

Caractérisation génétique et biochimique du système de racémisation du lactate chez *Lactobacillus plantarum*

Benoît Desguin

Juillet 2013

Thèse présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en sciences

Groupe de Biochimie et Génétique Moléculaire Bactérienne - BGMB
Institut des Sciences de la Vie - ISV
Secteur des Sciences et Technologies - SST
Université catholique de Louvain - UCL

Composition du jury

Prof. Philippe Van Den Bosch (Président de jury)

Université catholique de Louvain, Belgique

Prof. Pascal Hols (promoteur)

Université catholique de Louvain, Belgique

Prof. Patrice Soumilion (co-promoteur)

Université catholique de Louvain, Belgique

Prof. Johan Wouters

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Belgique

Prof. Pierre Cornelis

Vrije Universiteit Brussel, Belgique

Prof. Jean-François Collet

Université catholique de Louvain, Belgique

Prof. François Chaumont

Université catholique de Louvain, Belgique

Résumé de la thèse

Le lactate est un composé omniprésent dans la nature, où il est impliqué dans le métabolisme énergétique de nombreux procaryotes, tant comme produit de fermentation que comme source de carbone et/ou d'électrons. La lactate racémase est une enzyme convertissant le D- ou le L-lactate en un mélange de racémique de DL-lactate. Cette réaction enzymatique méconnue permet aux procaryotes d'utiliser ou de produire les deux isomères du lactate.

Le locus responsable de cette activité enzymatique chez *Lactobacillus plantarum* a été identifié par notre laboratoire. Ce locus, appelé *lar*, est organisé en deux opérons (*larR(MN)OQ* et *larABCDE*).

Lors de cette thèse, nous avons montré que LarA racémise le lactate en utilisant du nickel comme cofacteur, élargissant ainsi la famille des enzymes à nickel à neuf membres. Nous avons purifié LarA, étudié ses paramètres cinétiques et identifié plusieurs inhibiteurs compétitifs. Nous avons également résolu sa structure 3D, qui montre un nouveau repliement de type α/β . Sur base de nos résultats et de données antérieures, nous avons émis l'hypothèse d'un transfert d'hydrure sur le nickel comme mécanisme catalytique probable. Nous avons montré que l'activation de LarA nécessitait trois protéines accessoires : LarB, LarC et LarE. Nous avons établi le rôle central que joue LarE dans le processus d'activation, qui implique le transfert du nickel de LarC vers LarE et finalement vers LarA. Nous avons caractérisé l'aquaglycéroporine LarD, qui permet l'échange rapide d'acide lactique avec le milieu, une nouvelle fonction pour les aquaglycéroporines bactériennes. Nous avons également investigué le régulateur transcriptionnel LarR, responsable de la régulation du locus *lar* en fonction du ratio L-/D-lactate.

Finalement, une analyse bioinformatique a montré la présence de protéines impliquées dans la racémisation du lactate dans près d'un quart des génomes procaryotiques, illustrant par là l'importance de cette réaction enzymatique dans le monde microbien.

Remerciements

Tout a commencé lors de l'exhumation par Pascal Hols d'un ancien projet enfoui au fond d'un tiroir de son bureau. Il était question d'un mystérieux opéron, découvert par Philippe Goffin, qui serait à l'origine d'une obscure réaction enzymatique, la racémisation du lactate. En outre, des recherches menées au laboratoire semblaient indiquer qu'il se cacherait au sein de cette énigmatique protéine un métal rare, le nickel.

Ne connaissant pas grand chose en bactéries lactiques et encore moins en métalloprotéines, je décidai néanmoins de tenter ma chance auprès du Fond National de la Recherche Scientifique, afin de décrocher une bourse de doctorat pour 4 ans. Ayant obtenu ma bourse de doctorat et avec l'aide du Prof. Pascal Hols comme promoteur et du Prof. Patrice Soumilion comme co-promoteur, je me lançai donc à la recherche de cette mystérieuse enzyme, qui s'avéra être une véritable chasse au trésor.

Ma première rencontre fut avec l'équipage du laboratoire : Brigitte Delplace qui m'apprit les arcanes du fonctionnement du laboratoire, Eric Viane avec qui je découvris les secrets de la racémisation du lactate et les joies du travail avec *Plantarus*. Dans les couloirs du laboratoire erraient également Prof. Bernard Hallet, jamais avare en conseils et recommandations, Damien Dandoy, spécialiste des nœuds dans l'ADN, Emilien Nicolas, se démenant avec Deborah Prozzi afin de purifier la transposase, Laetitia Fontaine, dont les compétences s'étendent bien au delà de son domaine de prédilection, Céline Boutry, discrète et consciencieuse, Marie Deghorain, souriante, Liliane Demuylder, sans qui nous serions tous au chômage technique, et bien d'autres encore.

Je me retrouvai vite assis à une paillasse, apprenant à me servir d'une pipette, instrument indispensable à la survie en milieu scientifique. Près de moi, d'autres thésards se battaient avec leurs sujets de thèse : Blandine David, en chantant, Thomas Rolain, maître du knockout, et Elvis Bernard, me conseillant de « mettre le roi ».

Je fus heureusement épaulé par de vaillants moussaillons, qui attaquèrent le sujet de la régulation de l'opéron *lar* avec vigueur : Nordine Bakouche, parti en éclaireur, apprivoisa le régulateur LarR et Aurélie Diman m'aïda à percer le secret de la Lar-box.

Les défenses de thèse et les naissances rythmèrent la vie à bord du plateau : celle de Michael Lambin, suivie par celle de Damien Dandoy et d'Emilien Nicolas, entrecoupées des naissances de Robin, d'Arthur, de Briec et d'Alice. Un peu plus tard, les thèses de d'Elvis Bernard, de Blandine David, de Céline Boutry, de Thomas Rolain et le mienne vinrent compléter le tableau.

Entretemps, d'autres recrues rejoignirent la barque : Wendy Glenisson, s'attaquant à la transformation de souches bactériennes dont-on-ne-doit-pas-prononcer-le-nom avec son armée de stagiaires, Astrid Wahl, venue d'Outre-Rhin en passant pas Marseille, Cédric Oger, avec qui j'ai partagé un peu de radioactivité, Marie-Clémence Duchêne, qui a repris le flambeau de Thomas, Gêrôme Goossens, notre nouvel assistant, et Laurie Haustenne, la fée de l'informatique. Sans oublier l'équipe succinate : Geneviève Deschuyteneer, Marie Henry de Frahan et Benjamin Michiels, le dompteur du chromatographe haute pression.

Une fois toutes les bactéries transformées, broyées ou congelées, vint enfin le temps de prendre un peu de repos. Les séances de badminton avec Nicolas Jacquet, Nathan Nguyen ou Cédric Oger permirent de s'adonner à un autre sport que le pipetage. Les petits verres du vendredi permirent de détendre l'atmosphère et d'avoir d'intéressantes discussions avec Philippe Goffin. Les fameux barbecues chez Pascal Hols, au bord de sa piscine, ou la dernière sortie en skis de fond avec Bernard Hallet, permirent de décrocher un peu du train-train quotidien. De plus, lors de divers congrès et autres séminaires, nous avons eu l'occasion de prendre le large à Middelburg, de goûter à la gastronomie Toulousaine ou encore de bronzer au bord des plages Méditerranéennes.

Mais l'appel de nouveaux horizons me poussa à chercher plus loin que la Place Croix du Sud. Lors d'un bref passage chez les chimistes, dans l'antre du Prof. István Markó, j'ai pu m'essayer à quelques techniques de synthèse avec l'aide de Fabio Lucaccioni. Une excursion dans la principauté de Liège, chez Gabriel Mazzuchelli, m'a permis de mieux cerner la masse de LarA et de ses protéines accessoires. Une collaboration fructueuse avec le Prof. François Chaumont et Patrick Bienert m'a ouvert les portes d'étranges aquaglycéroporines transportant de l'acide lactique. Lors d'une aventure sur les plages californienne, j'ai également pu nouer quelques contacts outre-Atlantique, avec le Prof. Michael Maroney, notamment. Grâce à lui et aux rayons X de Vlad Martin-Diaconescu, nous avons pu en savoir plus sur le nickel enfoui au sein de LarA. D'autres essais s'avérèrent par contre être des impasses, mais il ne faudrait pas oublier le temps qu'ont donné le Prof. Giulio Muccioli, le Prof. Erik Goormaghtigh et Cécile le Duff à tenter de percer le mystère du cofacteur manquant.

Toute cette aventure n'aurait cependant pas pu être possible sans le soutien des meilleurs colocataires du monde, les lapins du Clapier, et de mes amis proches. Les soirées en terrasse à refaire le monde, les weekends dans le jardin et dans la piscine, les balades, les festivals et les assiettes garnies qui nous attendent quand on rentre tard le soir à la maison, tout cela m'a motivé à continuer à avancer et à chercher, chaque jour. Je pense en particulier à ma colocataire préférée, Gaëlle, qui m'a soutenu durant toutes ces années et qui n'hésitait pas à me rappeler de rentrer à la maison quand j'avais tendance à travailler tard le soir.

Je voudrais terminer par une pensée pour ma famille et en particulier à mes parents, qui ont fait l'effort de retenir le sujet de ma thèse afin de pouvoir l'expliquer à d'autres, qui, s'ils avaient bien compris, pensaient que je travaillais sur les plastiques biodégradables. Je dois avouer que, à défaut de comprendre la biologie moléculaire, ils m'ont toujours soutenu dans mes choix et qu'ils étaient toujours là quand j'avais besoin d'eux.

Finalement, je voudrais également remercier tous ceux qui ont participé à la relecture et à la correction de ma thèse : Pascal Hols et Patrice Soumilion, évidemment, mais également le Prof. Philippe Van Den Bosch, le Prof. Johan Wouters, le Prof. Pierre Cornelis, le Prof. Jean-François Collet et le Prof. François Chaumont, pour leur temps consacré et pour leurs remarques pertinentes.

Au bout de presque 5 années de recherche, on peut dire que le trésor aura été à la hauteur de nos attentes. La caractérisation de LarA, LarB, LarC, LarD, LarE et LarR sont autant de pierres précieuses qui composent ma thèse. Même si le plus important n'est pas tant les résultats obtenus, mais surtout l'expérience acquise et les liens tissés durant ce temps, cela permet néanmoins de se dire qu'il en restera toujours une trace quelque part. Pourtant, cela me laisse encore un goût de trop peu, une envie de repartir à l'aventure vers des rivages inconnus, afin de découvrir de nouveaux trésors.

