

LDH activity was found in peaks 1, 2, and 3; peak α contained less than 1% of the LDH activity in peak 1. The LDH peaks eluted at approx. 0.03, 0.04, and 0.05 M chloride for all extracts. The recoveries of LDH activity from the columns were 96, 93, and 75% for whole cornea, epithelium-endothelium, and stroma, respectively. The purification of LDH ranged from 4- to 9-fold, dependent upon the extract and peak considered (see Table I).

When measured in the direction of DPNH oxidized at pH 7.0 and 25°, the activity of crystalline beef-heart LDH is 300 μ moles/min/mg protein⁶. If it is assumed that the activity of crystalline LDH is doubled by increasing the temperature from 25° to 37°, then the column-purified corneal LDH would have about the same activity as crystalline beef-heart LDH.

The possibility of contamination of the stroma by epithelial and endothelial cells and/or fluids does exist. It is not certain that the three forms of LDH found in the stromal extracts are native to that part of the cornea, although it has been reported that rat and rabbit stroma do contain LDH activity¹.

This investigation was supported by research grants from the National Cancer Institute (CY-3430) and the National Institute of Neurological Diseases and Blindness (B-1375) of the National Institutes of Health, Public Health Service.

*Wernicke Cancer Research Laboratory, and
Department of Ophthalmology,
Washington University School of Medicine,
St. Louis, Mo. (U.S.A.)*

BLAKE W. MOORE

BERNARD WORTMAN

- ¹ R. KUHLMAN AND R. A. RESNICK, *Am. J. Ophthalmol.*, **46** II (1958) 47.
- ² E. A. PETERSON AND H. A. SOBER, *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956) 751.
- ³ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR AND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, **193** (1951) 265.
- ⁴ O. H. LOWRY, personal communication.
- ⁵ O. H. LOWRY, N. R. ROBERTS AND J. I. KAPPHahn, *J. Biol. Chem.*, **224** (1957) 1047.
- ⁶ J. B. NEILANDS, in *Methods in Enzymology*, Vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 449.

Received November 26th, 1958

Sur la différence de stéréospécificité entre la déshydrogénase lactique extraite de la levure anaérobie et celle extraite de la levure aérobie

On sait que l'équipement enzymatique de la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) subit des modifications très importantes au cours de l'adaptation respiratoire, c'est-à-dire au cours du passage de la vie anaérobie à la vie aérobie (cf. ref. 1). Il a été montré récemment² qu'à ces deux conditions correspondent deux lacticodéshydrogénases différentes: l'une, celle de la levure aérobie (enzyme O) est classique et a déjà été étudiée par plusieurs auteurs³⁻⁷, l'autre (enzyme N) n'avait pas été mise en évidence auparavant. Elle se distingue de la première par un certain nombre de propriétés physicochimiques et cinétiques, en particulier, elle ne réduit pas le cytochrome c.

Nous montrons ici que ces deux lacticodéshydrogénases diffèrent par la stéréospécificité du substrat: l'enzyme formé par la levure anaérobie oxyde l'acide D(—) lactique tandis que l'enzyme formé par la levure aérobiose oxyde l'isomère L(+).¹

Les sels d'ammonium* des acides D- et L-lactiques ont été préparés à partir d'un acide racémique pur, pour analyses, par la méthode de IRVINE⁸. La cristallisation fractionnée du lactate de morphine permet d'obtenir d'abord le sel de l'acide D-lactique que l'on recristallise deux fois, puis une fraction racémique éliminée, et des eaux-mères correspondant au sel de l'acide L-lactique. Les solutions des sels d'ammonium sont décolorées et débarrassées de traces de morphine par traitement au charbon actif. On a trouvé que le D-lactate ne contenait pas d'isomère L; son pouvoir rotatoire spécifique basé sur la mesure de la rotation à pH 8.5 et sur la détermination de la concentration par l'indice de réfraction à pH 6.65⁹ est $[\alpha]_D^{20} = +14.6$ (solution 0.3 M). La concentration du L-lactate est mesurée en présence de la L-lacticodéshydrogénase du muscle¹⁰ selon PFLEIDERER ET DOSE¹¹. Le L-lactate préparé est contaminé par du D-lactate (6%); le pouvoir rotatoire spécifique égal à —12.2 (solution 0.3 M) correspond, en corrigeant pour la contamination, à la valeur $[\alpha]_D^{20} = -13.9$ pour l'isomère L pur. L'enzyme O est extrait et purifié par la méthode de BOERI *et al.*⁵ à partir de la levure cultivée en aérobiose forcée. L'enzyme N est extrait et purifié à partir de levure cultivée en anaérobiose stricte par la méthode décrite par ailleurs^{2,12}; les activités spécifiques des préparations employées sont respectivement 270 et 200 μ moles ferricyanure/mg protéine/h. La réduction du ferricyanure est suivie au spectrophotomètre Beckman DU, à 420 m μ , dans une cuve de trajet optique égal à 1.0 cm, à 27° en tampon phosphate 0.07 M pH 7.3; volume: 3 ml.

