

Métabolisme - Régulation

Génétique moléculaire des lactate-déshydrogénases des bactéries lactiques

J Delcour, N Bernard, D Garmyn, T Ferain, P Hols

Unité de génétique, Université catholique de Louvain,
Croix du Sud 5, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique

Résumé — Nous avons cloné les gènes de D-lactate-déshydrogénase (D-LDH) et un gène de D-hydroxy-isocaproate-déshydrogénase (D-HicDH) de deux bactéries lactiques (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Pediococcus acidilactici*) par complémentation d'un mutant LDH-négatif de *Escherichia coli*. La séquence de ces gènes a révélé l'existence d'une famille de déshydrogénases d' α -hydroxy-acides NADH-dépendantes totalement différente de la famille des L-LDH. Les relations structure-fonction des enzymes de cette nouvelle famille sont actuellement à l'étude par mutagenèse dirigée.

lactate-déshydrogénase / hydroxy-isocaproate déshydrogénase / bactérie lactique / acide lactique / *Lactobacillus bulgaricus*

Summary — Molecular genetics of lactate-dehydrogenases from lactic acid bacteria. We have cloned 2 D-lactate-dehydrogenase genes (D-LDH) and one D-hydroxy-isocaproate-dehydrogenase gene (D-HicDH) from lactic acid bacteria (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Pediococcus acidilactici*) by complementation of a LDH-negative mutant of *Escherichia coli*. The sequence of these genes has revealed the existence of a novel family of NADH-dependent α -hydroxy-acid dehydrogenases which were completely different from the L-LDH family. The structure-function relationships of enzymes from this new family are currently under study via site-directed mutagenesis.

lactate-dehydrogenase / hydroxy-isocaproate dehydrogenase / lactic acid bacteria / lactate / *Lactobacillus bulgaricus*

INTRODUCTION

Lorsque nous avons entamé il y a environ 2 ans ce travail sur le clonage et l'analyse de gènes de lactate-déshydrogénases, aucun gène de LDH n'avait encore été cloné dans le groupe des bactéries lactiques. Chose d'autant plus étrange qu'à cette époque déjà, environ une dizaine de gènes de LDH microbiennes étaient

connus, principalement dans le genre *Bacillus*. Si de plus on se rappelle le très vaste champ de connaissances acquises sur les enzymes elles-mêmes depuis plusieurs décennies (Holbrook *et al*, 1975; Garvie, 1980) on s'étonnera que cette famille de bactéries dont c'est pourtant le patronyme soit restée complètement ignorée à cet égard par les biologistes moléculaires.

Notre intérêt pour les LDH des bactéries lactiques était à l'origine et reste pour une bonne part, en tant que laboratoire universitaire, fondamental. Nous étions intrigués par l'existence de 2 activités enzymatiques distinctes responsables chacune de la réduction du pyruvate en l'un des 2 stéréo-isomères du lactate. Les seules LDH dont la séquence ou le mécanisme catalytique étaient connus à l'époque, qu'elles soient d'origine microbienne, animale ou végétale, étaient spécifiques de l'isomère L. En l'absence de toute information sur la séquence ou la structure tridimensionnelle des LDH spécifiques de l'isomère D, on en était réduit jusqu'il y a un an à peine à répondre par une simple conjecture à la question de l'origine évolutive des D- et L-LDH. Nous pensions comme d'autres (Long et Kaplan, 1968) que les L- et D-LDH dérivait évolutivement d'un ancêtre commun, et que ces deux enzymes ne différaient sans doute que par quelques détails de structure.

STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

Nous voulions au départ pouvoir cloner indifféremment des gènes de L- ou de D-LDH. Les gènes de L-LDH sont connus de longue date et manifestent, comme les protéines elles-mêmes, une similarité propice à un clonage indirect au moyen d'une sonde génique dégénérée, comme cela a été fait tout récemment encore par Kim *et al* (1991) pour le clonage de la L-LDH de *Lactobacillus casei*. En revanche, les gènes de D-LDH étaient impossibles à cloner par cette voie en l'absence de toute information structurale. C'est pourquoi nous avons préféré utiliser une stratégie de clonage par complémentation, inspirée par l'existence d'un mutant d'*Escherichia coli* (FMJ 144) doublement déficient pour la lactate-déshydrogénase et la pyruvate-formate lyase. Ce mutant avait été construit par Mat-Jan *et al* (1989) pour un tout autre but, mais se prêtait bien, en principe, à notre objectif. En effet, en l'absence d'oxygène, le mutant FMJ 144 est incapable de régénérer le NAD⁺ nécessaire à la glycolyse. Mat-Jan *et al*