Abréviations et symboles

# aa	Nombre d'acides aminés
<i>A.</i>	<i>Archeoglobus</i>
<i>Aa.</i>	<i>Arabidopsis</i>
ABC	“ATP-binding cassette”
ACS	Acétyl-coenzyme A synthase
ACDS	Acétyl-coenzyme A décarbonylase/synthase
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AQP	Aquaporine
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
ARD	Aciréductone dioxygénase
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARNP	ARN polymérase
Asp	Aspartate
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
cAMP	Adénosine 5'-monophosphate cyclique
<i>Co.</i>	<i>Corynebacterium</i>
CoA	Coenzyme A
CODH	Monoxyde de carbone déshydrogénase
<i>D.</i>	<i>Desulfovibrio</i>
Da	Dalton (unité de masse atomique)
DNase I	Désoxyribonucléase I
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EC	Enzyme Commission
<i>En.</i>	<i>Enterococcus</i>
ESI-TOF	Spectrométrie de masse utilisant une ionisation par électronébuliseur ou ESI et un analyseur à temps de vol ou TOF
EXAFS	“Extended X-Ray Absorption Fine Structure”
FAD	Falavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide

<i>G.</i>	<i>Geobacter</i>
GLP	Aquaglycéroporine
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
Gus	β -Glucuronidase
<i>H.</i>	<i>Haloarcula</i>
<i>He.</i>	<i>Helicobacter</i>
Hicdh	Réductase NAD-dépendantes à large spectre
His	Histidine
<i>Hx.</i>	<i>Haloferax</i>
<i>K.</i>	<i>Klebsiella</i>
K_m	Constante de Michaelis
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
Lar	Lactate racémase
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
Ldh	Lactate déshydrogénase
<i>Le.</i>	<i>Leuconostoc</i>
Lys	Lysine
LS	“Large subunit”
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NTP	Nucléotide 5'-triphosphate
<i>M.</i>	<i>Megasphaera</i>
<i>My.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MCR	Méthyle-coenzyme M réductase
MFS	“Major Facilitator Protein”
MIC	“Minimal Inhibitory Concentration”
MIP	“Major Intrinsic Protein”
<i>O.</i>	<i>Oenococcus</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PDB	“Protein Data Bank”
pH	Potentiel d'hydrogène
pKa	Constante d'acidité
PLA	Polylactate
PLP	Pyridoxal 5'-phosphate
PP	Pyrophosphate
Redox	Oxydoréduction
RND	“heavy metal Resistance-Nodulation-Division”

<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Sa.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SAM	S-adénosylméthionine
SCOP	“Structural Classification Of Proteins”
<i>Se.</i>	<i>Selenomonas</i>
<i>Sh.</i>	<i>Shewanella</i>
SOD	Superoxyde dismutase
<i>St.</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Sm.</i>	<i>Streptomyces</i>
TMD	Triméthylamine déshydrogénase
XANES	“X-ray Absorption Near Edge Structure”

Table des matières

I.	Introduction.....	1
	Avant-propos.....	3
I.1.	Première partie : le lactate, un déchet métabolique ?	7
I.1.1.	Généralités.....	7
I.1.2.	La production d'acide lactique par fermentation.....	7
I.1.3.	L'utilisation du lactate par les bactéries.....	12
I.1.3.1.	Généralités.....	12
I.1.3.2.	Utilisation du lactate comme source d'électrons.....	13
	I.1.3.2.1. Utilisation en aérobie	13
	I.1.3.2.2. Utilisation en anaérobie en présence d'accepteurs d'électrons externes	14
	I.1.3.2.3. Utilisation en anaérobie en absence d'accepteurs d'électrons externes	17
I.1.3.3.	Autres utilisations du lactate.....	18
	I.1.3.3.1. Incorporation dans le peptidoglycane.....	18
	I.1.3.3.2. Consommation d'O ₂ et production de H ₂ O ₂	20
	I.1.3.3.3. Synthèse du cofacteur F ₄₂₀	21
I.1.4.	Le transport d'acide lactique.....	22
I.1.5.	Les aquaglycéroporines.....	26
I.1.6.	Régulation lactate-dépendante	27
I.1.7.	Conclusion	30
I.2.	Deuxième partie : les racémases et la racémisation.....	33
I.2.1.	Généralités.....	33
I.2.2.	Les racémases à acide aminés.....	34
	I.2.2.1. Les racémase PLP-dépendantes	35
	I.2.2.2. Les racémases PLP-indépendantes	38
I.2.3.	Les racémases à α-hydroxyacides.....	41
	I.2.3.1. La mandélate racémase	41

I.2.3.2.	La lactate racémase.....	44
I.2.4.	Les lactate déshydrogénases.....	48
I.2.5.	Conclusion : mécanismes de racémisation.....	50
I.3.	Troisième partie : le nickel et les enzymes à nickel.....	53
I.3.1.	Généralités.....	53
I.3.1.1.	Le nickel dans la cellule	53
I.3.1.2.	L'import du nickel	56
I.3.1.3.	L'homéostasie du nickel	58
I.3.1.4.	La régulation Ni-dépendante	60
I.3.2.	La spécificité pour le nickel.....	62
I.3.3.	Les enzymes à nickel.....	66
I.3.3.1.	Introduction.....	66
I.3.3.2.	Les [NiFe]-Hydrogénases	66
I.3.3.2.1.	Activité des [NiFe]-hydrogénases	66
I.3.3.2.2.	Maturation des [NiFe]-hydrogénases	69
I.3.3.3.	Les [FeFe]-hydrogénases	69
I.3.3.4.	L'uréase	71
I.3.3.4.1.	Activité de l'uréase.....	71
I.3.3.4.2.	Maturation de l'uréase.....	73
I.3.3.5.	La méthyle-coenzyme M réductase	74
I.3.3.6.	Les CO-déshydrogénase et acétyl-CoA synthase....	76
I.3.3.6.1.	Activité des enzymes.....	76
I.3.3.6.2.	Activation des enzymes.....	79
I.3.3.7.	La superoxyde dismutase	80
I.3.3.8.	La glyoxalase I.....	81
I.3.3.9.	L'aciréductone dioxygénase	83
I.3.4.	Conclusion : pourquoi le nickel ?	85
I.4.	Quatrième partie : les régulateurs transcriptionnels de la famille Crp-Fnr	87

I.4.1.	Généralités.....	87
I.4.1.1.	Diversité des régulateurs de la famille Crp-Fnr.....	87
I.4.1.2.	Structure des régulateurs de la famille Crp-Fnr.....	88
I.4.1.3.	Modes de régulation du régulateur Crp	90
I.4.2.	Le groupe PrfA.....	91
I.4.2.1.	PrfA	91
I.4.2.2.	Srv et Ers	92
I.4.2.3.	RcfB.....	92
I.4.2.4.	Fnr _{Bac}	92
II.	Objectifs.....	95
III.	Résultats.....	99
III.1.	Première partie : l'opéron <i>larA-E</i>	101
III.2.	Deuxième partie : l'aquaglycéroporine LarD	161
III.3.	Troisième partie : le régulateur LarR.....	205
IV.	Discussion	249
IV.1.	La racémisation du lactate, un mécanisme original.....	251
IV.1.1.	Introduction.....	251
IV.1.2.	Mécanisme catalytique par abstraction de proton.....	251
IV.1.3.	Mécanisme catalytique par transfert d'hydrure.....	258
IV.1.4.	Inactivation de la lactate racémase	260
IV.1.5.	Présence d'un deuxième cofacteur	262
IV.1.6.	Structure de la lactate racémase.....	267
IV.2.	Les protéines accessoires	268
IV.2.1.	Activation de LarA	268
IV.2.1.1.	Rôle de LarB.....	269
IV.2.1.2.	Rôle de LarC	269
IV.2.1.3.	Rôle de LarE.....	271
IV.2.1.4.	Mécanisme d'activation de LarA	272
IV.2.2.	Comparaison avec d'autres systèmes d'activation	276

IV.2.3.	Autres fonctions des protéines accessoires.....	277
IV.3.	A quoi sert la racémisation du lactate ?.....	278
IV.3.1.	Chez les bactéries lactiques	278
IV.3.2.	Chez les autres procaryotes.....	281
IV.4.	LarD et le transport de l'acide lactique	284
IV.4.1.	Les différentes aquaglycéroporines de <i>L. plantarum</i> .	284
IV.4.2.	Rôle du transport d'acide lactique chez <i>L. plantarum</i>	285
IV.4.3.	La spécificité pour le lactate.....	287
IV.5.	La régulation par LarR.....	288
IV.5.1.	Le mécanisme de régulation par LarR	288
IV.5.2.	Le rôle de LarR dans la racémisation du lactate	291
IV.6.	Neuf gènes pour une seule fonction ?	292
V.	Conclusions et perspectives.....	297
VI.	Références bibliographiques.....	301

I. Introduction

Avant-propos

Depuis la découverte de la racémisation enzymatique du lactate en 1936 (1), la lactate racémase est restée hors de portée d'une étude biochimique détaillée, au point que certains auteurs vinrent à douter de l'existence même de cette enzyme (2, 3). Les lactates racémases de *Lactobacillus sakei* et *Clostridium beijerinckii* ont pourtant été partiellement purifiées et caractérisées (4, 5), mais la forte sensibilité de la lactate racémase à l'oxydation n'a pas permis d'étudier ces enzymes en détail. Plusieurs questions sont donc restées sans réponses, notamment la question du cofacteur de l'enzyme, la question des déterminants génétiques ainsi que la question de la structure tridimensionnelle de l'enzyme.

Une première piste menant aux déterminants génétiques de la lactate racémase a été mise en évidence chez *L. plantarum* avec la découverte de l'opéron lactate racémase (*lar*), qui a été montré comme étant impliqué dans la racémisation du lactate chez cette espèce (6). Plus tard, une analyse transcriptomique plus détaillée a révélé qu'un deuxième opéron, situé juste en amont et en orientation inverse de l'opéron *lar*, était aussi impliqué dans la racémisation du lactate. Ces deux opérons forment ensemble le locus *lar*, dont la description détaillée est présentée à la Table 1.

La présence d'un transporteur de type NikMNQO est souvent corrélée à la présence de gènes de l'uréase ou de la [NiFe]-hydrogénase, deux enzymes utilisant le nickel comme cofacteur. Pourtant, aucune protéine à nickel connue n'est présente chez *L. plantarum* (7). De plus, la présence d'une région riche en histidines dans la séquence de LarC1 rappelle la séquence C-terminale des métallochaperones de l'uréase et de la [NiFe]-hydrogénase, qui possèdent toutes deux de nombreuses histidines et stockent plusieurs ions nickel. De même, la présence d'une protéine hydrolysant l'ATP rappelle les protéines accessoires de l'uréase et de la [NiFe]-hydrogénase, qui participent à l'incorporation du nickel dans le site actif en hydrolysant le GTP (8). Ces ressemblances ne se traduisent pas au niveau des séquences protéiques, qui ne sont pas homologues, mais elles indiquent que le nickel pourrait être impliqué dans l'activité de racémisation du lactate et qu'un système d'incorporation du nickel par des protéines accessoires pourrait être impliqué également, comme c'est le cas pour l'uréase et la [NiFe]-hydrogénase. Dans les précédentes études sur la lactate racémase, le nickel n'avait jamais été envisagé comme cofacteur. Et pourtant, comme nous le

verrons plus loin, le nickel semble justement être la clé de l'activité lactate racémase. Mais afin de pouvoir comprendre en détail pourquoi et comment le nickel serait impliqué dans la racémisation du lactate, il convient de revoir le cadre dans lequel s'effectue cette étude.

Dans la première partie de cette introduction, il sera donc question de lactate en général, de la production de lactate, de sa consommation et de son transport. L'accent sera principalement mis sur les types de métabolismes qui produisent ou consomment du lactate chez les procaryotes et sur l'énergie que retirent les microorganismes de ces réactions. Le transport d'acide lactique et la régulation par le lactate seront ensuite abordés, dans cette même optique. Une parenthèse sera ouverte sur les aquaglycéroporines, qui pourraient avoir un lien avec le transport d'acide lactique, vu qu'un gène d'aquaglycéroporine se retrouve dans l'opéron *lar* de *L. plantarum*. Diveres utilisations non-liées au métabolisme énergétique du lactate et qui semblent peut-être anecdotiques à première vue, seront également abordées. Comme le lactate est une molécule chirale, il possède deux isomères : le L- et le D-lactate. Dans le cas où les deux isomères sont concernés on utilisera le terme général lactate, incluant les deux isomères du lactate. Dans le cas où un seul isomère du lactate est concerné, on précisera s'il est question de L- ou le D-lactate.

