

SYNTHÈSE DU L-ALANINOL À PARTIR D'EXTRAITS ACELLULAIRES DE *MYCOBACTERIUM AVIUM*

M. BRUNETEAU et G. MICHEL

*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences de Lyon,
43 boulevard du 11 novembre 1918, 69-Villeurbanne, France*

Received 1 March 1971

A cell-free preparation was obtained from a culture of *Mycobacterium avium*. This preparation contained an L-alanine reductase which reduces L-alanine to L-alaninol, a constituent of the mycoside C₂. This reduction is better when ATP and NADH are present in the incubation medium.

1. Introduction

L'étude structural du mycoside C₂ de *Mycobacterium avium* [1] a montré l'existence d'une chaîne pentapeptidique liée à une molécule de L-alaninol [2]:

D-Phe-D-alloThr-D-Ala-D-alloThr-D-Ala-L-alaninol

L'addition au milieu de culture de L-aminoacides marqués à ¹⁴C a montré que les constituants de la chaîne peptidique étaient synthétisés à partir des L-aminoacides correspondants. C'est ainsi que L-Phe, L-Thr, L-Ala sont les précurseurs respectifs de D-Phe, D-alloThr, D-Ala, le L-alaninol provient également de la L-alanine [3].

La racémisation des L-aminoacides avant incorporation dans une chaîne peptidique est une réaction très générale dans la biosynthèse des antibiotiques et autres peptides naturels possédant des résidus de D-aminoacides [4]. La réduction d'un aminoacide en aminoalcool est un fait beaucoup plus rare. Nous avons étudié in vitro cette réaction à partir d'extraits acellulaires de *Mycobacterium avium*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Cultures

La souche 802 de *Mycobacterium avium* est cultivée sur milieu de Sauton à 37° pendant des temps variant de 10 à 20 jours. Les cellules bactériennes sont ré-

coltées par filtration, lavées à l'eau distillée et essorées. Ces opérations sont effectuées à basse température, entre 0 et 4°.

2.2. Préparation des extraits acellulaires

Trois méthodes ont été utilisées pour préparer les extraits acellulaires: l'ultrasonication, le broyage manuel avec l'alumine, le broyage avec le carborundum au moyen du broyeur M.S.K.

Action des ultra-sons. 15 g de cellules bactériennes mises en suspension dans 50 ml de tampon tris-HCl 0,01 M pH 7,7 contenant du mercaptoéthanol 1 mM et de l'acétate de magnésium 1 mM sont soumises pendant 20 min aux ultra-sons dans un appareil MSE 500 W. Les temps de sonication sont alternés avec les temps de repos afin de maintenir la température au voisinage de 0°. Les suspensions cellulaires sont centrifugées à 3000 g pendant 20 min. Le surnageant est à nouveau centrifugé deux fois à 12.000 g pendant 20 min à 0°. Le dernier surnageant fournit l'extrait acellulaire.

Broyage avec l'alumine. 10 g de bactéries sont broyées à 0° dans un mortier avec un poids égal d'alumine (Norton levigated alumina) pendant 20 min. Le mélange est alors mis en suspension dans 30 ml de tampon tris-HCl 0,01 M pH 7,7 contenant 600 µmoles d'acétate de magnésium et 600 µmoles de mercaptoéthanol. Après agitation pendant 5 min la suspension est centrifugée à 3000 g pendant 20 min pour séparer le résidu bactérien et l'alumine. Après une nouvelle centrifuga-

tion à 10.000 g pendant 1 h puis à 20.000 g pendant 45 min, le surnageant renferme les extraits acellulaires. La même opération a été effectuée en utilisant le tampon phosphate 0,01 M pH 7,4.

Utilisation du broyeur cellulaire MSK [5]. 3 g de bactéries lavées et essorées sont broyées avec 12 g de carborundum dans 6 ml de solution tampon à 0° pendant 8 min. Plusieurs tampons ont été utilisés: tampon phosphate, 0,1 M pH 6,5 ou 0,05 M pH 7,2 et tampon tris-HCl 0,02 M pH 7,5. Une première centrifugation est alors effectuée à 2000 g à 0° pendant 5 min. Le culot est lavé avec la même solution tampon et la suspension centrifugée dans les mêmes conditions. Les surnageants sont ensuite centrifugés à 20.000 g pendant 1 h à 0°. Les extraits acellulaires sont présents dans le dernier surnageant.

La teneur en protéines des différentes préparations est déterminée par la méthode de Lowry et al. [6]. La gamme étalon a été établie avec le sérum albumine bovine.

