH, aérobie	2,3	100
	NAD remplace NADPH, aérobie	2,3	100
	NADPH, anaérobie	0,2	8,5
	NAD remplace NADPH, anaérobie	2,3	100
	NADH remplace NADPH, anaérobie	0,3	12,5
	sans coenzyme, aérobie	0,2	8,5
	sans coenzyme, anaérobie	0,2	8,5
	complet + NAD aérobie	2,3	100
	complet, sous atmosphère CO	0,2	8,5
	complet + NAD sous atm. CO	1,5	62
	complet + NAD sans CO	3,1	130
Acide décanoïque	complet (NADPH, aérobie)	2,9	120
	complet (NADPH, anaérobie)	0,2	8,5
Acide laurique	complet (NADPH, aérobie)	3,5	145
	complet (NADPH, anaérobie)	0,3	12,5

* Le système complet de 3 ml comprend, l'extrait particulaire, ^{14}C -décane (5×10^5 DPM), décane froid (10 μmoles), NADPH ($1,5 \times 10^{-3}$ M) tampon Tris 0,05 M pH 8,5 complété à 3 ml. Dans les autres systèmes le coenzyme est remplacé par d'autres pyridines nucléotides à la même concentration, le ^{14}C -décanoate et ^{14}C -dodécanoate (5×10^5 DPM), acide froid (10 μmoles). Après une incubation de 30 min à 32°, les produits radioactifs oxygénés sont isolés dans les conditions décrites [7].

** L'activité est exprimée en nmoles de produits oxygénés formés par min et par mg de protéines, les chiffres donnés correspondant à une moyenne de 6 expériences.

L'activité hydroxylase est mesurée par analyse quantitative des produits de la réaction, formés à partir du ^{14}C -décane, du ^{14}C -décanoate et du ^{14}C -dodécanoate dans des systèmes réactionnels décrits par Gholson et coll. [7].

Les activités NADPH- et NADH-cytochrome *c* réductases (NADPH: ferricytochrome *c* oxydo réductase EC 1.6.2.3; NADH: ferricytochrome *c* oxydo réductase EC 1.6.2.1) ont été mesurées à partir de la réduction du cytochrome *c* de coeur de boeuf (Sigma Type IV) à 550 nm, dans des systèmes réactionnels de 3 ml contenant NADPH ou NADH (1 mM), cytochrome *c* (0,1 mM) tampon Tris ou phosphates 0,05 M pH 8,4.

L'activité cytochrome *c* oxydase (ferricytochrome *c* oxydo réductase EC 1.9.3.1) est étudiée à 550 nm avec un système de 3 ml contenant du tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8,4, du cytochrome *c* (0,1 mM) préalablement réduit par l'hydrosulfite et dialysé contre

de l'eau pour éliminer l'agent réducteur. Ces activités sont exprimées en nmoles de cytochrome *c* réduit ou réoxydé par min et par mg de protéines.

2.3. Localisation du cytochrome P_{450}

La présence du cytochrome P_{450} caractérisée par une seule bande d'absorption maximale à 450 nm exaltée sous forme de complexe CO- P_{450} a été confirmée dans les extraits particuliers bruts (fig. 1, courbe A) dans une concentration moyenne de 0,05 nmoles/mg de protéines, calculée par référence aux données de Omura et Sato [8]. Les surnageants, par contre, en sont totalement dépourvus (tableau 1).

Cette préparation particulière (3 ml) est soumise à une ultracentrifugation à 15 000 trs/min pendant 15 hr (rotor SW25) sur un gradient de concentration discontinue en saccharose comprenant 5 couches successives de solution de saccharose de densité comprise entre 1,062 et 1,195 mesurée à 0°, soit en con-

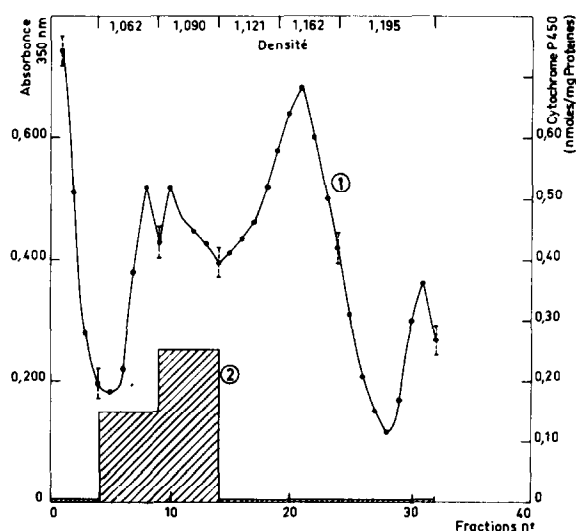


Fig. 2. Profil de sédimentation sur gradient de concentration discontinue de 15 à 43% en saccharose d'un extrait brut particulière de *C. tropicalis* cultivée sur n-tétradécane. La concentration en particules a été déterminée sur les fractions recueillies (courbe 1) et en cytochrome P_{450} (courbe 2) dans les conditions indiquées dans le texte.

centration de saccharose de 15 à 43%. En fin d'expérience des fractions de 10 gouttes (0,9 ml) sont collectées, additionnées de 0,5 ml de tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,6, et la concentration en particules déterminée en mesurant l'absorbance à 350 nm pour chacune des fractions (fig. 2, courbe 1).