Table 1. Les gènes du locus *lar*

Gène	Produit	# aa	Poids (kDa)	pI	Homologie	Fonction
<i>larR-O operon</i>						
<i>lp_0100</i>	LarO	243	26,5	5,4	Sous-unité O liant l'ATP d'un transporteur ABC de type NikMNQO	Ce type de transporteur ABC est impliqué dans le transport de cobalt ou de nickel. Sa fonction est inconnue chez <i>L. plantarum</i> (7).
<i>lp_0101</i>	LarQ	264	30,3	10,8	Sous-unité Q membranaire d'un transporteur ABC de type NikMNQO	
<i>lp_0102</i>	LarM N	309	33,2	9,1	Sous-unité MN membranaire d'un transporteur ABC de type NikMNQO	
<i>lp_0103</i>	LarR	221	25,7	9,2	Régulateur transcriptionnel de la famille Crp/Fnr.	Appartient au groupe PrfA au sein de la famille Crp/Fnr.

<i>larA-E operon</i>						
<i>lp_0104</i>	LarA	424	46,2	5,5	Similaire au groupe des protéines conservées non caractérisées COG3875	Fonction inconnue
<i>lp_0105</i>	LarB	246	25,5	5,6	Partie C-terminale similaire à la N ₅ -carboxyaminoimidazole ribonucléotide mutase PurE (9). Similaire au groupe de protéines conservées non caractérisées COG1691.	Fonction inconnue
<i>lp_0106</i>	LarC 1	263	28,7	5,5	Similaire à la partie N-terminale du groupe de protéines conservées non caractérisées COG1641	Contient une zone centrale avec de nombreuses histidines (9 résidus His parmi 14 résidus).
<i>lp_0107</i>	LarC 2	158	17,9	4,9	Similaire à la partie C-terminale du groupe de protéines conservées non caractérisées COG1641	A la fin de <i>lp_0106</i> , un décalage programmé du cadre de lecture permettrait la synthèse de la protéine fusion LarC1C2 (10).
<i>lp_0108</i>	GlpF 1 (LarD)	238	25,4	7,3	Protéine de transport de la famille des aquaglycéroporines.	Transport à travers la membrane de petites molécules non-chargées.
<i>lp_0109</i>	LarE	276	30,5	5,9	Similaire aux protéines utilisatrices d'ATP de la superfamille des PP-loop (11). Similaire au groupe de protéines conservées non caractérisées COG1606.	Hydrolyse l'ATP en AMP et pyrophosphate. Fonction inconnue.

Dans la deuxième partie de cette introduction, il sera question de racémases et de racémisation. Parmi les racémases à acides aminés, l'alanine racémase illustrera le mécanisme catalytique des racémases à pyridoxal 5'-phosphate (PLP) et la glutamate racémase illustrera le mécanisme catalytique des racémases PLP-indépendantes. Ensuite, les deux α -hydroxyacide racémases connues, la mandélate racémase et la lactate racémase, seront abordées. Pour terminer, on résumera le débat autour du mécanisme catalytique des Ldh NAD-indépendantes, qui oxydent le lactate en pyruvate. Le but de cette partie sera de synthétiser les différents mécanismes catalytiques utilisés par les différentes racémases et par une enzyme oxydant le lactate afin de voir quels mécanismes peuvent être envisagés dans le cadre de la racémisation du lactate.

Lors de la troisième partie, il sera question du nickel chez les procaryotes. La présence et l'utilisation du nickel sera tout d'abord abordée au niveau de la cellule avec le transport de nickel, la régulation Ni-dépendante et l'homéostasie du nickel. Ensuite, il sera question de la manière dont les enzymes Ni-dépendantes parviennent à reconnaître et à lier spécifiquement le nickel parmi d'autres ions métalliques présents dans le milieu. Finalement, les huit enzymes à nickel connues seront décrites plus en détail, en mettant l'accent sur le rôle du nickel dans la catalyse et sur le mécanisme d'assemblage de leur site catalytique, s'il est connu. Une parenthèse sur les [FeFe]-hydrogénases sera ouverte afin de comparer le mécanisme d'assemblage du noyau FeFe aux mécanismes d'assemblage des centres métalliques contenant du nickel. Le but de cette partie sera de donner un aperçu des systèmes connus d'obtention et d'insertion du nickel dans les enzymes Ni-dépendantes et de montrer les potentialités offertes par le nickel en termes de catalyse enzymatique.

La quatrième partie, plus brève, sera consacrée à la régulation par les régulateurs de la famille Crp/Fnr et plus précisément par le groupe PrfA au sein de cette famille. La présence d'un régulateur de ce groupe dans le locus *lar* de *L. plantarum* indique sa probable implication dans la régulation de l'activité lactate racémase. Comme la régulation de l'activité lactate racémase est indissociable de sa fonction, il est important de montrer comment ce type de régulateur fonctionne généralement.

I.1. Première partie : le lactate, un déchet métabolique ?

I.1.1. Généralités

Le lactate, ou sa forme protonée l'acide lactique, est un composé omniprésent dans la nature, en effet de même que l'oxygène est l'élément fondamental de la respiration aérobie, le lactate est le produit fondamental de la fermentation anaérobie. Il a été purifié et caractérisé la première fois par le chimiste Suédois Scheele en 1780 (12). Le nom lactate provient du nom latin pour lait (lac) car lorsque le lait caille naturellement, le lactose est essentiellement transformé en lactate par les bactéries (3). L'acide lactique possède de nombreuses applications dans le secteur alimentaire, comme agent préservant ou comme régulateur de pH. Il est utilisé dans l'industrie pharmaceutique et chimique comme solvant ou matériau de base dans la synthèse de nombreux composés. En effet, grâce au fait que l'acide lactique possède une fonction carboxylique ainsi qu'une fonction alcool, il peut être transformé en de nombreux produits chimiques utiles comme l'acide pyruvique, l'acide acrylique, le 1,2-propanediol ou encore l'ester de lactate (13). Il est également utilisé comme agent actif dans les produits de soin pour son pouvoir hydratant, sa capacité de régulation du pH et comme éclaircissant pour la peau. Mais le secteur où la demande en acide lactique montre une croissance la plus forte est le secteur des polymères biodégradables. En effet, les polylactates (PLA) peuvent convenir à de nombreuses applications, notamment pour les emballages alimentaires, les textiles ou encore comme composant de matériaux composites. En fonction de la proportion des deux énantiomères D ou L de l'acide lactique, les PLAs montrent des propriétés physiques différentes qui peuvent être modulées en fonction de l'application désirée (14). Ce secteur montre une croissance de 22% par an et pousse la demande en acide lactique. La production actuelle d'acide lactique dépasse les 300 000 tonnes par an et atteindra environ 360 000 tonnes en 2017 (15, 16).

I.1.2. La production d'acide lactique par fermentation

Deux voies de synthèse permettent de produire de l'acide lactique à des fins technologiques. La première est la synthèse chimique qui consiste à

hydrolyser du lactonitrile avec un acide fort, ce qui produit un mélange racémique d'acide lactique. La seconde est la fermentation bactérienne, qui permet la production d'acide lactique à partir de substrats bon marché, produit moins de déchets et est moins énergivore que la production chimique (Fig. 1). De plus, la fermentation bactérienne permet la production d'acide lactique optiquement pur. Etant donné l'importance d'obtenir l'un ou l'autre isomère d'acide lactique pour l'industrie, de nombreuses études ont été consacrées au développement de techniques permettant la production biotechnologique d'acide lactique optiquement pur. Plusieurs obstacles restent encore à surmonter afin de rendre la production biotechnologique plus compétitive : notamment la possibilité d'utiliser des matériaux bruts comme substrats de fermentation, la fermentation à plus haute température afin d'éviter la stérilisation et la purification de l'acide lactique produit (13).

La fermentation lactique est principalement réalisée par les bactéries lactiques, qui sont des bactéries à Gram positif, non sporulantes, microaérophiles et qui fermentent les glucides principalement en lactate. Le terme bactérie lactique englobe la famille *Lactobacillaceae* (genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*), la famille *Leuconostocaceae* (genres *Oenococcus* et *Leuconostoc*), la famille *Enterococcaceae* (genre *Enterococcus*) et la famille *Streptococcaceae* (genres *Lactococcus* et *Streptococcus*) (17). Mais la fermentation lactique n'est pas l'apanage des bactéries lactiques, d'autres bactéries produisent de l'acide lactique en condition d'anaérobiose, comme *Escherichia coli*, *Bifidobacterium bifidus*, plusieurs espèces d'entérobactéries et de *Staphylococcus* et même des cyanobactéries (3, 18).

La fermentation lactique produit du lactate à partir du pyruvate, lui-même étant produit par dégradation des sucres. En effet, la glycolyse convertit les sucres en pyruvate, en libérant de l'énergie sous forme d'ATP et des électrons sous forme de NADH. Afin de régénérer le NAD^+ , la bactérie doit trouver un accepteur final d'électron. Dans le cas du métabolisme aérobie, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène moléculaire, qui est ainsi transformé en eau. Mais dans le cas de la fermentation anaérobie, c'est le produit de la glycolyse, le pyruvate, qui est directement réduit par les lactates déshydrogénases NAD-dépendantes (Ldh) en lactate. Ces enzymes sont stéréospécifiques : la L-lactate déshydrogénase (L-Ldh) catalyse la formation de L-lactate et la D-lactate déshydrogénase (D-Ldh) catalyse la formation de D-lactate (3). Suivant le type de déshydrogénase présente et

leurs activités respectives, les bactéries lactiques produisent un ratio D- /L-lactate particulier dans des conditions de culture définies, ce qui peut servir de critère d'identification (19). Cependant, d'autres enzymes que les Ldhs peuvent influencer sur le ratio D-lactate/L-lactate, notamment la présence d'une lactate racémase ou encore d'une réductase NAD-dépendantes à large spectre (Hicdh). La présence d'une lactate racémase explique pourquoi *L. sakei* produit un large excès de L-lactate en début de phase exponentielle, quantité qui s'amenuise et puis qui devient une quantité équimolaire en D- et en L-lactate au fur et à mesure de la croissance. En effet, *L. sakei* ne possède pas de D-Ldh mais une lactate racémase qui est induite par le L-lactate (4). Par ailleurs, les Hicdhs sont des enzymes qui catalysent préférentiellement la réduction d' α -cétoacides à chaîne latérale plus importante, comme le D-2-cétoisocaproate, en son D-2-hydroxyacide correspondant, le D-hydroxyisocaproate. Elles sont néanmoins capables d'utiliser des α -cétoacides à chaîne latérale plus courte tel que le pyruvate. Les Hicdhs sont courantes chez les bactéries lactiques et expliquent pourquoi les bactéries classifiées comme productrices exclusives de D- ou de L-lactate produisent aussi de petites quantités de l'autre isomère (20).

Différents types de fermentations lactiques existent au sein des bactéries lactiques. Premièrement, la voie homofermentaire qu'on retrouve chez les genres *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* et certains *Lactobacillus* permet de convertir une mole de glucose en deux moles de lactate par la voie métabolique d'Embden-Meyerhof. Elle est caractérisée par la coupure par l'aldolase du fructose 1,6-bisphosphate en deux fragments à trois carbones, qui sont ensuite convertis en lactate. La voie hétérofermentaire se retrouve chez certains *Lactobacillus*, par exemple *L. brevis*, appelés bêtabactéries, ainsi que chez les *Leuconostoc* et *Oenococcus*. La voie hétérofermentaire est initiée par l'oxydation du glucose 6-phosphate en gluconate 6-phosphate suivi d'une décarboxylation et la coupure du pentose 5-phosphate obtenu en un fragment à deux carbones et un fragment à trois carbones. Une quantité équimolaire de CO₂, de lactate et d'éthanol ou d'acétate est ainsi formée. Le ratio acétate/éthanol dépend du potentiel d'oxydoréduction (redox) du système (Table 2) (21).