2.3. Incubations

Plusieurs milieux d'incubation ont été utilisés en vue d'étudier l'influence de composés variés sur la formation de L-alaninol. Le milieu qui a donné les meilleurs rendements a la composition suivante: CoA 0,6 μ mole, NADH 1,4 μ mole, NADPH 1,2 μ mole, ATP 5,4 μ moles, chlorure de magnésium 10 mmoles, mercaptoéthanol 10 mmoles, 14 C-L-alanine 20 nmoles (1 μ Ci). La préparation acellulaire correspond à une quantité de 5 à 10 mg de protéines. Le volume total est amené à 2 ml par une solution de tampon phosphate 0,1 M pH 6,5.

Des essais d'incubation ont été faits en présence de 5 mmoles de 2,4-dinitrophénylhydrazine.

Les incubations sont effectuées soit à 30°, soit à 37° pendant 2 h. La réaction est arrêtée par chauffage à 100° pendant 2 min, les protéines qui précipitent sont éliminées par centrifugation. Le surnageant est utilisé pour la recherche et l'identification de l'alaninol.

2.4. Isolement des produits de l'incubation

L'alaninol formé au cours de l'incubation est séparé de l'alanine résiduelle par passage sur Dowex 2 préalablement traité par une solution 2 N de soude décarbonatée puis lavé par l'eau exempte de CO₂ [7]. Il est élué par 30 ml d'eau distillée, l'éluat est analysé par chromato-

graphie sur papier dans le solvant butanol-acide acétique-eau (65:10:25). L'aminoolcool radioactif est détecté par autoradiographie. Il est obtenu par chromatographie préparative dans le même solvant.

Lorsque l'incubation est effectuée en présence de 2,4-dinitrophénylhydrazine les surnageants obtenus après précipitation et élimination des protéines sont extraits à l'eau et à l'éther. La dinitrophénylhydrazone est recherchée dans les extraits étherés. Ces derniers sont analysés par chromatographie sur plaque de gel de silice dans le solvant benzène-acétate d'éthyle (100:5). Le chromatogramme est découpé en bandes de 2 cm dont on mesure la radioactivité. Les extraits aqueux sont utilisés pour la recherche et l'identification de l'aminoolcool.

2.5. Techniques diverses

Pour l'étude de l'action de la phosphatase alcaline, le milieu réactionnel contient le substrat en solution dans 0,2 ml de tampon tris-HCl 1 M pH 8, 0,2 ml d'une solution de mercaptoéthanol 1×10^{-6} M, 1 mg de phosphatase alcaline. Le volume final est ajusté à 1 ml avec le tampon tris. Le mélange est incubé à 25° pendant 1 h. On arrête la réaction en ajoutant quelques gouttes de lessive de soude. Les mesures de radioactivité ont été réalisées dans un compteur à scintillation liquide Packard et Tricarb.

3. Résultats

Le rendement en protéines varie suivant la technique de préparation des extraits acellulaires. La méthode de broyage avec l'appareil MSK selon Sagniez et al. [5] donne les meilleurs résultats. La teneur en protéines de l'extrait exprimée en mg/g de bacilles secs se situe entre 50 et 100 mg alors qu'elle ne dépasse pas 10 à 20 mg avec les deux autres techniques.

3.1. Mise en évidence d'une L-alanine réductase dans les extraits acellulaires

Plusieurs essais d'incubation en présence de L-alanine- 14 C ont été effectués dans les conditions indiquées dans le tableau 1. Après incubation, l'alaninol est obtenu par passage sur Dowex 2 puis chromatographie sur papier. Les taches radioactives sont détectées par autoradiographie. La tache correspondant à l'alaninol est étudiée, après élution, par chromatographie dans

Tableau 1
Formation de L-alaninol à partir de préparation acellulaire de *Mycobacterium avium*.

Composition du milieu d'incubation	Essai								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tampon tris-HCl (200 μ moles)	+	+	+						
Tampon phosphate (200 μ moles)				+	+	+	+	+	+
KCl (10 μ moles)	+	+	+	+					
MgCl ₂ (20 μ moles)					+	+	+	+	+
Acétate de magnésium (20 μ moles)	+	+	+	+					
Mercaptoéthanol (20 μ moles)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phosphoénolpyruvate (5 μ moles)	+	+	+	+					
Pyruvate-kinase (20 μ g)	+	+	+	+					
Coenzyme A (0,6 μ mole)					+	+		+	+
ATP (5,4 μ moles)					+		+	+	+
NADH (en μ moles)				0,5	1,4	1,4	1,4	1,4	
NADPH (en μ moles)		0,5	1		1,2	1,2	1,2		1,2
Radioactivité de l'alaninol (cps/min)	170	360	500	1030	2140	1060	2600	2080	920

