

ÉTUDES SUR LE
MÉCANISME DE LA FERMENTATION ACÉTONO-BUTYLIQUE

IV. RÉDUCTION DE L'ACÉTYLACÉTATE EN BUTYRATE
PAR L'HYDROGÈNE MOLÉCULAIRE

par

GEORGES N. COHEN ET GERMAINE COHEN-BAZIRE

*Laboratoire de Chimie bactérienne, Institut Pasteur,
Garches (France)*

La scission de l'acétylacétate en deux restes en C₂ a été découverte par LEHNINGER¹ avec des suspensions d'*Escherichia coli*. La réaction observée est une scission hydrolytique de l'acétylacétate en deux molécules d'acétate:



STADTMAN ET BARKER^{2,3}, avec des extraits de *Clostridium kluyveri* et COHEN ET COHEN-BAZIRE^{4,5,6} avec des suspensions de bactéries butyriques ont observé une réaction semblable. Nous avons trouvé une scission hydrolytique, alors que STADTMAN ET BARKER observent une scission phosphoroclastique de l'acétylacétate en acétyl phosphate et acétate. Cette différence doit être attribuée à la présence d'acétylphosphatase dans nos suspensions. NISMAN⁷, utilisant des extraits des mêmes bactéries, obtenus par ultrasonation des suspensions, trouve que des quantités importantes d'acétylphosphate sont formées à partir de pyruvate, alors que les cellules entières ne laissent pas apparaître cet intermédiaire.

La réaction inverse, c'est à dire la synthèse d'acétylacétate à partir d'acétylphosphate et d'acétate, a été postulée par LIPMANN^{8,9} dans la synthèse de butyrate à partir de pyruvate. STADTMAN ET BARKER³, essayant de réaliser cette réaction à l'aide de leurs extraits, trouvent de petites quantités, cependant significatives, d'un acide β -cétonique. Cet acide s'accumule en plus grande quantité en présence de cyanure. Leurs extraits, incubés avec de l'acétate, de l'acétylphosphate et de l'hydrogène, synthétisent du butyrate¹⁰; par contre, l'acétylacétate, incubé avec de l'hydrogène dans les mêmes conditions donne naissance molécule pour molécule à du β -hydroxybutyrate qui ne subit aucune transformation ultérieure. Dans ces conditions, on n'obtient que des traces de butyrate. Ces résultats conduisent STADTMAN ET BARKER à la conclusion que l'acétylacétate n'est pas un précurseur du butyrate. Ce point de vue est renforcé par des expériences de ces auteurs effectuées avec des composés marqués avec du ¹⁴C.

D'autre part, nous avons montré⁶ que des suspensions de bactéries butyriques peuvent utiliser le lactate et le pyruvate comme donneurs d'hydrogène pour la transformation acétylacétate \longrightarrow butyrate. En particulier, les suspensions "déficientes"¹¹

qui ne forment que de l'acétate si on les incube avec du pyruvate ou de l'acétylacétate, produisent du butyrate par incubation simultanée avec ces deux substrats.

A la suite des résultats de STADTMAN ET BARKER, il nous a paru intéressant d'étudier la réduction de l'acétylacétate par l'hydrogène moléculaire avec nos microorganismes. Il était également indiqué de comparer la fermentation du β -hydroxybutyrate en atmosphère d'hydrogène avec celle obtenue dans le vide.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les organismes que nous avons utilisés sont: *Clostridium saccharobutyricum*, souche GR₄ et *Clostridium acetobutylicum*, souche PC₄₈.

Le mode d'obtention des suspensions bactériennes et le dosage des acides volatils ont été décrits précédemment¹¹ de même que la préparation et le dosage de l'acétylacétate et du β -hydroxybutyrate⁶.

A. Non-fermentescibilité du β -hydroxybutyrate en atmosphère d'hydrogène

Nos résultats sont consignés dans le Tableau I.

On trouvera dans le Tableau II un rappel des résultats obtenus à partir de suspensions identiques agissant sur le même substrat, mais dans le vide.