Une autre voie de fermentation existe chez *B. bifidus*, initiée par la coupure du fructose 6-phosphate en un fragment à quatre carbones et un fragment à deux carbones. Le fragment à deux carbones est converti en acétate, alors que le fragment à quatre carbones est lié à un fragment triose provenant d'un

autre fructose 6-phosphate, formant un heptose 7-phosphate, qui est finalement converti en deux molécules d'acétate et une molécule de lactate. Trois molécules d'acétate et deux molécules de lactate sont donc formées à partir de deux hexoses (Table 2) (21).

Mais ces voies métaboliques ne sont pas fixées, il existe des variantes entre espèces et même au sein d'une même espèce sous différentes conditions. *Lactococcus lactis*, par exemple, utilise la voie homolactique en présence d'une quantité suffisante de substrat, mais utilise une fermentation mixte produisant du formate, de l'acétate et de l'éthanol en condition limitante en substrat (22). La fermentation mixte est plus complexe mais permet à la bactérie de produire plus d'énergie à partir d'une quantité équivalente de glucose (Table 2). Finalement, chez les *Enterobacteriaceae*, le glucose est fermenté en un mélange d'acétate, de formate, de lactate, de succinate et d'éthanol. Les produits majoritaires sont l'acétate et le formate. Jusqu'à 85% du glucose est fermenté par la glycolyse, la fraction restante est métabolisée via d'autres voies métaboliques (Table 2) (23).

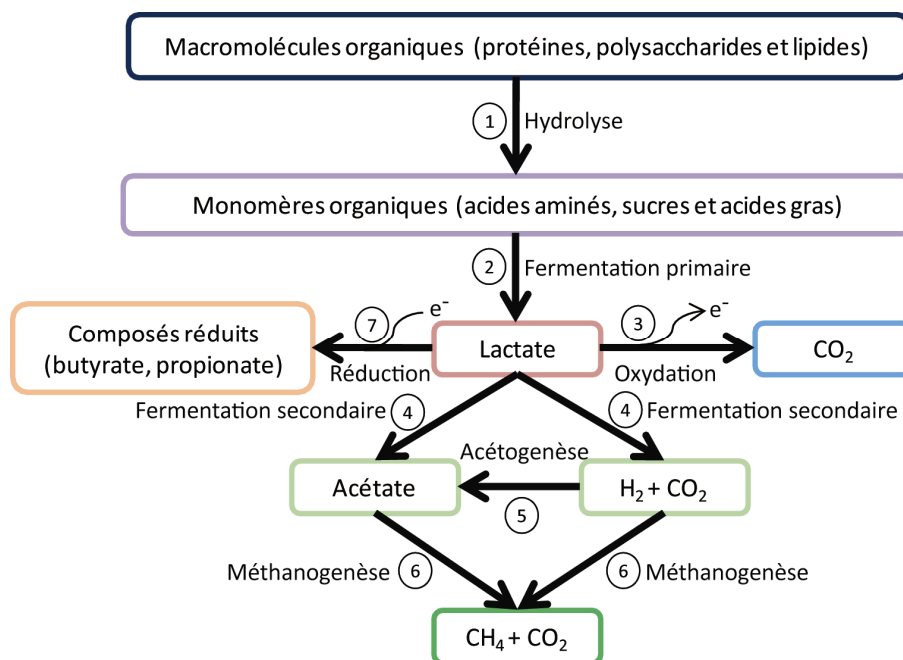


Figure 1. Réactions impliquant la production ou la consommation de lactate. Pour les détails voir texte et Table 2.

Table 2. Réactions impliquées dans la consommation ou la production de lactate

2	Réaction de fermentation	Type de fermentation	ΔG° /Gluc (kJ)
	Glucose $\rightarrow$ 2 Lactate ⁻ + 2 H ⁺	Homolactique	-198,1
	Glucose $\rightarrow$ Lactate ⁻ + Ethanol + CO _{2aq} + H ⁺	Hétérolactique	-176,8
	Glucose $\rightarrow$ Lactate ⁻ + 1.5 Acétate ⁻ + 2.5 H ⁺	<i>Bifidobacteria</i>	-254,4
	Glucose + H ₂ O $\rightarrow$ 2 Formate ⁻ + Acétate ⁻ + Ethanol + 3 H ⁺	Mixte	-218,5
	2,5 Glucose $\rightarrow$ 2 Lactate ⁻ + Formate ⁻ + Acétate ⁻ + Ethanol + Succinate ²⁻ + 6 H ⁺	<i>Enterobacteriaceae</i>	-229,7
3	Réaction en présence d'O ₂	Accepteur d'e ^{-*}	ΔG° /Lac (kJ)
	Lactate ⁻ + H ⁺ + 3 O ₂ $\rightarrow$ 3 CO _{2aq} + 3 H ₂ O	O ₂ $\rightarrow$ H ₂ O	-1311,9
	Lactate ⁻ + H ₂ O + 2 O ₂ $\rightarrow$ Acétate ⁻ + CO _{2aq} + 2 H ₂ O ₂	O ₂ $\rightarrow$ H ₂ O ₂	-268,6
	Lactate ⁻ + O ₂ $\rightarrow$ Acétate ⁻ + CO _{2aq} + H ₂ O	O ₂ $\rightarrow$ H ₂ O	-474,8
3	Réaction en présence d'accepteurs d'e ⁻ autres que l'O ₂	Accepteur d'e ^{-*}	ΔG° /Lac (kJ)
	Lactate ⁻ + 5 H ⁺ + 4 NO ₂ ⁻ $\rightarrow$ 3 CO _{2aq} + 5 H ₂ O + 2 N ₂	NO ₂ ⁻ $\rightarrow$ N ₂	-1478,0
	Lactate ⁻ + 3 H ₂ O + 12 Fe ³⁺ $\rightarrow$ 3 CO _{2aq} + 12 Fe ²⁺ + 11 H ⁺	Fe ³⁺ $\rightarrow$ Fe ²⁺	-1259,8
	Lactate ⁻ + H ⁺ + 6 NO ₃ ⁻ $\rightarrow$ 3 CO _{2aq} + 3 H ₂ O + 6 NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻ $\rightarrow$ NO ₂ ⁻	-867,1
	Lactate ⁻ + H ⁺ + 3 H ₂ O + 6 Fumarate ²⁻ $\rightarrow$ 3 CO _{2aq} + 6 Succinate ²⁻	Fum ²⁻ $\rightarrow$ Succ ²⁻	-406,0
	Lactate ⁻ + 4 H ⁺ + 2 SO ₃ ²⁻ $\rightarrow$ 3 CO _{2aq} + 3 H ₂ O + 2 HS ⁻	SO ₃ ²⁻ $\rightarrow$ HS ⁻	-234,4
	3 Lactate ⁻ + 3 Citrate ³⁻ + 4 H ₂ O $\rightarrow$ 6 Formate ⁻ + 8 Acétate ⁻ + Succinate ²⁻ + 4 H ⁺ + CO _{2aq} ^s	Cit ³⁻ $\rightarrow$ Succ ²⁻	-96,7
4 5	Acétogénèse	Accepteur d'e ^{-*}	ΔG° /Lac (kJ)
	2 Lactate ⁻ $\rightarrow$ 3 Acétate ⁻ + H ⁺	CO ₂ $\rightarrow$ Acétate ⁻	-56,2
4 6	Méthanogénèse	Accepteur d'e ^{-*}	ΔG° (kJ)
	Lactate ⁻ + H ₂ O $\rightarrow$ Acétate ⁻ + CO _{2aq} + 2 H ₂	H ⁺ $\rightarrow$ H ₂	-0,4
	0.5 CO _{2aq} + 2 H ₂ $\rightarrow$ 0.5 CH ₄ + H ₂ O	CO ₂ $\rightarrow$ CH ₄	-69,5
	Acétate ⁻ + H ⁺ $\rightarrow$ CO _{2aq} + CH ₄	CO ₂ $\rightarrow$ CH ₄	-27,5
	Lactate ⁻ + H ⁺ $\rightarrow$ 1.5 CO _{2aq} + 1.5 CH ₄	H ⁺ $\rightarrow$ H ₂ + CO ₂ $\rightarrow$ C H ₄	-97,5

(3) (4) (7)	Réaction en absence d'accepteurs d'e ⁻ externe	Accepteur d'e ⁻ *	ΔG°/Lac (kJ)
2	Lactate ⁻ → Acétate ⁻ + Formate ⁻ + Propionate ⁻ + H ⁺	Lac ⁻ → Propionate ⁻	-42,9
3	Lactate ⁻ → Acétate ⁻ + 2 Propionate ⁻ + CO _{2aq} + H ₂ O	Lac ⁻ → Propionate ⁻ <i>Propionibacterium</i>	-53,8
4	Lactate ⁻ + 2 Acétate ⁻ + 3 H ⁺ → butyrate ⁻ + CO _{2aq} + 2 H ₂ O + 2 H ₂	Lac ⁻ → Butyrate ⁻ <i>m</i>	-36,7
Réactions impliquant la consommation de protons			ΔG° (kJ)
	Citrate ³⁻ + H ⁺ → Acetate ⁻ + Pyruvate ⁻ + CO ₂		-21,9
	Malate ²⁻ + H ⁺ → Lactate ⁻ + CO ₂		-18,9

ΔG° : enthalpie libre de réaction à 25°C, 1atm, avec [H⁺] = 10⁻⁷ M et [H₂O] = 55,5 M.

ΔG°/gluc : enthalpie libre de réaction par molécule de glucose consommée.

ΔG°/lac : enthalpie libre de réaction par molécule de lactate consommée.

#D'après les données de (24).

*La réaction de réduction de l'accepteur d'électrons est indiquée, la stœchiométrie de réaction n'est pas respectée. Fum : fumarate, Succ : succinate, Cit : citrate, Lac : lactate

§Réaction hypothétique, basée sur les résultats de (25).

(x) correspond à la réaction x de la Fig. 1.

I.1.3. L'utilisation du lactate par les bactéries

I.1.3.1. Généralités

Bien que le lactate soit excrété par les bactéries lactiques comme un déchet métabolique, le potentiel énergétique du lactate est encore loin d'être épuisé. En effet, si la fermentation lactique produit deux ATP par mole de glucose, l'oxydation complète d'une mole de glucose produit 32 ATP chez *E. coli*, le lactate possède donc encore un large potentiel énergétique. La fermentation secondaire de lactate en acétate permet de produire un ATP supplémentaire, mais on est encore loin des 15 ATP potentiellement produits par l'oxydation complète d'une mole de lactate (26). Il faut cependant noter que pour l'oxydation complète d'une mole de lactate en CO₂ et H₂O, 3 moles d'O₂ sont nécessaires. En condition aérobie, le lactate est donc rapidement oxydé en CO₂ et H₂O. En revanche, en condition anaérobie, d'autres accepteurs d'électrons doivent être envisagés, tels que le nitrate, le sulfate, le soufre, le carbonate, le Fe(III), le fumarate ou même l'U(VI) (27, 28). La difficulté de

trouver des accepteurs d'électrons alternatifs en condition anaérobie mène à l'accumulation de lactate dans les sédiments (29).

Mais l'utilité du lactate ne se situe pas uniquement au niveau de son potentiel énergétique, il peut aussi servir à la formation de pyruvate, point de départ de la gluconéogenèse et de la formation de biomasse. Lorsque *E. coli* est cultivée en présence de lactate comme unique source de carbone, un tiers du lactate est utilisé par la gluconéogenèse, les deux tiers restant servent de source d'énergie (30).