(1989) avaient montré que la présence d'un gène *ldh* ou *pfl* suffisait à restaurer l'équilibre rédox, et donc la croissance en anaérobiose. Nous avons là un outil de choix pour cloner un gène *ldh* fonctionnel, qu'il soit D ou L. Le risque était, bien sûr, qu'un gène de LDH en provenance d'une bactérie lactique ne soit pas exprimé chez *E coli*, ou soit toxique, voire létal, particulièrement en surdosage génique — ce qui est inévitable lors d'un clonage au moyen d'un plasmide à copies multiples.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Notre choix s'est fixé en tout premier lieu sur *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, car cette espèce produit exclusivement du D-lactate et nous avions l'espoir de pouvoir cloner pour la première fois un gène de D-LDH. Nous avons donc construit une banque génomique de *L bulgaricus* et transformé la souche FMJ 144 avec celle-ci. Une dizaine de clones positifs en anaérobiose ont été obtenus. Deux clones se sont avérés producteurs de lactate et détenteurs d'une activité LDH : l'un (clone 12) très actif, l'autre (clone 3) beaucoup moins.

L'analyse par électrophorèse en conditions natives d'un extrait brut du clone 12 a montré que celui-ci exprime une D-LDH semblable à celle de *L bulgaricus*, et le dosage enzymatique a révélé qu'il produit exclusivement du D-lactate. La séquence de la protéine déduite de la séquence du gène ne ressemble en rien à celle d'une L-LDH, si ce n'est pour la signature du site de fixation au NAD (fig 1). Le schéma évolutif considérant la L- et la D-LDH comme issues d'un ancêtre commun est donc totalement mis en défaut, ainsi que l'avaient suggéré Clarke *et al* (1991) sur base de l'analyse de la séquence N-terminale de l'enzyme : celle-ci ne s'ajustait nullement sur la région correspondante des L-LDH connues, mais au contraire sur celle de la D-hydroxyisocaproate déshydrogénase de

```

(1) MTRFAYALREDEKPFLEKEDAHKRDVEVEYTKLLTTFVALAKGADGV -50
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
(2) M-KIIAYGARVDEIQVFKQAKD-TGNPTLEYHTEFLDENTVEWAKGFDGI -48
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
VVVQQQLDYAETLQALADNGITKMSLRVQVNDIMKAKAKELGQITIVNP -100
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NSLQTFYVAGVPEKMHAVGKFLTIRNVTDNIMPTAMKQVIGLSMVP -98
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
VYSFNATAEHAAIQAAAALRQ-DKAMDEKVARHDLRWAPTIGREVEDQVV -149
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AYSFAIATFALTDLTLRLNMGKVAQQLGAGDYEKAGTFIGNELGQOTV -148
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
GVIGTHIQVFMQIMEGFQAKVITYDIFRNPELEKKGVYVDSLDDLVKQ -199
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
GVMGTOHIGQVAIKLFRGFGARVLAIDVYP-MKGDHPDFVVSLEDFKQ -197
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
ADVISLRVDFAM/IMINDESIAKMKQVIVIVN/SRGLVDTDAVIRGL -249
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SDVIDLHVPGIEQNTIINBAAFNLKMGAVIVINTARENLIDTQALSNL -247
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
DSGKIFGYAMQVYEGEVIQFNEDWEGEFPDARLADIARPNVLVTPHTA -299
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
KSGMLAGVQIDTYEYETEDLLNLAKHGSFDFPLWELGOMVWVLSPHIA -297
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
FYTHAVRNMVKAFFNNLELVEGKEATFV---KVG -333
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
YYETAVHRMVFESLQHLVDFLTKFKPARKLLVQVVN -335
  
```

Fig 1. Séquence de la D-LDH de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (1), comparée à celle de la D-HicDH de *Lactobacillus casei* (2). Les traits indiquent les résidus identiques ou fonctionnellement similaires. Les astérisques indiquent la signature du site de fixation du NADH.