TABLEAU I

NON-FERMENTESCIBILITÉ DU β -HYDROXYBUTYRATE EN ATMOSPHÈRE D'HYDROGÈNE

Les suspensions sont préparées comme indiqué précédemment¹¹. Chaque cupule de Warburg contient dans sa partie principale du tampon phosphates *M/45*, le substrat et l'eau jusqu'au volume adéquat; 0.5 ml de suspension bactérienne dans la partie latérale; 0.2 ml de KOH à 20% dans le puits central. Volume total: 3.2 ml. La suspension et le substrat sont mélangés après un temps d'équilibration de 15 minutes. Température: 37° C. pH 7. Phase gazeuse: hydrogène. Les chiffres ont été corrigés en défaillant l'absorption d'hydrogène par la suspension sans substrat. Les résultats sont exprimés en micromoles.

Souche	Hydrogène consommé	β -hydroxybutyrate	
		initial	final
<i>Cl. saccharobutyricum</i>	0	13.7	13.5
<i>Cl. saccharobutyricum</i>	0	13.7	13.4
<i>Cl. acetobutylicum</i>	0	13.7	13.6

TABLEAU II

FERMENTESCIBILITÉ DU β -HYDROXYBUTYRATE DANS LE VIDE

Le nombre de milligrammes d'azote bactérien par tube figure sous le nom de la souche utilisée. Tampon phosphates *M/30* à pH 7. Volume total: 20 ml. Durée de l'incubation: 20 heures. Résultats exprimés en micromoles.

Souche	β -hydroxybutyrate			Acétone	Acidité volatile totale	Butyrate	Acétate
	initial	final	consommé				
<i>Cl. acetobutylicum</i> (4.2 mg)	3200	2000	1200	37	1560	900	660
<i>Cl. saccharobutyricum</i> (7 mg)	3200	1675	1525	12	2132	948	1184

Ces résultats montrent que, contrairement à ce qui se passe dans le vide, le β -hydroxybutyrate n'est pas métabolisé en atmosphère d'hydrogène. Cette dernière observation est en accord avec les faits observés par STADTMAN ET BARKER.

B. Réduction de l'acétylacétate par l'hydrogène moléculaire

La Fig. 1 montre que l'acétylacétate est réduit par les suspensions de bactéries butyriques en présence d'hydrogène moléculaire. La recherche des produits de la réaction montre que 25 à 30% de l'acétylacétate disparu sont réduits en β -hydroxybutyrate. Ceci est en accord avec les résultats de STADTMAN ET BARKER, à ceci près que dans le cas de *Cl. kluyveri*, tout l'acétylacétate réduit se retrouve sous forme de β -hydroxybutyrate. Remarquons toutefois que les expériences de BARKER étaient effectuées à p_H 8.1: la réduction de l'acétylacétate n'était pas gênée par la réaction parasite de scission phosphoroclastique de l'acétylacétate qui ne se produit pas à ce p_H avec leurs extraits. Dans le cas qui nous intéresse, la plus grande partie de l'acétylacétate non réduit en β -hydroxybutyrate est scindé en acétate, alors qu'une faible partie seulement est réduite en butyrate. Les résultats de nos expériences relatives à la réduction de l'acétylacétate par l'hydrogène moléculaire se trouvent dans le Tableau III.

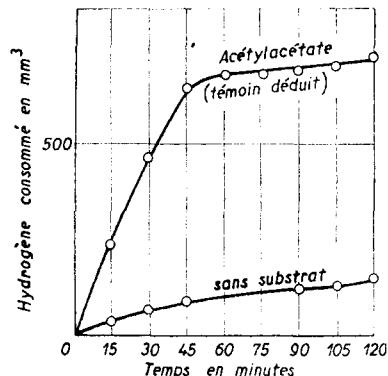


Fig. 1. Réduction de l'acétylacétate par l'hydrogène moléculaire. Partie principale de la cupule de Warburg: 43 micromoles d'acétylacétate, tampon phosphates $M/45$, H_2O au volume adéquat. Partie latérale: 0.5 ml suspension bactérienne. Dans le puits central: 0.2 ml KOH à 20%. Temps d'équilibration avant le mélange: 15 minutes