Finalement, chez certaines bactéries, le lactate peut servir à d'autres utilisations non-liées au métabolisme énergétique, comme la synthèse de la paroi, la synthèse de coenzyme, la production de peroxyde d'hydrogène ou la consommation d'oxygène (31-34).

I.1.3.2. Utilisation du lactate comme source d'électrons

I.1.3.2.1. Utilisation en aérobie

L'oxydation totale de lactate en CO_2 et H_2O est possible via le cycle de Krebs, qui permet de produire 5 moles de NADH, 1 mole de FADH_2 et une mole d'ATP par mole de lactate oxydée. Si on considère un rapport de 2.5 moles d'ATP par mole de NADH réoxydée et 1.5 mole d'ATP par mole de FADH_2 réoxydée, on arrive à 15 moles d'ATP produits par mole de lactate (35). De nombreuses bactéries sont capables d'utiliser du lactate comme source d'électrons pour leur croissance et nécessitent pour cela soit des D- et L-Ldh NAD-dépendantes solubles, soit des D- et L-Ldh NAD-indépendantes membranaires (3). Une Ldh de *Campylobacter jejuni* est néanmoins capable d'oxyder les deux isomères du lactate indifféremment *in vitro* (36). Le L-lactate peut également être oxydé en pyruvate par une L-lactate oxydase, produisant du H_2O_2 , ou en acétate par une L-lactate mono-oxygénase, produisant du CO_2 et de l'eau (37). Chez *E. coli*, l'oxydation du lactate est réalisée par une L-Ldh membranaire FMN-dépendante (38) et par une D-Ldh périphérique FAD-dépendante (Table 2) (39).

L. plantarum et la plupart des Lactobacilles sont aussi capables d'oxyder le lactate en acétate en présence d'oxygène comme accepteur d'électrons. Cette réaction permet une survie prolongée en phase stationnaire en présence d'oxygène (40). La première étape est l'oxydation du lactate, réalisée par

une lactate oxydase ou par une Ldh (21, 41). La réaction d'oxydation du pyruvate est ensuite réalisée par une pyruvate oxydase, produisant du CO_2 , du H_2O_2 et de l'acétylphosphate, lui-même converti en acétate par une acétate kinase, générant un ATP (40) (Table 2). L'accumulation de H_2O_2 étant toxique pour la cellule, il peut être réduit par les NADH peroxydases ou encore dismuté par les catalases à manganèse présentes dans certaines souches de *L. plantarum* (42).

Chez *L. plantarum*, l'oxydation du lactate en acétate ne génère qu'un ATP par phosphorylation de l'acétate, mais les électrons produits par l'oxydation du lactate et du pyruvate ne sont pas rentabilisés, alors que la respiration aérobie permet d'utiliser les électrons produits pour générer un gradient de proton et donc de l'ATP supplémentaire. Il a été montré que *Lc. lactis* était capable de réaliser de la respiration aérobie en présence d'hème dans le milieu (43). De même, l'addition d'hème et de ménaquinone chez *L. plantarum* et chez d'autres bactéries lactiques induit une augmentation de la biomasse, indiquant la présence d'une chaîne respiratoire (44, 45). Il semble donc que les lactate et pyruvate oxydases soient capable de transférer leurs hydrogènes à un transporteur membranaire de type quinone, qui peut libérer des protons du côté extracellulaire et consommer des protons du côté intracellulaire en réduisant de l' O_2 en H_2O par l'intermédiaire d'une cytochrome *d* oxydase. De cette manière, chaque molécule de lactate oxydée permet d'exporter 4 protons et de générer 1,33 ATP supplémentaire (Table 2) (43).

I.1.3.2.2. Utilisation en anaérobie en présence d'accepteurs d'électrons externes

La fermentation de glucose en lactate possède l'avantage de ne nécessiter aucun accepteur d'électron autre que le produit de la glycolyse, le pyruvate. L'oxydation du lactate, par contre, nécessite la réduction d'un accepteur d'électron externe. En anaérobie, la voie d'oxydation du lactate dépend donc du type d'accepteur d'électron présent. Les accepteurs d'électrons ayant un potentiel redox plus élevé produiront plus d'énergie une fois réduits. Donc, en termes de compétitivité en milieu anaérobie, cela signifie que, pour un même substrat, les organismes réduisant le nitrite seront plus compétitifs que les organismes réduisant le Fe(III) , eux-mêmes plus compétitifs que ceux réduisant le nitrate, eux-mêmes plus compétitifs que ceux réduisant le

fumarate, eux-mêmes plus compétitifs que ceux réduisant le sulfate, eux-mêmes plus compétitif que ceux réduisant le CO₂ (24).

L'utilisation de lactate en milieu anaérobie est donc réalisée premièrement par les bactéries réductrices de nitrite, qui sont capables de réduire le nitrite en azote moléculaire en utilisant, entre autres, le lactate comme donneur d'électrons. *Paracoccus denitrificans* est une bactérie dénitrifiante capable d'utiliser l'un ou l'autre isomère du lactate comme seule source d'énergie et de carbone. Elle possède deux Ldhs cytochrome-dépendantes, capables d'oxyder l'un ou l'autre isomère du lactate en pyruvate et ne semble pas posséder d'activité lactate racémase (Table 2) (46).

Une fois le nitrite épuisé, les accepteurs d'électrons suivants sont les ions Fe(III) et Mn(IV). La difficulté pour les bactéries ferri-réductrices réside dans la dissolution du Fe(III), qui est très insoluble et se retrouve principalement sous la forme Fe(OH)₃. Plusieurs stratégies sont utilisées par les bactéries pour atteindre ces ions métalliques: l'utilisation de navettes d'électrons, de chélateurs de fer ou la réduction directe à travers la membrane externe via des cytochromes ou des pili conducteurs (47). Le lactate fait partie des donneurs d'électrons courants des bactéries ferri-réductrices, qui peuvent soit l'oxyder partiellement en acétate, soit l'oxyder complètement en CO₂ (48). *Shewanella oneidensis*, par exemple, est capable d'utiliser le lactate comme seule source de carbone et d'énergie (49). L'oxydation de l'un ou l'autre isomère du lactate est couplée à la réduction d'ions métalliques tels que le Fe(III), le Mn(IV), et le Cr(VI) grâce à l'utilisation d'une L-Ldh et d'une D-Ldh possédant toutes deux un domaine à noyau fer-soufre (50). *Geobacter sulfurreducens* est également capable d'oxyder le lactate pour sa croissance (51) mais elle ne semble contenir qu'une L-Ldh dans son génome (Table 2) (50).

Contrairement à la dénitrification qui est réalisée par un nombre limité d'espèces bactériennes, la respiration du nitrate en nitrite est une propriété répandue des bactéries anaérobies facultatives, et même des bactéries anaérobies strictes. Le NADH, le succinate, le lactate, le formate, le glycérol et l'hydrogène peuvent être oxydés par des déshydrogénases membranaires qui transmettent leurs électrons via des transporteurs d'électrons membranaires à une nitrate réductase (Table 2) (24).

Ensuite, si le milieu est riche en fumarate, celui-ci est utilisé comme accepteur d'électrons par une fumarate réductase qui le réduit en succinate.

Ce système n'est cependant pas constitutif chez la plupart des espèces et est en général induit par la présence de fumarate (24). Des espèces produisant habituellement du lactate, comme *Enterococcus faecalis*, produisent plutôt de l'acétate et du formate en présence de fumarate, avec réduction de celui-ci en succinate (52). *Sh. oneidensis* peut croître en présence de lactate comme seule source de carbone avec du fumarate comme accepteur d'électrons (Table 2) (53).

Après viennent les procaryotes sulfato-réducteurs, qui utilisent le sulfate et le soufre comme accepteurs d'électrons pour oxyder une grande variété de substrats. Parmi ceux-ci, le lactate est un substrat commun des procaryotes sulfato-réducteurs, qui l'oxydent soit partiellement en acétate, soit complètement en CO₂ (54). L'oxydation complète du lactate peut être réalisée par la voie de la CO déshydrogénase, comme chez *Archaeoglobus fulgidus* (55). Cette oxydation va de pair avec la réduction du sulfate et du soufre en sulfure d'hydrogène, un gaz toxique (54). L'oxydation du L- et D-lactate est réalisée par des Ldh membranaires NAD(P)-indépendantes. La D-Ldh de *Desulfovibrio vulgaris* a été partiellement purifiée et utilise le ferriocytocrome c-553 comme accepteur d'électrons (56). La D-Ldh d'*A. fulgidus*, quant à elle, a été purifiée et utilise le FAD comme accepteur d'électrons (57). Une activité L-Ldh a été démontrée pour plusieurs espèces de *Desulfovibrio* (54) et pour *A. fulgidus* (57), mais une L-Ldh n'a jamais été purifiée chez une bactérie sulfato-réductrice. La plupart des procaryotes sulfato-réducteurs oxydent l'un ou l'autre isomère du lactate indifféremment. *D. desulfuricans*, par exemple, utilise le L- et le D-lactate pour sa croissance bien que l'activité D-Ldh détectée soit très faible chez cette espèce (Table 2) (58).

Près de la moitié des bactéries acétogènes caractérisées sont capables d'utiliser le lactate pour leur croissance. Les bactéries acétogènes possèdent la particularité de pouvoir utiliser le CO₂ comme accepteur final d'électrons, formant 1 mole d'acétate à partir de deux moles de CO₂ et 8 électrons grâce à la voie métabolique de Wood-Ljungdahl. Elles sont donc capables de former 3 moles d'acétate à partir de deux moles de lactate, avec formation de deux moles d'ATP (Table 2) (59). Mais si les bactéries acétogènes sont généralement peu compétitives face aux méthanogènes, elles possèdent l'avantage de pouvoir utiliser une plus grande variété de substrats que les méthanogènes, qui sont limités à l'utilisation de H₂ ou d'acétate comme source d'électrons (60).

Les archées méthanogènes sont donc également capables d'utiliser du CO_2 comme accepteur final d'électron, mais l'utilisent pour former du CH_4 et non de l'acétate (61). Les substrats majeurs des archées méthanogènes sont le H_2 , le formate et l'acétate. Le lactate n'est donc pas un substrat pour les bactéries méthanogènes, mais le lactate peut néanmoins être dégradé par des cocultures d'archées méthanogènes avec des bactéries fermentaires. Ces bactéries fermentaires sont alors considérées comme fermenteurs secondaires car elles dégradent les produits de fermentation des fermenteurs primaires (62). En effet, les fermenteurs secondaires gagnent de l'ATP en convertissant le lactate en acétate. Mais cela génère un potentiel réducteur qui doit être dissipé soit par la formation d' H_2 soit par la réduction de CO_2 en formate. Cette réaction n'est cependant favorable que si la concentration en H_2 ou en formate est gardée très basse par les archées méthanogènes (61). Cette relation inter-espèces est appelée syntrophique quand la bactérie fermentaire est dépendante de la présence d'un méthanogène pour sa croissance, comme c'est généralement le cas des bactéries qui oxydent le butyrate ou le propionate (61). La dégradation syntrophique de lactate est réalisée par les procaryotes sulfato-réducteurs en absence de sulfate, qui dégradent alors le lactate en acétate et H_2 . L' H_2 est préférentiellement utilisé par les archées méthanogènes et ensuite l'acétate, qui est converti en CO_2 et CH_4 (Table 2) (63).

Même chez les bactéries lactiques, qui produisent généralement du lactate, celui-ci peut être dégradé en acétate, du moment qu'un accepteur d'électron est disponible. *L. plantarum*, par exemple, est capable de convertir le lactate en acétate en condition anaérobie avec le citrate comme accepteur d'électrons (Table 2) (25).