Les fractions correspondant aux différents pics d'absorption de ce profil de sédimentation ont été mélangées pour donner 5 nouvelles fractions dans lesquelles ont été dosées les activités enzymatiques, la concentration en protéines et en cytochrome P_{450} . Dans ce dernier cas, la mise en évidence et le dosage de ce cytochrome ont été réalisés suivant la technique décrite par Lu [9] que nous avons modifiée dans les conditions suivantes: ces fractions sont soumises à une centrifugation à 220 000 g pendant 90 min, les culots sont repris par une solution de glycérol à 30% dans du tampon Tris 0,05 M pH 7,6 refroidis à 4°, homogénéisés dans un Potter et soumis à l'action des ultra-sons sous 9 Kc pendant 20 sec.

La totalité du cytochrome P_{450} présent dans les extraits particuliers initiaux se retrouve intégralement dans des fractions qui sédimentent dans une

zone de densité comprise entre 1,062 et 1,090 (fig. 2, courbe 2). L'analyse spectrale de ces fractions confirme la présence de ce cytochrome dans des concentrations de l'ordre de 0,15 à 0,25 nmol/mg de protéines (fig. 1, courbe B).

2.4. Répartition des activités enzymatiques

Dans le tableau 1 nous avons consigné les teneurs en chacune des activités enzymatiques testées dans les 5 fractions étudiées. Nous constatons que le cytochrome P_{450} se retrouve dans des fractions totalement dépourvues d'enzymes considérées comme d'origine mitochondriale telles que la cytochrome *c* oxydase ou la NADH cytochrome *c* réductase.

Par contre ces mêmes fractions sont très riches en activité NADPH-cytochrome *c* réductase. Il est important de souligner que les activités alcool et aldéhyde déshydrogénases que nous avons précédemment localisées dans les membranes mitochondriales [2] se retrouvent associées à la cytochrome *c* oxydase. Il faut cependant souligner que l'on trouve, associé au cytochrome P_{450} et à la NADPH cytochrome *c* réductase, une activité alcool déshydrogénase non négligeable.

2.5. Hydroxylation des hydrocarbures et des acides gras

Les différentes préparations particulières précédemment testées ont été utilisées pour mesurer l'activité hydroxylase à l'égard du ^{14}C -décane, et des acides ^{14}C -décanoïque et ^{14}C -dodécanoïque. Nous avons constaté que seules les fractions riches en cytochrome P_{450} ont une activité hydroxylase.

Les valeurs moyennes et les conditions expérimentales pour lesquelles cette hydroxylation se manifeste avec les extraits particuliers sont consignées dans le tableau 2.

2.6. Régulation

Les cellules de *C. tropicalis* cultivées sur glucose donnent des extraits dépourvus de cytochrome P_{450} , mais ayant une faible activité hydroxylase qui représente 4 à 6% de l'activité déterminée dans les mêmes conditions avec des cellules parfaitement induites en présence d'hydrocarbures. La teneur en NADPH-cytochrome *c* réductase est aussi inférieure de 5 à 6 fois. Les cultures sur tétradécanoate donnent les mêmes niveaux en activité enzymatique et en cytochrome

P_{450} que les cellules cultivées sur glucose. Il convient de souligner que le glucose introduit en cours de culture sur hydrocarbures exerce son effet de répression catabolique. A l'inverse, l'introduction de tétradécanoate dans une culture sur hydrocarbures ne réprime ni l'hydroxylase ni la synthèse du cytochrome P_{450} .

3. Discussion et résumé

Les cellules de *C. tropicalis* cultivées sur tétradécane donnent des extraits particuliers qui hydroxylent le décane, le décanoate et le dodécanoate avec des activités spécifiques de l'ordre de 2,4 à 3,5 unités où le NAD peut remplacer avec la même efficacité le NADPH.

Le système expérimental normal de détermination de cette activité enzymatique tel qu'il a été défini par Gholson et Coon [7] est inhibé à plus de 90% en anaérobiose ou sous atmosphère de CO. Nous avons cependant constaté que l'addition de NAD à ce système conduit à la formation de produits oxygénés même sous atmosphère de CO équivalente à 60% de celle obtenue dans les conditions normales.

L'ultracentrifugation sur gradient discontinue de saccharose de ces extraits particuliers actifs permet de séparer dans une fraction unique légère la NADPH-cytochrome *c* réductase et le cytochrome

P_{450} , composantes du système hydroxylase. Nous pouvons donc considérer que ce système spécifiquement induit par les alcanes est directement impliqué dans leur métabolisme et qu'il est de nature microsomale. On peut même penser du fait de la présence d'activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénase associées à cette fraction subcellulaire qu'il existe chez cette levure une voie métabolique de nature microsomale responsable de la transformation de l'alcane en acide gras correspondant.

Références

- [1] Z. Duvnjak, B. Roche et E. Azoulay, Arch. Mikrobiol. 72 (1970) 135.
- [2] J.M. Lebeault, B. Roche, Z. Duvnjak et E. Azoulay, Biochim. Biophys. Acta 220 (1970) 373.
- [3] J.M. Lebeault, F. Meyer, B. Roche et E. Azoulay, Biochim. Biophys. Acta 220 (1970) 386.
- [4] J.M. Lebeault, B. Roche, Z. Duvnjak et E. Azoulay, Arch. Mikrobiol. 72 (1970) 140.
- [5] J.M. Lebeault, E.T. Lode, M.J. Coon, Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 (1971) 413.
- [6] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr et R.J. Randall, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265.
- [7] R.K. Gholson, J.N. Baptist et M.J. Coon, J. Biochem. 2 (1963) 1155.
- [8] T. Omura et R. Sato, J. Biol. Chem. 237 (1962) 1375.
- [9] A.Y.H. Lu et M.J. Coon, J. Biol. Chem. 243 (1968) 1331.