TABLEAU III
Clostridium acetobutylicum
RÉDUCTION DE L'ACÉTYLACÉTATE PAR L'HYDROGÈNE MOLÉCULAIRE

Mêmes conditions expérimentales que dans le Tableau I. Dans les cas où les acides volatils ont été dosés, les expériences ont été effectuées dans une série de 6 à 8 cupules de Warburg. Comme la consommation d'hydrogène était identique dans les diverses cupules, leurs contenus étaient mélangés à la fin de l'expérience et les dosages faits sur une partie aliquote. Les chiffres sont corrigés par défaillance de l'absorption d'hydrogène et de la quantité d'acides volatils formés par la suspension seule. Résultats exprimés en micromoles.

Acétylacétate		Hydrogène consommé	β -hydroxybutyrate	Butyrate	Acétate
initial	consommé				
43	43	32	11	—	—
43	43	28	10	—	—
344	344	208	104	50	300

C. Existence d'une déshydrogénase de l'acide β -hydroxybutyrique dans les suspensions de bactéries butyriques

NISMAN, COHEN-BAZIRE ET COHEN¹² ont montré en utilisant la technique de THUNBERG la présence d'une déshydrogénase β -hydroxybutyrique dans les suspensions des

souches GR₄ et PC₄₈. En utilisant la technique manométrique avec l'oxygène comme accepteur d'hydrogène, ils ont pu étudier la nature des produits formés. Les résultats de ce paragraphe sont extraits de leur travail.

On voit d'après le Tableau IV que la réaction est complexe: outre l'acétylacétate, il se forme du butyrate et de l'acétate. Les résultats du Tableau V montrent que le rapport du β -hydroxybutyrate disparu à l'oxygène consommé est voisin de 2, ce qui nous permet d'écrire la réaction



TABLEAU IV

PRÉSENCE D'UNE DÉSHYDROGÉNASE β -HYDROXYBUTYRIQUE CHEZ *Cl. saccharobutyricum*

1400 micromoles de DL- β -hydroxybutyrate de Na en tampon phosphates de pH 7.1. Volume total: 40 ml. Azote total de la suspension bactérienne: 20 mg. Température: 37° C. 120 minutes d'agitation à l'air dans des fioles coniques. Résultats exprimés en micromoles.

β -hydroxybutyrate consommé	Acétylacétate formé	Acétate formé	Butyrate formé
814	257	565	115

TABLEAU V

PRÉSENCE D'UNE DÉSHYDROGÉNASE β -HYDROXYBUTYRIQUE CHEZ *Cl. saccharobutyricum*

Dans chaque cupule de Warburg, 33.5 micromoles de DL- β -hydroxybutyrate de Na + 1 ml de suspension bactérienne + tampon phosphates M/60 (pH 7). Volume total: 3.2 ml (0.2 ml KOH à 20% dans la partie centrale). Phase gazeuse: air. Température: 37° C. Arsénite: M/300. Durée des expériences: 120-140 minutes. Environ 5.5 mg. N bactérien par ml de suspension. Résultats exprimés en micromoles.

	— β -hydroxybutyrate	— O ₂	+ Acétylacétate	β -hydroxy O ₂	Acétylacétate O ₂
I.	30	16.9	16.6	1.8	1
II.	32	16.6	16	1.9	1
IIIa.	31	16.5	18.5	1.8	1.1
IIIb. Idem + arsénite	—	7.6	14.7	—	1.9

Par contre, le rapport de l'acétylacétate apparu à l'oxygène consommé est loin d'être le rapport théorique, une partie notable de l'acétylacétate étant transformée en acides volatils comme nous l'avons vu au Tableau IV.