I.1.3.2.3. Utilisation en anaérobie en absence d'accepteurs d'électrons externes

Dans le cas où aucun accepteur d'électron n'est disponible, le lactate lui-même peut servir d'accepteur d'électrons. Il est alors d'une part oxydé en acétate, ce qui permet la production d'une mole d'ATP et de deux équivalents réducteurs, et d'autre part réduit en propionate, utilisant les deux équivalents réducteurs générés précédemment (64). Deux voies permettent la réduction du lactate en propionate, la voie de l'acrylate qui passe par un intermédiaire acrylyl-CoA et la voie du succinate qui, comme son nom l'indique, passe par un intermédiaire succinique (65). Ces voies

métaboliques produisent peu d'énergie mais sont utilisées par les bactéries du système digestif, telles que *Selenomonas ruminantium* ou *Megashaera elsdenii*, quand les sources de glucides sont épuisées et la méthanogenèse inhibée (64, 66). Ces bactéries sont capables d'utiliser les deux isomères du lactate et possèdent pour cela une lactate racémase (67, 68). En effet, le DL-lactate est un intermédiaire important du rumen et s'accumule quand le flux glycolytique est élevé (69). Le lactate sert alors à transférer des électrons d'une espèce à l'autre, comme c'est le cas entre *Lc. lactis* et diverses espèces de *Bacteroides* dans le système digestif des termites (Table 2) (70).

Les propionibactéries sont des spécialistes dans ce domaine car elles parviennent à coupler la réduction du lactate en propionate à la production d'ATP grâce à l'utilisation d'une succinate déshydrogénase membranaire. Elles réalisent cela par le cycle de la transcarboxylase ou cycle de Wood-Werkman, qui permet de convertir trois moles de lactate en deux moles de propionate, une mole d'acétate et une mole de CO₂ (Table 2) (71).

Différentes espèces convertissent également le lactate et l'acétate en butyrate dans le système digestif des animaux. La production de butyrate s'accompagne de la formation de H₂ et de CO₂ et permet de générer une mole d'ATP pour 4 moles de lactate et 2 moles d'acétate (72). Certaines espèces ne convertissent que le D-lactate en butyrate, d'autres, tels que *Eubacterium hallii* et *Anaerostipes caccae*, sont capables d'utiliser les deux isomères du lactate (Table 2) (72).

I.1.3.3. Autres utilisations du lactate

I.1.3.3.1. Incorporation dans le peptidoglycane

Si le lactate peut servir de source d'électrons ou de carbone, d'autres utilisations sont néanmoins possibles. Par exemple l'incorporation de D-lactate dans la paroi cellulaire confère à la bactérie une résistance accrue à la vancomycine. La paroi des bactéries à Gram positif est composée d'une enveloppe comprenant plusieurs couches de peptidoglycane, qui représente environ 40% de la masse totale de la paroi (73). Le remplacement du dipeptide terminal D-Ala-D-Ala du précurseur du peptidoglycane, cible de la vancomycine, par le depsipeptide D-Ala-D-Lac entraîne une diminution de l'affinité de la vancomycine pour sa cible d'un facteur 1000 (74). La résistance à la vancomycine a largement été étudiée chez les entérocoques, qui sont responsables de nombreuses infections nosocomiales.

Table 3. Phénotypes de résistance à la vancomycine chez les entérocoques. Traduit de (75).

Caractéristiques	Phénotype				
	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE
MIC Vancomycine (µg/ml)	64->1000	4-1024	2-32	128	16
MIC Téicoplanine (µg/ml)	16-512	≤0,5	≤0,5	4	0,5
Espèces d'entérocoque les plus fréquentes	<i>En. faecium</i> , <i>En. faecalis</i>	<i>En. faecium</i> , <i>En. faecalis</i>	<i>En. gallinarum</i> , <i>En. casseliflavus</i> , <i>En. flavescens</i>	<i>En. faecium</i>	<i>En. faecalis</i>
Déterminant génétique	Acquis	Acquis	Intrinsèque	Acquis	Acquis
Transférable	Oui	Oui	Non	Non	Non

Chez les entérocoques, il y a 5 principaux phénotypes de résistance à la vancomycine, VanA, VanB, VanC, VanD et VanE (Table 3). Les phénotypes VanA, VanB et VanD utilisent le principe de résistance à la vancomycine décrit ci-dessus et VanA et VanB sont les phénotypes de résistance les plus facilement transférables. Au sein de l'opéron *vanA*, *vanH* code pour une D-Ldh responsable de la production de D-lactate nécessaire à la synthèse du peptidoglycane et des homologues à VanH se retrouvent également dans les opérons *vanB* et *vanD* (75, 76).

Mais on trouve aussi des organismes naturellement résistants à la vancomycine qui ne contiennent pas les clusters de gènes typiques des entérocoques résistants à cet antibiotique. Parmi les bactéries lactiques, certaines bactéries des genres *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* sont naturellement résistantes (77). Cette résistance est liée au remplacement du D-Ala terminal du précurseur du peptidoglycane par un D-Lac (78, 79), comme c'est le cas pour les entérocoques. A la différence qu'ici les bactéries sont naturellement résistantes grâce à la présence dans leur génome d'une D-Ala-D-Lac-ligase qui incorpore spécifiquement du D-lactate dans le précurseur du peptidoglycane (80). La production du D-lactate peut être réalisée par la réduction du pyruvate via une D-Ldh NADH-dépendante ou par la conversion du L-lactate en DL-lactate via une lactate racémase (6).

I.1.3.3.2. Consommation d'O₂ et production de H₂O₂

Dans le chapitre I.1.3.2.1, nous avons vu que l'oxydation du lactate en pyruvate par la lactate oxydase en condition aérobie produisait une molécule d'H₂O₂. Cette réaction peut être utilisée afin d'oxyder le lactate, comme chez *St. pyogenes* (81), mais elle peut aussi avoir une autre utilité. En effet, le H₂O₂ est un oxydant très réactif qui peut produire de nombreux dommages aux cellules et peut donc servir à inhiber la croissance d'autres microorganismes (82). *St. oligofermentans* produit de grandes quantités d'H₂O₂ à partir de L-lactate, ce qui lui permet d'inhiber la croissance d'un compétiteur, *St. mutans*, et donc d'utiliser l'acide lactique produit par *St. mutans* à son avantage (33). Dans ce cas, la production de H₂O₂ est réalisée par une synergie entre une lactate oxydase et une pyruvate oxydase (83). De même, de nombreux lactobacilles produisent du H₂O₂ (84) et cette production inhibe la croissance de *Neisseria gonorrhoeae* (85), ce qui suggère un mécanisme de défense non-spécifique chez ceux-ci (82). Il

semble néanmoins que seules les NADH oxydase et pyruvate oxydase soient impliquées dans la production de H_2O_2 chez les lactobacilles (42, 86).

Chez les cyanobactéries, la réduction du N_2 en NH_3 est réalisée par la nitrogénase, qui est extrêmement sensible à l'oxygène. Cette sensibilité est paradoxale car les cyanobactéries elles-mêmes produisent de l'oxygène par photosynthèse. Elles doivent donc développer des systèmes complexes pour isoler la nitrogénase de l' O_2 dissout, par exemple par la formation d'hétérocystes, qui sont des cellules spécialisées dans la fixation de N_2 au sein d'un filament (87). La concentration en O_2 dans les hétérocystes est alors maintenue la plus basse possible par diverses stratégies, dont une consiste à réduire l' O_2 en H_2O_2 par l'action d'une L-lactate oxydase (34). Dans ce cas, le lactate utilisé peut être celui produit par fermentation lactique lorsque les bactéries se trouvent dans le noir et en absence de soufre comme accepteur d'électrons (88). Les cyanobactéries possèdent en effet des D- et L-Ldh NAD-dépendantes qui leur permettent de réaliser la fermentation de glucose et de glycogène (89).

I.1.3.3.3. Synthèse du cofacteur F_{420}

Le coenzyme F_{420} est un cofacteur important impliqué dans le transfert d'hydrure chez les archées méthanogènes ainsi que chez les méthanotrophes (32). La voie de biosynthèse du coenzyme commence par la formation de L-lactate dont l'importance est donc cruciale (Fig. 2). Comme la réduction du pyruvate en lactate ne semble pas présente chez les archées méthanogènes (90), le L-lactate est obtenu par oxydation du lactaldéhyde via une lactaldéhyde déshydrogénase (91). Le lactaldéhyde, quant à lui, provient de la réduction du méthylglyoxal (92). La deuxième étape est la synthèse de 2-phospho-L-lactate à partir de L-lactate par CofB. Le 2-phospho-L-lactate est ensuite condensé avec du GTP pour former du L-lactyl-2-diphospho-5'-guanosine et du pyrophosphate (32) par CofC. L'étape suivante, impliquant CofD, est la condensation du résidu phospholactate avec la 7,8-didéméthyl-8-hydroxy-5-déazariboflavine (Fo). Finalement, deux résidus L-glutamate sont successivement adjoints par CofE pour former le coenzyme F_{420} (32) (Fig. 2).

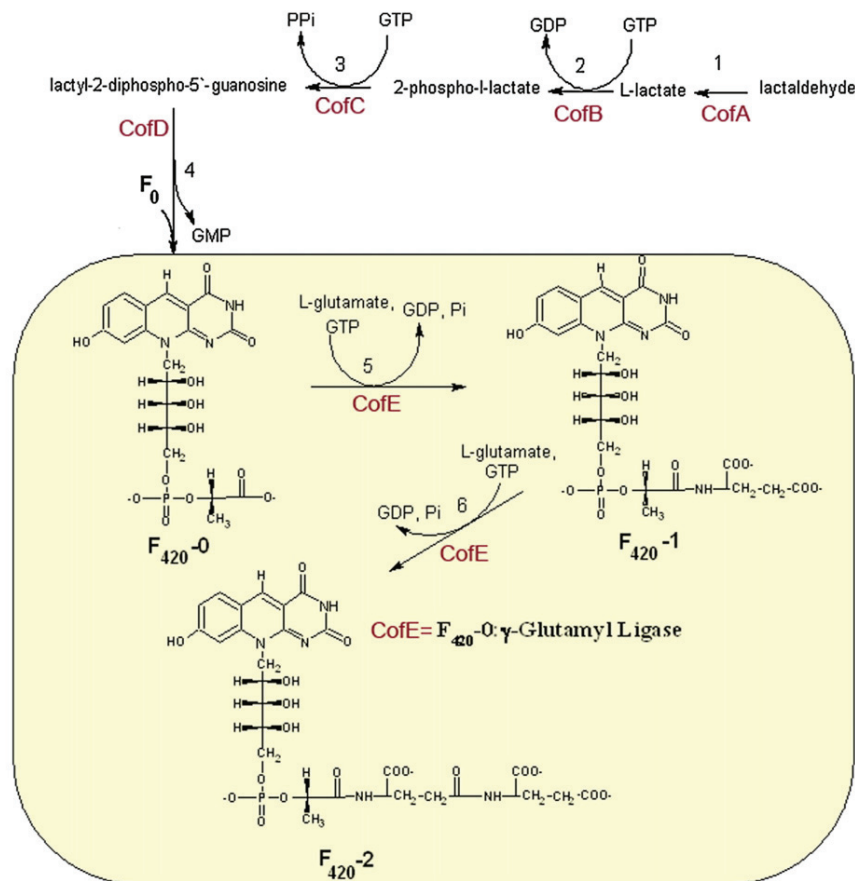


Figure 2. Voie de biosynthèse proposée du cofacteur F_{420} chez *Methanococcus jannaschii*. Les réactions catalysées par CofE sont encadrées. Tiré de (32).