L. casei (D-HicDH). La séquence complète de la protéine confirme bien ce point, comme le montre la figure 1.

La Hic-DH est une déshydrogénase NADH-dépendante qui catalyse la réduction de l' α -kéto-isocaproate en α -hydroxy-isocaproate. Comme pour le lactate, les stéréo-isomères L et D sont produits par des enzymes distinctes qui ont été étudiées en détail dans plusieurs espèces de bactéries lactiques : *L. casei* (Hummel *et al*, 1985), *L. curvatus* (Hummel *et al*, 1988) et *Enterococcus faecalis* (Yamazaki and Maeda, 1986) possèdent une D-HicDH, tandis que *L. confusus* (Schütte *et al*, 1984) possède une L-HicDH. Curieusement, cette activité enzymatique n'est observée, à notre connaissance, que dans le groupe des bactéries lactiques. A la différence des LDH, qui préfèrent nettement le pyruvate, les Hic-DH sont actives sur une très large gamme d' α -kéto-acides à chaîne aliphatique ou aromatique qu'elles préfèrent au pyruvate (Kallwass, 1992). Deux gènes de Hic-DH ont été récemment clonés : celui de la D-HicDH de *L. casei* (Lerch et

al, 1989a) auquel notre D-LDH est similaire, et celui de la L-HicDH de *L. confusus* (Lerch *et al*, 1989b) dont la séquence est totalement différente mais s'aligne très bien avec celles des L-LDH.

Ces données suggèrent l'existence chez les bactéries lactiques de 2 familles de déshydrogénases d' α -céto-acides NADH dépendantes totalement distinctes sur le plan structural, et donc très distantes sur le plan évolutif : l'une spécifique de l'énantiomère D de l' α -hydroxy-acide, l'autre de l'isomère L. Au sein de chaque famille, on distingue deux types d'enzymes caractérisées par leur profil d'activité au sein d'une large gamme de substrats : l'une, la LDH, produisant préférentiellement du lactate, l'autre, la Hic-DH, produisant préférentiellement des α -hydroxy-acides complexes (tel l'hydroxy-isocaproate).

Au départ, la famille D ne comportait que 2 membres : la D-HicDH de *L. casei* (Lerch *et al*, 1989a), et notre D-LDH (Bernard *et al*, 1991). Mais la famille va très vite s'agrandir. En 1991 le groupe d'Ohta au Japon publie la séquence de la D-LDH d'un *Lactobacillus* abusivement appelé *plantarum*, mais qui est en fait un *L. pentosus* (Taguchi and Ohta, 1991). Nous n'avons pas été surpris de constater que sa séquence s'alignait fort bien avec la nôtre. A la même période, le groupe de Hottinger à Lausanne clone également le gène de la D-LDH de *L. bulgaricus* (Kochhar *et al*, 1992). Nous avons pour notre part entrepris parallèlement au travail sur *L. bulgaricus*, le clonage de gènes de D- et L-LDH de *P. acidilactici* : le clone de D-LDH obtenu nous a bientôt fourni le 4^e membre de la famille, lui aussi étroitement apparenté (Garmyn *et al*, en préparation). La 5^e séquence, quant à elle, est celle de la D-HicDH de *L. bulgaricus* dont le gène a été cloné dans notre laboratoire en même temps que celui de la D-LDH (Bernard *et al*, en préparation). Pour mémoire, un se-

cond clone très faiblement producteur de lactate (clone 3) avait été obtenu lors du criblage initial en anaérobiose de la banque génomique de *L. bulgaricus* établie dans la souche FMJ 144. Il s'agissait en fait d'un gène de D-HicDH, ainsi qu'en témoigne son activité sur une très large gamme de substrats (Bernard *et al*, en préparation). Nous voilà donc bien en présence d'une nouvelle famille de LDH (au sens large) qui bien que catalysant une réaction rédox strictement identique à celle des L-LDH, se caractérise par une architecture conservée totalement différente.