En présence d'arsénite de sodium à une concentration convenable, la fermentation du β -hydroxybutyrate ainsi que la scission hydrolytique de l'acétylacétate peuvent être inhibées⁶. Nous voyons au Tableau V un effet analogue: en présence d'arsénite, l'acétylacétate n'étant pas sollicité par une réaction parasite, le rapport de l'acétylacétate formé à l'oxygène consommé se rapproche du rapport théorique égal à 2.

D. Action de l'arsénite de sodium sur la réduction de l'acétylacétate par l'hydrogène moléculaire

Nous avions vu que l'arsénite de sodium à la concentration de 10⁻³ M inhibe la scission de l'acétylacétate en acétate⁶. A une concentration plus élevée, il inhibe la fermentation du β -hydroxybutyrate qui a lieu, nous venons de le voir, par l'inter-

médiaire de l'acétylacétate. Si l'on admet que c'est le même enzyme qui effectue la déshydrogénéation du β -hydroxybutyrate et la réduction de l'acétylacétate en β -hydroxybutyrate, il est probable que l'arsénite inhibera cette réduction. Ceci nous conduit à l'étude de l'action de l'arsénite sur la réduction de l'acétylacétate par l'hydrogène moléculaire. Rappelons que cet inhibiteur est sans action sur la réduction de l'acétylacétate par le pyruvate⁶.

Les bilans du Tableau VI montrent qu'en présence d'acétylacétate et d'arsénite $M/300$:

a. le rapport de l'hydrogène consommé à l'acétylacétate métabolisé est plus que doublé; b. on ne trouve plus que des traces de β -hydroxybutyrate; c. il ne se produit plus aucune scission de l'acétylacétate et le butyrate est le produit principal sinon unique de la réaction.

TABLEAU VI

*Cl. acetobutylicum. RÉDUCTION DE L'ACÉTYLACÉTATE PAR L'HYDROGÈNE MOLÉCULAIRE,
EN ABSENCE ET EN PRÉSENCE D'ARSÉNITE*

Mêmes conditions que dans le Tableau III.
Arsénite $M/300$.

	Acétylacétate		Hydrogène consommé	β -hydroxybutyrate formé	Acétate formé	Butyrate formé	$\frac{H_2}{AcAc}$	$\frac{But}{AcAc}$	$\frac{H_2}{But}$
	initial	consommé							
I.			208	104	300	50	0.6	0.14	4
	Sans arsénite	344	344	8	10	144	1.4	0.78	1.8
II.			28	10	—	—	0.65	—	—
	Sans arsénite	43	43	6	40	200	1.75	0.81	2.1
Avec arsénite		258	246	432	—	—	—	—	—

* Expérience arrêtée alors que la consommation d'hydrogène continuait.

AcAc = acétylacétate; But = butyrate.

E. Mécanisme de l'action inhibitrice du D- 2-(pantoylamino)éthylsulfonyl-4-nitroanilide sur la formation de butyrate à partir de pyruvate

COHEN¹⁸ avait observé que cet analogue de l'acide pantothénique exerçait une action inhibitrice à des concentrations assez élevées sur la formation de butyrate à partir de pyruvate sous l'influence de suspensions de bactéries butyriques. D'autres analogues de l'acide pantothénique n'exerçaient pas un tel effet. Un rapprochement avait été fait à l'époque par l'auteur entre cet effet et l'intervention probable du coenzyme A, contenant de l'acide pantothénique, sur la condensation de deux restes en C₂ en un corps en C₄, précurseur du butyrate. Une analyse plus poussée du phénomène nous a montré qu'il n'en est rien. Des expériences en tubes de THUNBERG nous ont montré que le nitroanilide de la pantoyltaurine recolore la phénosafranine réduite par les suspensions, donc qu'il est un accepteur d'hydrogène. On conçoit dès lors qu'il puisse rentrer en compétition avec le corps en C₄ provenant de la condensation de deux molécules d'acétate vis à vis de l'hydrogène provenant du pyruvate. Ceci explique également la nécessité de fortes concentrations de l'inhibiteur qui joue simplement le rôle d'un accepteur d'hydrogène parasite. Cette explication est confirmée par les résultats du Tableau VII qui montrent la consommation d'hydrogène par les suspensions en présence de cet inhibiteur, ainsi d'ailleurs qu'en présence de nitroaniline.