I.1.4. Le transport d'acide lactique

L'acide lactique est un acide faible caractérisé par une fonction acide de pKa 3,86 (93). Le milieu intracellulaire des bactéries lactiques se situant entre pH 6,5 et 7,0 (94), l'acide lactique se trouve donc sous sa forme dissociée, le lactate. Sous cette forme ionisée, le lactate est incapable de traverser la membrane plasmique par simple diffusion. Par contre, le milieu extracellulaire étant plus acide, l'équilibre est déplacé vers la forme acide, non-dissociée. L'acide lactique peut alors pénétrer dans la cellule par simple diffusion. Une fois dans le cytoplasme, l'acide lactique se dissocie et libère un proton, entraînant l'acidification du milieu intracellulaire et une diminution de la force proton-motrice de la cellule. Ce phénomène, appelé effet découplant, apparaît à des valeurs de pH externe proches du pKa de

l'acide lactique. C'est cet effet qui est en partie responsable de l'effet antimicrobien du lactate (95).

Les bactéries lactiques produisent continuellement du lactate pour subvenir à leurs besoins énergétiques, il s'accumule donc en haute concentration dans le cytoplasme, pouvant dépasser 200 mM (96). Cette accumulation de lactate crée une différence de concentration entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, qui peut être utilisée par la bactérie afin de produire de l'ATP. En effet, chez *Lc. lactis*, la présence d'un symport responsable de l'excrétion simultanée de lactate et de deux protons a été mise en évidence. La moitié des protons extrudés crée une force proton-motrice qui peut être utilisée afin de produire de l'énergie (Fig. 3A). La fermentation d'une mole de glucose génère ainsi 0.5 à 0.66 mole d'ATP supplémentaire. Avec l'acidification du milieu, le rapport entre proton et lactate diminue jusqu'à atteindre 1 et la contribution de l'efflux de lactate devient alors énergétiquement nulle (95, 97). D'autres bactéries lactiques, telles *En. faecalis* et *L. helveticus*, excrètent leur lactate en symport avec un seul proton, sous forme d'acide lactique, et ne semblent donc pas posséder de système pour exporter plus d'un proton par lactate. Dans ce cas également, un transporteur d'acide lactique semble être impliqué mais n'a pas été identifié (98, 99). En fin de fermentation, quand la concentration en acide lactique est élevée et le pH bas, la production de lactate ne serait possible que grâce au transport actif d'acide lactique, qui nécessiterait l'hydrolyse d'ATP. Comme la fermentation lactique ne génère qu'une mole d'ATP par mole de lactate formée, ce processus deviendrait énergétiquement neutre. Les bactéries lactiques ne peuvent donc pas compter sur la fermentation lactique comme source d'énergie à bas pH en présence d'une haute concentration extracellulaire en lactate (100).

Mais il existe d'autres systèmes, particulièrement utiles en période de jeûne, permettant aux bactéries lactiques de produire un supplément d'énergie métabolique. Par exemple, la fermentation malolactique permet la décarboxylation du L-malate⁻² en L-lactate⁻¹ et la consommation d'un proton, générant ainsi une force proton-motrice (Table 2). L'import de L-malate et l'export de L-lactate s'effectue soit via un uniporteur L-malate⁻¹, comme chez *Oenococcus oeni* (Fig. 3B) soit via un antiporteur L-lactate⁻¹/L-malate⁻², comme chez *Lc. Lactis* (Fig. 3C) (101, 102).

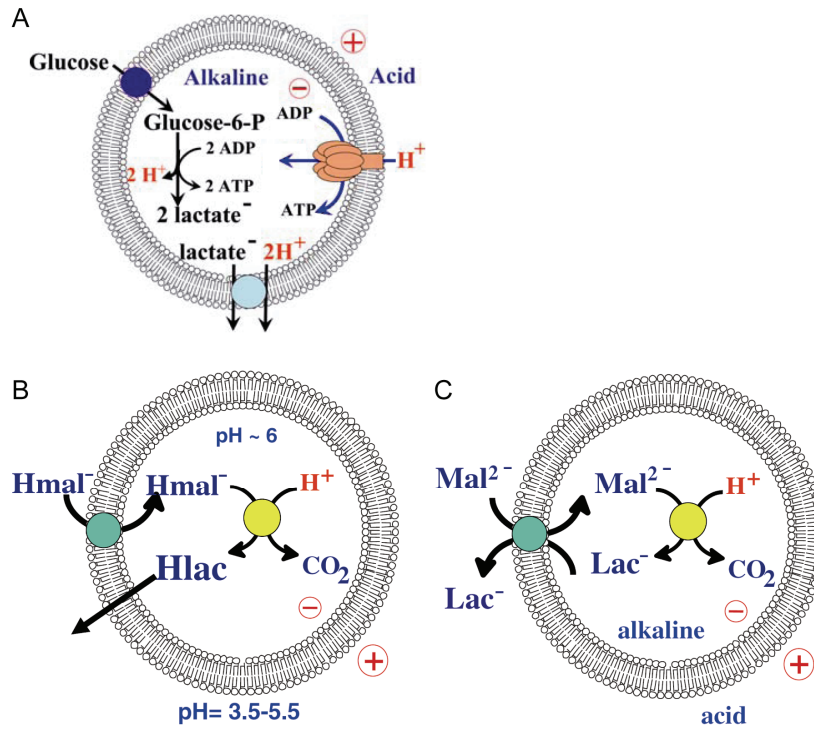


Figure 3. A, conservation d'énergie par fermentation de glucose et par export électrogénique de lactate chez *Lc. lactis*. B et C, Consommation intracellulaire de protons par fermentation malolactique chez *O. oeni* (B) et chez *Lc. lactis* (C). Mal : malate, Lac : lactate. Adapté de (103).

La fermentation citrolactique fonctionne de manière à peu près similaire à la fermentation malolactique : le citrate⁻² est importé soit par symport avec un proton (Fig. 4A) soit par antiport avec du D-lactate⁻¹, qui peut ensuite retourner dans la cellule sous sa forme acide (Fig. 4B). Le citrate⁻² est dégradé en acide acétique et en acide pyruvique avec formation de CO₂ et consommation de deux protons. Le bilan global est la consommation intracellulaire d'un proton, contribuant à la force proton-motrice de la cellule. La dégradation de citrate peut être couplée à la fermentation de glucose, ce qui permet de récupérer le surplus de pouvoir réducteur pour convertir le pyruvate en lactate et accélérer ainsi la fermentation citrolactique (Fig. 4C) (104). Dans tous ces systèmes, le transport du lactate est facilité par un transporteur, alors que l'acide lactique est considéré comme diffusant librement à travers la membrane plasmique, il ne nécessite donc aucun transport (103).

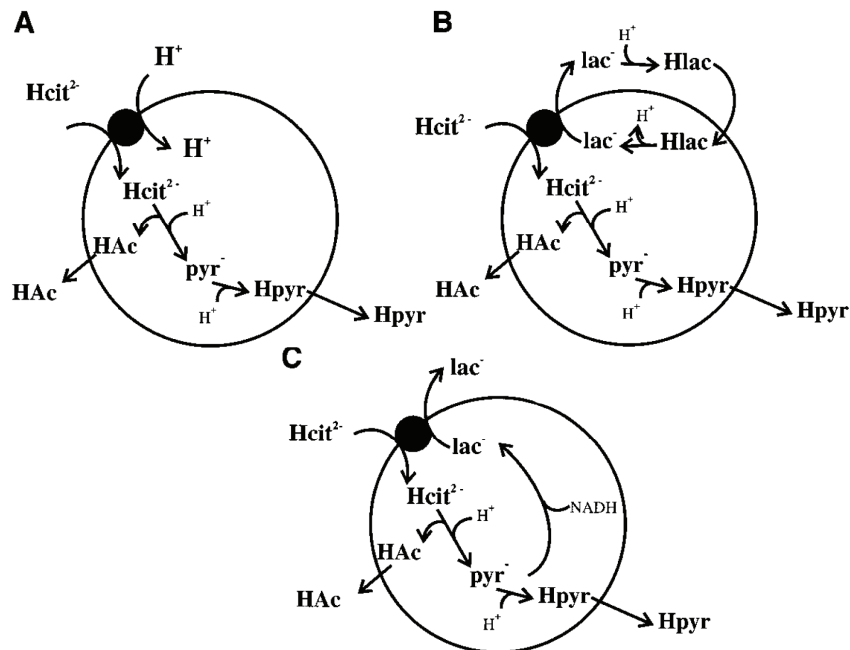


Figure 4. A, consommation intracellulaire de protons par fermentation de citrate, B, par fermentation citrolactique et C, par fermentation citrolactique couplée à la fermentation de glucose chez *Le. mesenteroides*. Ac : acétate, cit : citrate, pyr : pyruvate, lac : lactate. Tiré de (104).

Dans certains cas, le L-lactate peut être utilisé comme source de carbone par la bactérie et nécessite alors d'être importé. Chez *E. coli*, une perméase à lactate, *lldP*, est présente dans un opéron impliqué dans l'utilisation du L-lactate et comprenant également une L-Ldh NAD-indépendante. La perméase *LldP* est également impliquée dans le transport du D-lactate et du glycolate (105, 106). Une autre perméase, *GlcA*, impliquée dans le transport de gluconate, est également capable de transporter du L-lactate et du D-lactate avec une même affinité. Mais ce transporteur n'est exprimé qu'en présence de gluconate (107). Ces perméases permettent l'import du lactate en symport avec un proton, elles permettent donc l'accumulation de lactate contre son gradient de concentration grâce à l'utilisation du gradient de proton dirigé vers l'intérieur (105). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, un autre symporteur lactate/proton a été identifié, *JEN1*, qui permet à la levure de croître en présence de lactate comme seule source de carbone (108).

Mais les perméases ne sont pas les seules protéines impliquées dans le transport du lactate, certaines aquaporines permettent le transport du lactate également, notamment l'aquaporine humaine *AQP9*, l'aquaporine *NIP2.1*

d'*Arabidopsis thaliana* et l'aquaporine SmAQP du parasite humain *Schistosoma mansoni* (109-111). L'AQP9 pourrait être impliquée dans la diffusion de lactate des astrocytes vers les neurones ou dans l'évacuation de l'excès de lactate en conditions pathologiques (112). NIP2 ;1 est liée à l'adaptation d'*Aa. thaliana* à la fermentation lactique en condition de stress anoxique (110). Quant à SmAQP, elle est impliquée chez le trématode parasitaire *Schistosoma mansoni* dans l'évacuation de l'acide lactique formé par fermentation du glycogène en condition intravasculaire (111).

Finalement, le transport de lactate sans cotransport de proton ni de sodium ou de potassium a été montré chez *Kluyveromyces marxianus*, bien que le gène responsable du transporteur n'aie pas été identifié (113).

I.1.5. Les aquaglycéroporines

Les aquaglycéroporines pourraient avoir un lien avec le transport de l'acide lactique, vu qu'un gène d'aquaglycéroporine se retrouve dans l'opéron lactate racémase (*lar*) de *L. plantarum*. Ces protéines font partie de la grande famille des protéines intrinsèques majeures (MIP, pour « Major Intrinsic Protein »). Les MIPs sont des protéines membranaires de type canal qui facilitent le transport à travers la membrane plasmique d'eau et de solutés non-ioniques et permettent l'osmorégulation, le transport d'eau, l'import et le transfert de gaz et de nutriments, l'homéostasie de métalloïdes et la transduction de signaux chez les plantes, les animaux, les eubactéries et les archées. Les MIPs sont catégorisées en deux groupes phylogénétiques distincts : les aquaporines (AQPs), qui regroupent principalement des transporteurs d'eau mais qui incluent également des transporteurs de petits solutés non-polaires, et les aquaglycéroporines (GLPs), qui sont généralement perméables au glycérol et à l'urée, et parfois aussi à l'eau et aux métalloïdes (114). La plus grande diversification des MIPs se retrouve chez les plantes. En effet, bien que les GLPs soient absentes des plantes, elles comptent de nombreux orthologues du groupe des AQPs : on compte jusqu'à 35, 36 ou 71 AQPs chez *Aa. thaliana*, le maïs ou le peuplier, respectivement (115). Ces AQPs sont impliquées dans un grand nombre de processus, allant du maintien de la turgescence cellulaire à la germination en passant par la transpiration (116). Chez les mammifères, les treize MIPs découvertes sont également impliquées dans une variété de processus physiologiques, de la concentration de l'urine au maintien de la transparence du cristallin (117).