Deux types d'expériences ont été faites; réduction du ferricyanure en présence d'un seul isomère, réduction du ferricyanure en présence de mélanges en proportions connues des deux isomères.

L'enzyme N ne réduit pas le ferricyanure en présence de L-lactate; l'enzyme O ne le réduit pas en présence de D-lactate; ce dernier résultat confirme les données de BOERI *et al.*⁵.

La figure montre le résultat des mesures effectuées sur des mélanges des lactates D et L. Il est clair que la spécificité des deux enzymes est absolue, et que la différence n'est pas due à la présence d'une racémase. La stoechiométrie de la réaction est, dans les deux cas, de deux molécules de ferricyanure réduites par molécule de lactate oxydée comme le montrent les déterminations suivantes:

<i>D E</i>	Ferricyanure (μ moles)	D-lactate (μ moles)	L-lactate (μ moles)	Enzyme	Ferricyanure Lactate
0.247	0.708	0.311		N	2.14
0.420	1.20	0.581		N	2.06
0.479*	1.37		0.650	O	2.11

* Moyenne de 5 déterminations.

Le lactate est donc oxydé en pyruvate; on a pu montrer par ailleurs que la réaction d'oxydation du lactate en présence d'enzyme N est réversée par le pyruvate, et qu'à

* On sait que les sels de l'acide lactique dextrogyre, L(+), sont lévogyres tandis que ceux de l'acide D(—) lactique sont dextrogyres: l'expression "L(+) lactate" employée par plusieurs auteurs porte donc une contradiction interne et devrait être abandonnée.

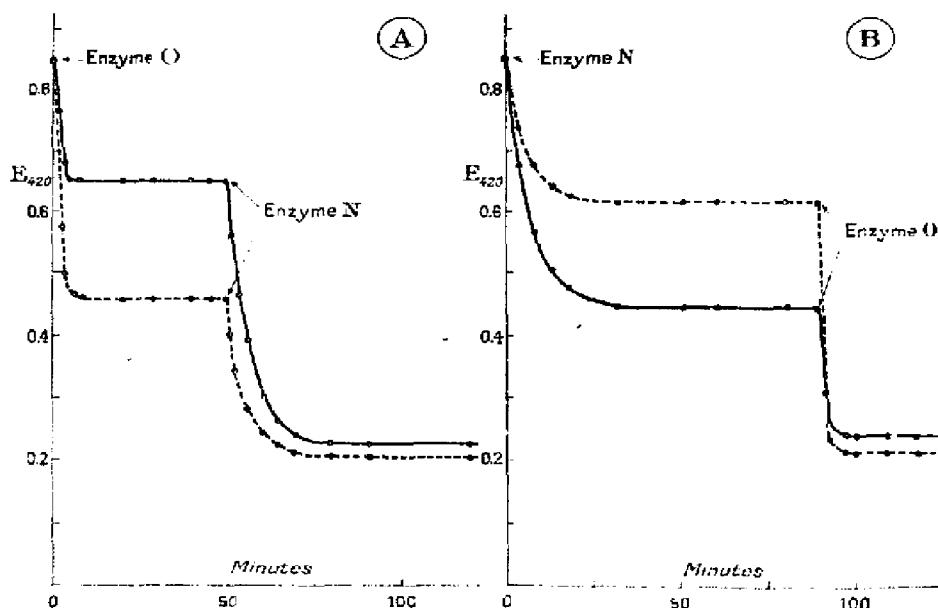


Fig. 1. Réduction du ferricyanure (2.44 μ moles) par deux mélanges à proportions déterminées des acides lactiques. Trait plein: 0.281 μ mole L-lactate + 0.380 μ mole D-lactate. Trait pointillé: 0.562 μ mole L-lactate + 0.320 μ mole D-lactate. A: la première phase de la réaction est amorcée par l'addition de l'enzyme O, la deuxième phase par l'addition de l'enzyme N dans la même cuve. B: l'ordre d'addition des enzymes est inversé.

L'équilibre lactate-pyruvate en présence du même enzyme correspondait bien un potentiel voisin de -185 mV^{13} .

Quelles sont les causes de la formation de ces deux enzymes par la même cellule?

Le problème des inducteurs doit être envisagé d'abord: ou bien la biosynthèse de la déshydrogénase aérobie est induite directement ou indirectement par l'oxygène moléculaire, ou bien elle est induite par le L-lactate tandis que celle de l'enzyme N est induite par le D-lactate. Le deuxième cas implique que l'acide L-lactique ne fait partie que du métabolisme aérobie tandis que son isomère D ne fait partie que du métabolisme anaérobie de la levure; le D-lactate pourrait provenir de l'hydratation du méthylglyoxal sous l'influence de la glyoxalase I et du glutathion.

Le problème des précurseurs doit tenir compte du fait qu'au cours de l'adaptation respiratoire en absence de croissance, la formation de l'enzyme O est accompagnée de la disparition progressive de l'enzyme N. Ceci nous a conduit à envisager l'hypothèse selon laquelle la déshydrogénase anaérobie servait de précurseur à l'enzyme aérobie². La différence de stéréospécificité rend cette hypothèse moins vraisemblable car il faudrait que les modifications concernent non seulement les sites impliqués dans la réduction des accepteurs mais aussi ceux impliqués dans la fixation du substrat. Si, néanmoins, l'étude ultérieure montrait que cette hypothèse est exacte, sa portée pour la compréhension du déterminisme de la spécificité des enzymes serait d'autant plus grande.