Chaque milieu d'incubation contient 5 à 15 mg de protéines acellulaires et 20 nmoles de ¹⁴C-L-alanine pour un volume final de 2 ml. La durée de l'incubation est de 2 h. Les essais 1, 2, 3, 4 ont été effectués à 37° et à pH 7,8; les essais 5, 6, 7, 8, 9 à 30° et à pH 6,5.

plusieurs solvants. Les R_f correspondent à ceux de l'alaninol témoin $R_f = 0,42$ dans isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1), $R_f = 0,22$ dans butanol-éthanol-eau (4:1:5). La radioactivité est ensuite déterminée. Le tableau 1 indique les résultats.

On constate que la réduction de la L-alanine par les extraits acellulaires est plus intense en présence d'ATP, le coenzyme A ne paraît pas indispensable. Il semble que les deux coenzymes NADH et NADPH puissent participer à la réduction, toutefois le rendement est supérieur en présence de NADH.

3.2. Mécanisme de la réaction

Après incubation en présence d'ATP et de coenzyme A, on observe par chromatographie une tache radioactive différente de l'alaninol, $R_f = 0,73$ dans le solvant butanol-acide acétique-eau (65:10:25), R_f de l'alaninol = 0,37. Le composé correspondant est séparé et préparé par chromatographie sur papier. Soumis à une hydrolyse alcaline avec une solution de soude 3,5 N pendant 3 h à température ordinaire, il redonne de l'alanine. Il est aussi hydrolysé par la phosphatase alcaline à pH 8; dans ces conditions, on obtient encore l'acide libre. Il s'agit par conséquent d'un dérivé phosphorylé de l'alanine qui est vraisemblablement un intermédiaire dans la réduction.

Nous avons aussi recherché si la formation in

vitro de l'alaninol faisait intervenir l'aldéhyde correspondant à l'alanine puisque chez les microorganismes les composés aldéhydiques sont parfois des intermédiaires dans des réactions de réduction. Ainsi chez *Euglena gracilis* Kolattukudy [8] a montré que la réduction in vitro de l'acide palmitique conduit au palmitaldéhyde. Chez *Clostridium acetobutylicum* la formation de butanol à partir de l'acide butyrique s'effectue par l'intermédiaire du butyraldéhyde en faisant intervenir successivement une aldéhyde-oxydo-réductase et une alcool-oxydo-réductase [9,10]. Afin de vérifier s'il se forme un composé aldéhydique libre nous avons effectué plusieurs incubations en présence de 2,4-dinitrophénylhydrazine, dans aucun cas nous n'avons pu identifier la 2,4-dinitrophénylhydrazone correspondant à l'aldéhyde alors qu'il y avait bien formation d'aldéhyde dans le milieu réactionnel. Ces résultats n'excluent pas la formation d'une aldéhyde intermédiaire mais celui-ci n'existe pas à l'état libre. Il est possible qu'une étape intermédiaire entre l'acide et l'aldéhyde-alcool fasse intervenir un complexe aldéhyde-enzyme du même type que celui proposé par Knappe et al. [11] lors de la réduction du β -hydroxy- β -méthylglutaryl CoA en acide mévalonique.

Dans la dernière étape il y aurait réduction de ce complexe en alaninol.

Références

- [1] M. Chaput, G. Michel et E. Lederer, *Biochim. Biophys. Acta* 78 (1963) 329.
- [2] M. Bruneteau, G. Michel et R. Guilluy, *Compt. Rend. Acad. Sci.* 267 (1968) 745.
- [3] A. Martin, M. Bruneteau et G. Michel, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 51 (1969) 1231.
- [4] M. Bodanszky et D. Perlman, *Nature* 218 (1968) 291.
- [5] G. Sagniez, M. Lecam, Y. Madec et S. Bernard, *Ann. Inst. Pasteur* 117 (1969) 663.
- [6] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr et R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.
- [7] A.C. Chibnall et M.W. Rees, *Biochem. J.* 68 (1958) 105.
- [8] P.E. Kolattukudy, *Biochemistry* 9 (1970) 1095.
- [9] H. Petitdemange, J. Desbordes, J. Berthelin et R. Gay, *Compt. Rend. Acad. Sci.* 266 (1968) 1772.
- [10] H. Petitdemange, J. Desbordes, M. Maugras et R. Gay, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 51 (1969) 157.
- [11] J. Knappe, E. Ringelmann et F. Lynen, *Biochem. Z.* 332 (1959) 195.