TABLEAU VII

RÉDUCTION DU NITROANILIDE DE LA PANTOYLTaurine ET DE LA NITROANILINE
PAR L'HYDROGÈNE MOLÉCULAIRE. *Cl. saccharobutyricum*

Partie principale de la cupule de Warburg: environ 4 micromoles de dérivé nitré, tampon phosphates $M/45$ (pH 7), H_2O au volume adéquat. Dans la partie latérale: 0.25 ml de suspension bactérienne (4 mg N bactérien par ml). Dans la partie centrale: 0.2 ml KOH à 20%. Volume total: 3.2 ml. Température: $37^\circ C$. Durée de l'expérience: 210 minutes. Résultats exprimés en micromoles.

Substrat	Hydrogène consommé
Nitroaniline	8.5
Nitroanilide de la pantoyltaurine	9.4

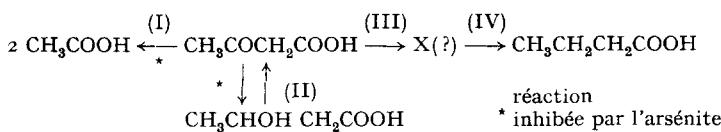
Ceci est un cas supplémentaire de réduction de corps nitrés par les bactéries, fait déjà observé avec la chloromycétine¹⁸ et la furacine¹⁵ entre autres. En particulier, la chloromycétine inhibe la réduction des nitrates en rentrant en compétition avec ces derniers vis à vis de l'hydrogène provenant des substrats réducteurs¹⁸.

DISCUSSION

Dans le cas des suspensions "normales"¹¹, on ne peut pas exclure la possibilité que la petite quantité de butyrate trouvée lors de la réduction de l'acétylacétate provienne d'une scission préalable de l'acétylacétate suivie d'une recondensation de deux restes en C₂ en un autre intermédiaire en C₄. Ceci est moins probable dans le cas des suspensions "déficientes", qui sont incapables de synthétiser du butyrate si on ne leur fournit pas un corps en C₄ préformé.

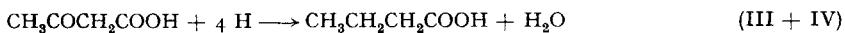
L'inhibition par l'arsénite de la scission de l'acétylacétate et de la transformation de l'acétylacétate en β -hydroxybutyrate nous a permis d'éliminer la possibilité d'une scission préalable en même temps qu'elle a permis de montrer que le β -hydroxybutyrate n'est pas un intermédiaire de la transformation acétylacétate \rightarrow butyrate.

Le schéma suivant résume nos résultats :



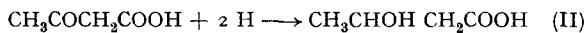
En l'absence d'arsénite, trois réactions peuvent solliciter l'acétylacétate: scission en acétate, réduction en β -hydroxybutyrate, réduction en butyrate.

Nos résultats montrent qu'en présence d'arsénite, les deux premières réactions sont inhibées et que deux molécules d'hydrogène sont utilisées par molécule de butyrate synthétisé. La réaction globale en présence d'arsénite peut s'écrire comme suit:



Cette réduction peut impliquer un intermédiaire dans le même état d'oxydation que le β -hydroxybutyrate, ce composé lui-même étant exclu comme intermédiaire de la synthèse d'acide butyrique par les organismes étudiés dans ce travail.

On conçoit facilement que dans le vide, la réaction



ait lieu vers la gauche, alors qu'en atmosphère d'hydrogène, l'équilibre est déplacé vers la droite, le β -hydroxybutyrate n'étant alors plus fermenté.

Ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer que l'acétylacétate est un intermédiaire *réel* de la synthèse d'acide butyrique par les bactéries butyriques et acétonobutyliques. Toutefois, ils montrent que l'acétylacétate peut être réduit en butyrate.

