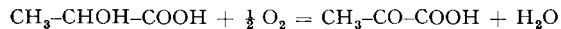


### **Stéréospécificité et biosynthèse des lactate-déshydrogénases d'*Aerobacter aerogenes***

Dans la présente note, figurent des résultats qui établissent l'existence de deux lactate:(accepteur)-oxydoréductases stéréospécifiques chez *Aerobacter aerogenes* (souche L III-I). Quelques-unes des principales propriétés de ces enzymes seront décrites. Mais la régulation de leur biosynthèse constitue le problème central de notre étude.

Les observations suivantes montrent qu'*A. aerogenes* possède un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser les deux stéréoisomères du lactate: (1) en aérobiose, l'organisme utilise les D- et L-lactates comme aliments carbonés et sources d'énergie; (2) les suspensions cellulaires provenant de cultures aérobies sur DL-, D- ou L-lactates, respirent les deux énantiomorphes avec des vitesses presque identiques.

En anaérobiose, les cellules et les extraits de cultures aérobies sur DL-lactate, ne catalysent point la conversion de l'un des antipodes en l'autre, ce qui exclut la présence d'un système doué d'une activité racémase. Chez *Mycobacterium phlei*, une lactique -oxydase (L-lactate:O<sub>2</sub>-oxydoréductase, EC 1.1.3.2) catalyse l'oxydation par O<sub>2</sub> du lactate en acétate et CO<sub>2</sub>, sans formation de pyruvate libre comme intermédiaire<sup>1</sup>. *A. aerogenes* est vraisemblablement dépourvu d'un tel enzyme puisqu'en présence de O<sub>2</sub>, chaque stéréoisomère est oxydé quantitativement en pyruvate par les extraits de cultures aérobies sur racémique:



En présence de chaque énantiomorphe, les extraits de cultures aérobies sur DL-lactate, catalysent la réduction du DCIP et de la PMS. Généralement, l'activité D-lactate-déshydrogénase est un peu supérieure à l'activité L-lactate-déshydrogénase. La formation d'une mole de pyruvate accompagne toujours la réduction d'une mole de DCIP. A elle seule, la présence des deux activités dans le même extrait ne démontre pas l'existence de deux lactate-déshydrogénases stéréospécifiques, puisque les actions couplées d'une seule déshydrogénase et d'une racémase, permettraient l'oxydation de chaque antipode. Mais une telle éventualité est écartée d'emblée par nos observations antérieures. Comme nous le verrons, le rapport des activités D- et L-lactate-déshydrogénases varie dans des proportions considérables lorsque les conditions de croissance changent. Il en résulte de toute évidence que celles-ci ne sont point dues à un seul et même enzyme dépourvu de stéréospécificité, mais à deux déshydrogénases distinctes et stéréospécifiques.

Aucune des deux lactate-déshydrogénases ne catalyse: (1) la réduction du ferri-cyanure, du cytochrome *c* de muscle cardiaque et des pyridine-nucléotides (NAD et NADP); (2) l'oxydation par le pyruvate du FMNH<sub>2</sub> et du benzyl-viologène réduit. De plus, l'addition d'une faible quantité de NAD n'active point la réduction du DCIP. Par conséquent, nos enzymes diffèrent des lactate-déshydrogénases à NAD de *Lactobacillus plantarum*<sup>2</sup> (L-lactate:NAD-oxydoréductase, EC 1.1.1.27 et D-lactate:NAD-oxydoréductase, EC 1.1.1.28). D'autre part, ils sont dépourvus d'activité cytochrome *c*-oxydoréductase et ne fonctionnent pas d'une manière réversible

Abréviations: DCIP, 2,6-dichlorophénol-indophénol; PMS, phénazine-méthosulfate.

avec les donateurs employés. Ayant constamment travaillé avec des extraits bruts, il est impossible de préciser si l'oxydation par  $O_2$  des D- et L-lactates, résulte en totalité ou en partie d'un transfert direct des électrons entre les lactate-déshydrogénases et  $O_2$  ou d'un couplage entre ces enzymes et le système respiratoire physiologique de l'organisme. En un mot, nous ne pouvons savoir si nos lactate-déshydrogénases sont autoxydables. Dans les extraits préparés par traitement sonique, une fraction importante des deux enzymes existe sous forme particulière: 60% de la D-lactate-déshydrogénase et 76% de la L-lactate-déshydrogénase se trouvent dans le sédiment après 2 h de centrifugation à  $140\,000 \times g$ . A une concentration 1 mM, l'oxalate inhibe de 70% l'activité de la D-lactate-déshydrogénase mais n'exerce aucune action sur la L-lactate-déshydrogénase. Par ses propriétés, la D-lactate-déshydrogénase d'*A. aerogenes* se rapproche de celle de *Leuconostoc mesenteroides*<sup>3</sup>.

Notre souche peut former le substrat de la D-lactate-déshydrogénase, en aérobiose comme en anaérobiose. En effet, il a été établi que: (1) le D-lactate constitue l'un des produits ultimes du métabolisme fermentaire anaérobie du glucose; (2) les extraits de cultures aérobies ou anaérobies, catalysent la réduction du pyruvate en D-lactate, en présence de  $NADH_2$ ; cette réaction est certainement l'œuvre d'un enzyme distinct de la D-lactate-déshydrogénase car l'activité  $NADH_2$ :pyruvate-oxydoréductase est liée à une protéine soluble ne sédimentant pas à  $140\,000 \times g$ . Par contre, à l'aide de nos techniques enzymatiques d'identification, nous n'avons jamais détecté de quantités appréciables de L-lactate dans les cultures anaérobies et dans les systèmes acellulaires catalysant la réduction du pyruvate aux dépens du  $NADH_2$ . Il semble donc bien que la souche utilisée ne forme jamais le substrat de la L-lactate-déshydrogénase.