Cette observation revêt un intérêt fondamental majeur. Nous voudrions en effet comprendre comment fonctionne la D-LDH : que sait-on des bases moléculaires de la stéréospécificité ? Le mécanisme catalytique est-il semblable à celui de la L-LDH ? Ces questions trouveront réponse grâce aux efforts conjoints des généticiens, des enzymologistes et des cristallographes. La comparaison des séquences au sein de la famille D révèle en effet la présence d'une série d'acides aminés totalement conservés qui, de ce fait, constituent des candidats d'intérêt majeur pour la recherche des résidus impliqués dans la catalyse. Les bases moléculaires du mécanisme rédox catalysé par la L-LDH sont bien connues, en particulier le rôle joué par le couple His 195-Asp 168 dans le mécanisme acide-base est amplement démontré (Clarke *et al*, 1989). Les résidus His et Asp invariants du gène de D-LDH de *L. bulgaricus* font actuellement dans notre laboratoire l'objet d'expériences de mutagenèse dirigée dans le but de savoir si le mécanisme rédox opérant au sein de la famille D repose sur les mêmes fondements moléculaires. Ces travaux vont de pair avec des mesures de diffraction RX actuellement en cours au Molecular Recognition Centre de l'Université de Bristol (UK), visant à établir la structure tri-dimensionnelle de l'enzyme.

REFERENCES

- Bernard N, Ferain T, Garmyn D, Hols P, Delcour J (1991) Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 290, 61-64
- Clarke AR, Atkinson T, Holbrook JJ (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part I. *Trends Biochem Sci* 14, 101-105
- Clarke AR, Colebrook S, Cortes A, Emery DC, Halsall DJ, Hart KW, Jackson RM, Wilks HM, Holbrook JJ (1991) Towards the construction of a universal NAD(P)⁺-dependent dehydrogenase: comparative and evolutionary considerations. *Biochem Soc Trans* 19, 576-581
- Garvie EI (1980) Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol Rev* 44, 106-139
- Holbrook JJ, Liljas A, Steindel SJ, Rossmann MJ (1975) Lactate dehydrogenase. In: *The enzymes* (Boyer PB, ed) 3 ed, vol 11 Academic Press, New York
- Hummel W, Schütte H, Kula MR (1985) D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. A new enzyme suitable for stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 21, 7-15
- Hummel W, Schütte H, Kula MR (1988) D-(-)-Mandelic acid dehydrogenase from *Lactobacillus curvatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 28, 433-439
- Kallwass HKW (1992) Potential of R-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* for stereospecific reductions. *Enzyme Microbiol Technol* 14, 28-35
- Kim SF, Baek SJ, Pack MY (1991) Cloning and nucleotide sequence of the *Lactobacillus casei* lactate dehydrogenase gene. *Appl Environ Microbiol* 57, 2413-2417
- Kochhar S, Hunziker PE, Leong-Morgenthaler P, Hottinger H (1992) Primary structure, physicochemical properties, and chemical modification of NAD⁺-dependent D-Lactate dehydrogenase. *J Biol Chem* 267, 8499-8513
- Lerch H-P, Blöcker H, Kallwass H, Hoppe J, Tsai H, Collins J (1989a) Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the

- D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase gene of *Lactobacillus casei*. *Gene* 78, 47-57
- Lerch H-P, Frank R, Collins J (1989b) Cloning, sequencing and expression of the L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase-encoding gene of *Lactobacillus confusus* in *Escherichia coli*. *Gene* 83, 263-270
- Long GL, Kaplan NO (1968) D-Lactate specific pyridine nucleotide lactate dehydrogenase in animals. *Science* 162, 685-686
- Mat-Jan F, Alam KY, Clark DP (1989) Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J Bacteriol* 171, 342-348
- Schütte H, Hummel W, M-R Kula (1984) L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase. A new enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 19, 167-176
- Taguchi H, Ohta T (1991) D-Lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. *J Biol Chem* 266, 12588-12594
- Yamazaki Y, Maeda H (1986) Enzymatic synthesis of optically pure (R)-(-)-mandelic acid and other 2-hydroxycarboxylic acids: screening for the enzyme, and its purification, characterization and use. *Agric Biol Chem* 50, 2621-2631