On sait depuis plus de 50 ans que les divers microorganismes produisent soit l'un des isomères de l'acide lactique, soit l'autre, soit un mélange des deux; la nature et les proportions dépendent pour certains organismes des conditions du milieu^{14,15}.

L'analyse de ces phénomènes n'a pas été effectuée au niveau enzymatique, mais ils ont été interprétés le plus souvent en postulant une racémase comme c'est apparemment le cas pour *Clostridium butylicum*¹⁶. Plus récemment, les observations ont mis en évidence des différences dans les réactions des Dl- et L-lactates entre les extraits bruts et les extraits purifiés provenant de *E. coli*¹⁷ et de *Lactobacillus arabinosus*^{18, 19}. L'analyse enzymatique n'a pas été poussée plus loin et les différences peuvent relever soit de la présence d'une racémase, soit de la présence simultanée des deux enzymes spécifiques pour le L- et le D-lactate. Il serait intéressant de reprendre l'étude de ces phénomènes à la lumière des résultats apportés dans le présent travail.

Notons finalement que l'emploi des enzymes purifiés à partir de la levure permet de doser spécifiquement et directement chacun des isomères dans le mélange racémique tandis que les microméthodes employées jusqu'à présent permettent seulement le dosage d'un seul isomère, l'estimation de l'autre étant obtenu par différence à partir des dosages de lactate total. Le dosage proposé ici pour le L-lactate est plus sensible et plus précis que le dosage manométrique²⁰; le dosage du L-lactate est plus économique car il ne fait pas appel au DPN. La réaction avec le ferricyanure est quantitative et ne fait pas intervenir de constantes d'équilibre comme dans la méthode de PFLEIDERER ET DOSE¹¹.

Nous remercions Mr. le Professeur RENÉ WURMSER et Mr. le Professeur BORIS EPHRUSSI pour l'intérêt qu'ils ont porté constamment à ce travail.

*Laboratoire de Biologie physicochimique de la Faculté des Sciences,
Institut de Biologie physicochimique, Paris
Laboratoire de Génétique
physiologique du C.N.R.S., Gif-sur-Yvette, S. et O. (France)*

F. LABEYRIE
P. P. SLONIMSKI
L. NASLIN

- ¹ B. EPHRUSSI ET P. P. SLONIMSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 256.
- ² P. P. SLONIMSKI, *Proceed. 3rd Intern. Congr. Biochem.*, Acad. Press, New York (1956), p. 242.
- ³ P. P. SLONIMSKI ET W. TYSAROWSKI, *Compt. Rend.*, 246 (1958) 1111.
- ⁴ S. J. BACH, M. DIXON ET L. G. ZERFAS, *Biochem. J.*, 49 (1948) 229.
- ⁵ C. A. APPLEBY ET R. K. MORTON, *Nature*, 173 (1954) 749.
- ⁶ E. BOERI, E. CITOLE, M. LUZZATI ET L. TOSI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 56 (1955) 487.
- ⁷ E. BOERI ET L. TOSI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 60 (1956) 493.
- ⁸ J. YAMASHITA, T. HIGASHI, T. YAMANAKA, M. NOZAKI, H. MIZUSHIMA, H. MATSUBA, T. HORIO ET K. OKUNUKI, *Nature*, 179 (1957) 959.
- ⁹ J. C. IRVINE, *J. Chem. Soc., London*, 89 (1906) 935.
- ¹⁰ E. J. COSTELLO ET E. M. FILACHIONE, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 1242.
- ¹¹ J. B. NEILANDS, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 373.
- ¹² G. PFLEIDERER ET K. DOSE, *Biochem. Z.*, 326 (1954) 436.
- ¹³ P. P. SLONIMSKI, W. TYSAROWSKI ET F. LABEYRIE, en préparation.
- ¹⁴ F. LABEYRIE ET L. NASLIN, en préparation.
- ¹⁵ C. S. PEDERSON, W. H. PETERSON ET E. B. FRED, *J. Biol. Chem.*, 68 (1926) 151.
- ¹⁶ H. KATAGIRI ET K. KITAHARA, *Biochem. J.*, 31 (1937) 909.
- ¹⁷ W. B. CHRISTENSEN, M. J. JOHNSON ET W. H. PETERSON, *J. Biol. Chem.*, 127 (1939) 421.
- ¹⁸ N. HAUGAARD, *Federation Proc.*, 9 (1950) 182.
- ¹⁹ S. KORKES, A. DEL CAMPILLO ET S. OCHOA, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 891.
- ²⁰ S. KAUFMAN, S. KORKES ET A. DEL CAMPILLO, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 301.
- ²¹ C. J. A. VAN DEN HAMER ET R. W. ELIAS, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 550.

Reçu le 10 novembre, 1958