RÉSUMÉ

Les suspensions de bactéries butyriques ne fermentent pas le β -hydroxybutyrate en atmosphère d'hydrogène, contrairement à ce qui se passe dans le vide. L'acétylacétate est réduit par l'hydrogène moléculaire: le produit principal de la réduction est le β -hydroxybutyrate; on trouve également de faibles quantités de butyrate. En présence d'arsénite, la réduction de l'acétylacétate en β -hydroxybutyrate est inhibée et le butyrate est le seul produit de la réaction. La réduction de l'acétylacétate en butyrate ne comporte pas de scission préalable de l'acétylacétate suivie d'une recondensation en un autre intermédiaire en C_4 .

SUMMARY

Contrary to what occurs *in vacuo*, β -hydroxybutyrate is not fermented by suspensions of butyric acid bacteria in a hydrogen atmosphere. Acetoacetate is reduced in the presence of molecular hydrogen, β -hydroxybutyrate being the main product of the reduction; only small amounts of butyrate are found. In the presence of arsenite, the reduction of acetoacetate into β -hydroxybutyrate is inhibited and butyrate is the only product of the reaction. The reduction of acetoacetate to butyrate occurs without splitting of acetoacetate to two C_2 residues followed by a reconensation to another C_4 intermediate.

ZUSAMMENFASSUNG

Suspensionen von Buttersäurebakterien vergären in Wasserstoffatmosphäre β -Hydroxybutyrat nicht; dies steht im Gegensatz zu den Vorgängen im Vakuum. Acetessigester wird durch molekularen Wasserstoff reduziert: das Hauptprodukt der Reduktion ist β -Hydroxybutyrat; man findet auch geringe Mengen von Butyrat. In Gegenwart von Arsenit wird die Reduktion des Acetessigesters zu β -Hydroxybutyrat gehemmt und das Butyrat ist das einzige Reaktionsprodukt. Die Reduktion des Acetessigesters zu Butyrat geschieht ohne vorherige Spaltung des Acetessigesters in zwei C_2 -Spaltstücke mit darauf folgender erneuter Kondensation zu einem anderen C_4 -Zwischenprodukt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 143 (1942) 147.
- ² E. R. STADTMAN ET H. A. BARKER, *J. Biol. Chem.*, 147 (1948) 1039.
- ³ E. R. STADTMAN ET H. A. BARKER, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 1169.
- ⁴ G. N. COHEN ET G. COHEN-BAZIRE, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 374.
- ⁵ G. N. COHEN ET G. COHEN-BAZIRE, *Compt. rend.*, 228 (1949) 1531.
- ⁶ G. COHEN-BAZIRE ET G. N. COHEN, *Ann. inst. Pasteur*, 78 (1950) 644.
- ⁷ B. NISMAN, *Compt. rend.*, 230 (1950) 248.
- ⁸ F. LIPMANN, *Advances in Enzymol.*, 1 (1941) 99.
- ⁹ F. LIPMANN, *Advances in Enzymol.*, 6 (1946) 231.
- ¹⁰ E. R. STADTMAN ET H. A. BARKER, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 1111.
- ¹¹ G. COHEN-BAZIRE ET G. N. COHEN, *Ann. inst. Pasteur*, 77 (1949) 718.
- ¹² B. NISMAN, G. COHEN-BAZIRE ET G. N. COHEN, *Compt. rend.*, 231 (1950) 421.
- ¹³ G. N. COHEN, *Ann. inst. Pasteur*, 77 (1949) 471.
- ¹⁴ G. N. SMITH ET C. S. WORREL, *Arch. Biochem.*, 24 (1949) 216.
- ¹⁵ R. E. ASNIS ET J. S. GOTS, *Arch. Biochem.*, 30 (1951) 35.
- ¹⁶ F. EGAMI, M. EBATA ET R. SATO, *Nature*, 167 (1951) 118.

Reçu le 8 Juin 1951