Quelles que soient la composition du milieu de culture et les conditions de croissance, les extraits catalysent toujours la réduction du DCIP, de la PMS et de  $O_2$ , en présence de D-lactate. Faut-il admettre que les activités D-lactate-déshydrogénases des cultures aérobies et anaérobies sont dues au même enzyme? Une réponse positive à la question soulevée s'appuie sur les observations suivantes: (1) le rapport des activités mesurées avec le DCIP et la PMS reste toujours constant; (2) la spécificité à l'égard des accepteurs d'électrons demeure la même; (3) la sensibilité à l'action inhibitrice de l'oxalate ne change pas. En définitive, la D-lactate-déshydrogénase est synthétisée dans les cultures aérobies et anaérobies sur milieu glucosé avec ou sans DL-lactate; elle est également formée en présence de  $O_2$  dans les cultures contenant comme seul aliment carboné les DL-, D- ou L-lactates, le pyruvate, le succinate ou le citrate. La teneur en D-lactate-déshydrogénase double lorsqu'on ajoute du fumarate à une forte concentration, dans les cultures anaérobies sur glucose. Elle est aussi présente dans les cultures anaérobies respirant le glucose aux dépens du nitrate.

La L-lactate-déshydrogénase apparaît seulement dans les cultures aérobies contenant le racémique ou l'un des énantiomorphes. Cet enzyme n'est jamais présent à une concentration dosable dans les cultures anaérobies sur milieu glucosé avec ou sans DL-lactate, avec ou sans nitrate ou fumarate; et dans les cultures aérobies contenant comme seul aliment énergétique l'un des métabolites suivants: pyruvate, succinate et citrate. Une expérience très simple a permis d'écarter l'hypothèse suivant laquelle la L-lactate-déshydrogénase serait formée en l'absence de  $O_2$  puis subirait une inactivation provoquée par l'anaérobiose. Nous nous sommes assurés que le

pouvoir inducteur du D-lactate employé n'est pas dû à la contamination par les traces de L-lactate. Enfin pour des raisons déjà exposées, l'induction par le D-lactate ne peut résulter de la formation de L-lactate ou être provoquée par le pyruvate ou par un produit du métabolisme de ce dernier composé. Nos observations conduisent ainsi inévitablement à la conclusion que la L-lactate-déshydrogénase est un enzyme inductible dont la biosynthèse requiert la présence de O<sub>2</sub> et de l'un des énantiomorphes du lactate.

Quelle que soit sa concentration par rapport au lactate, le glucose ne réprime jamais la formation de la D-lactate-déshydrogénase dans les cultures aérobies et anaérobies, ou de la L-lactate-déshydrogénase dans les cultures aérobies. Par conséquent, la biosynthèse des deux enzymes n'est point soumise à l'effet glucose classique.

L'un des points faibles de notre travail réside dans l'impossibilité de savoir si la D-lactate-déshydrogénase est de nature constitutive ou inductible. En l'absence de lactate exogène, sa synthèse peut en effet être induite par l'antipode D formé au sein de la cellule. En ce qui concerne la L-lactate-déshydrogénase, la situation est nettement plus claire et rappelle celle de la L-lactate:cytochrome *c*-oxydoréductase, (EC 1.1.2.3) de la levure<sup>4,5</sup>. Sa formation est soumise à l'adaptation respiratoire mais l'induction par O<sub>2</sub> ne se manifeste qu'en présence de D- ou de L-lactate. Tout se passe en somme comme si le système de régulation de la L-lactate-déshydrogénase était dépourvu de stéréospécificité. Nos résultats suggèrent l'idée suivant laquelle la biosynthèse de certains enzymes d'oxydoréduction bactériens pourrait requérir la présence de deux inducteurs distincts, le substrat ou l'un de ses analogues et O<sub>2</sub>. Comme dans le cas du système cytochromique de la levure<sup>6</sup>, l'adaptation respiratoire semble présenter ici une grande spécificité envers l'agent qui en est la cause puisque deux accepteurs physiologiques d'hydrogène différents de O<sub>2</sub> sont dépourvus d'inductibilité. Il se pourrait que la D-lactate-déshydrogénase n'ait pas de fonction physiologique dans un milieu privé de O<sub>2</sub> car *A. aerogenes* ne se développe pas en anaérobiose sur DL-lactate comme seule source d'énergie, en présence de nitrate ou de fumarate.

Nos recherches vont être prochainement étendues à d'autres espèces bactériennes.

Nous exprimons notre vive reconnaissance à Mr P. SLONIMSKI et Mme M. SOMLO pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

*Laboratoire de Chimie Bactérienne,  
Centre National de la Recherche Scientifique,  
Marseille (France)*

MARIE-CLAIRE PASCAL  
FRANCIS PICHINOTY

<sup>1</sup> W. B. SUTTON, *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 395.

<sup>2</sup> D. DENNIS ET N. O. KAPLAN, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 810.

<sup>3</sup> E. KAUFMANN ET S. DIKSTEIN, *Nature*, 190 (1961) 346.

<sup>4</sup> P. P. SLONIMSKI, *Formation des enzymes respiratoires chez la levure*, Masson, Paris, 1953.

<sup>5</sup> P. P. SLONIMSKI, *Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem.*, Academic Press, New York, 1956, p. 242.

<sup>6</sup> B. EPHRUSSI ET P. P. SLONIMSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 256.

Reçu le 5 Juillet 1963