On connaît moins le rôle fonctionnel des MIPs chez les procaryotes, bien que le fait que la plupart des génomes bactériens encode des gènes de MIPs suggère un rôle important chez ceux-ci également. La plupart des AQP bactériennes ont été identifiées chez les bactéries à Gram négatif, alors que des GLPs ont été identifiées tant chez les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif. Cette asymétrie pourrait être expliquée par le fait que les bactéries à Gram positif ne réagissent pas de la même manière au stress osmotique que les bactéries à Gram négatif (118). Les MIPs bactériennes les mieux étudiées sont les GLP et AQP d'*E. coli* (119, 120), la GLP de *Lc. lactis* (121) et l'AQP de *Brucella abortus* (122). Une analyse phylogénétique des MIPs bactériennes montre que les bactéries nécessitent généralement soit une AQP pour le transport d'eau et une GLP pour le transport de petits solutés, soit une GLP permettant le transport d'eau et de solutés (123). Le transport d'eau permet à la bactérie de s'adapter à un changement d'osmolarité et pourrait également servir à protéger la bactérie contre la congélation-décongélation dans certains milieux froids (124). Le transport de petits solutés pourrait servir à importer des substrats du métabolisme, en effet la colocalisation de gènes codant pour des MIPs dans des opérons d'utilisation du glycérol ou du propanediol montre leur probable implication dans l'import et l'utilisation de ces substrats comme source de carbone (125). Certaines bactéries ne possèdent aucun gène codant pour des MIPs, notamment certaines bactéries pathogènes d'animaux ou vivant dans les fonds marins. Il est possible que ces bactéries n'expérimentent pas de grandes variations d'osmolarité et donc ne nécessitent pas de transporteur d'eau ou de solutés (125). A l'opposé, certaines bactéries lactiques possèdent plus que deux GLPs dans leur génome, *Pediococcus pentosaceus* et *Lc. lactis* en possèdent quatre et *L. brevis* trois, par exemple. L'existence de GLPs chez ces bactéries lactiques pourrait refléter l'utilisation de glycérol en présence d'une deuxième source de carbone car elles sont incapables d'utiliser le glycérol comme unique source de carbone (126). Cependant, le grand nombre de GLPs présent suggère d'autres fonctions que le transport d'eau et de glycérol.

I.1.6. Régulation lactate-dépendante

Les bactéries qui utilisent le lactate comme source de carbone induisent l'expression des gènes nécessaires à l'utilisation de lactate quand celui-ci est présent dans le milieu. Chez *E. coli*, le régulateur LldR, de la famille des régulateurs de type GntR, induit l'expression de l'opéron *lldPRD*,

responsable de l'utilisation de L-lactate en aérobie, en présence de celui-ci (Fig. 5).

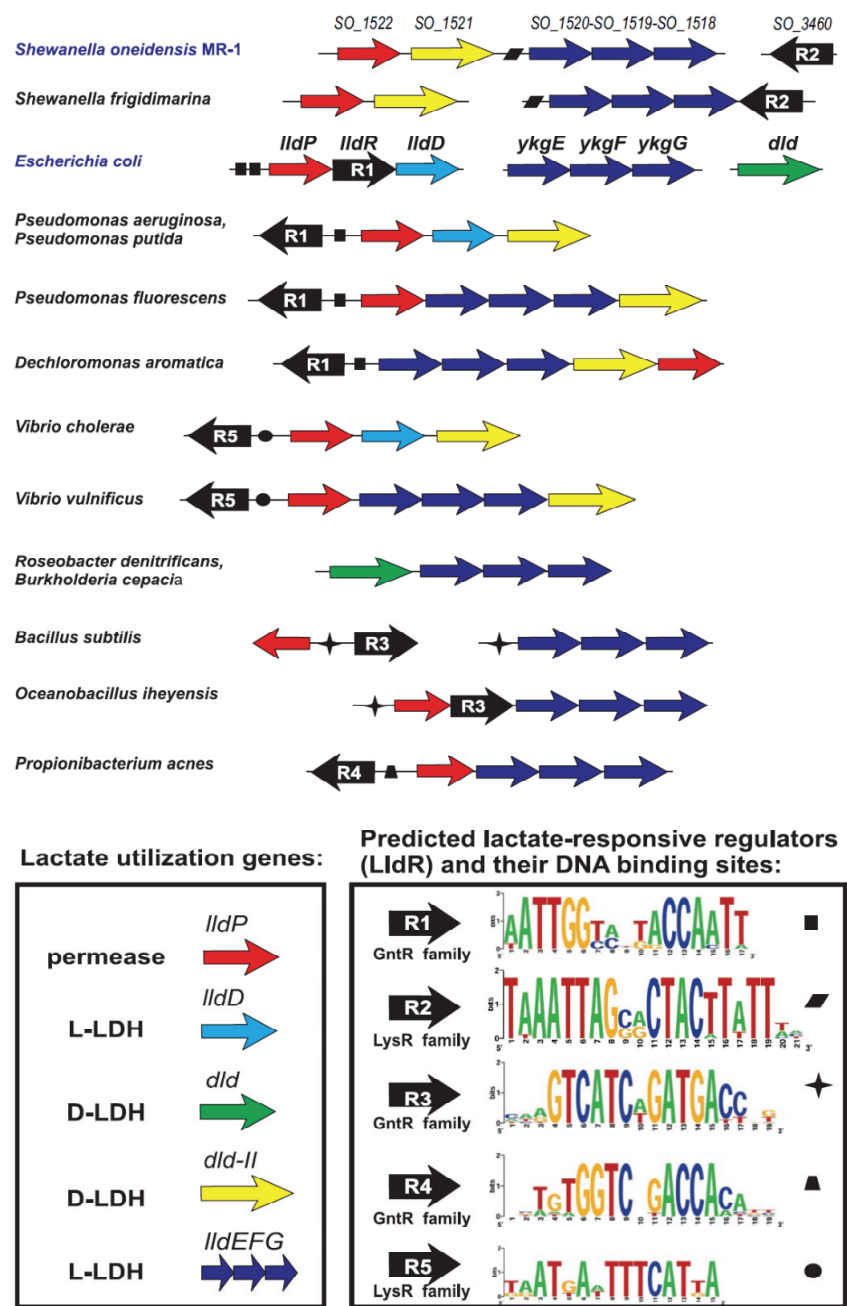


Figure 5. Analyse du contexte génétique des gènes d'utilisation du lactate chez quelques espèces bactériennes séquencées (suite de la légende page suivante).

Les orthologues des gènes de l'opéron *lldPRD* d'*E. coli*, codant pour la perméase à lactate LldP, le régulateur LldR et la L-Ldh LldD, sont indiqués en rouge, en noir et en bleu clair, respectivement. Les orthologues des gènes de l'opéron *SO_1518-SO_1520* de *Sh. oneidensis*, codant pour une L-Ldh tripartite, sont indiqués en bleu foncé. Les orthologues du gène *SO_1521* de *Sh. oneidensis*, codant pour une D-Ldh, sont indiqués en jaune. Le gène *ddl* d'*E. coli*, codant pour une D-Ldh, est indiqué en vert. Les différents régulateurs transcriptionnels lactate-dépendants (flèches noires) et leurs sites de liaison respectifs (formes géométriques noires) sont associés au logo de leur séquence consensus en bas à droite. Tiré de (50).

LldR réprime l'expression de l'opéron en absence de L-lactate par formation d'une boucle dans l'ADN. La formation de cette boucle par LldR serait perturbée en présence de L-lactate, ce qui aurait pour effet d'induire l'expression de l'opéron *lldPRD* (38). Un régulateur similaire chez *Corynebacterium glutamicum* forme un complexe avec l'ADN, réprimant l'expression d'un opéron d'utilisation du L-lactate en absence de celui-ci. Ce complexe est déstabilisé en présence de L-lactate, permettant l'expression de l'opéron en question, comme chez *E. coli* (127). En plus de son rôle dans l'utilisation de L-lactate en aérobie, le régulateur LldR de *Co. glutamicum* intervient dans la régulation de la production de L-lactate en anaérobie. En effet, la dérégulation de la L-Ldh en présence de L-lactate agit comme une rétroaction positive de la fermentation (128).

Chez *E. coli*, seule l'utilisation de L-lactate est régulée, l'utilisation de D-lactate est constitutive (129). Par contre, chez *Pseudomonas aeruginosa*, l'un ou l'autre isomère du lactate induit l'expression des gènes d'utilisation des deux isomères. Chacun des isomères du lactate interfère alors dans la liaison du régulateur LldR à l'ADN, induisant l'expression des gènes d'utilisation du lactate (130). L'analyse du génome de plusieurs espèces bactériennes séquencées indique que la régulation de l'utilisation du lactate pourrait être effectuée par plusieurs types de régulateurs de la famille GntR et LysR (Fig. 5). Le fait que plusieurs types de régulateurs soient impliqués suggère une sensibilité différente envers chacun des isomères du lactate. Chez *Sh. oneidensis*, la présence de D-lactate inhibe l'utilisation de L-lactate, ce qui indique une régulation différentielle en fonction de la présence de chacun des isomères du lactate. Un régulateur de type LysR est impliqué dans la régulation de l'utilisation du L-lactate chez *Sh. oneidensis*, mais aucun régulateur sensible au D-lactate n'a été identifié (Fig. 5) (50, 131).

I.1.7. Conclusion

Même si le lactate, en tant que produit de fermentation, apparaît comme un déchet métabolique pour certaines bactéries, il occupe une place importante comme source d'énergie et de carbone pour de nombreuses autres bactéries. En présence d'oxygène ou de nitrite, l'oxydation complète de lactate produit plus de 1300 kJ/mole. On peut noter que les bactéries productrices de lactate sont également capables d'oxyder le lactate en présence d'oxygène, mais avec une efficacité bien moindre comme elles ne possèdent pas de chaîne respiratoire complète (43). En conditions anaérobies, le lactate peut être oxydé par divers accepteurs d'électrons, tels que le Fe(III), le Mn(IV) ou d'autres ions métalliques, ce qui génère plus de 1200 kJ/mole. La réduction d'ions métalliques est un mécanisme important dans la dégradation de la matière organique dans les sédiments aquatiques, les sols submergés et les aquifères. Ce mécanisme peut en effet supplanter la réduction de sulfate et la méthanogenèse dans les habitats où des ions métalliques sont disponibles (Table 2) (48).

Dans les sédiments marins et en présence de sulfate, la réduction de celui-ci en H_2S est majoritaire (132). Le lactate intervient alors comme un intermédiaire entre les fermenteurs et les réducteurs de soufre. En absence de sulfate, la méthanogenèse est alors majoritaire et le lactate intervient à nouveau comme intermédiaire, bien qu'il ne soit pas directement utilisable par les méthanogènes (133). Dans ce cas, le lactate produit par les fermenteurs primaires est d'abord fermenté par les fermenteurs secondaires en acétate et H_2 , qui sont ensuite utilisés pour la méthanogenèse (Fig. 1 et Table 2).

Dans le cas où la méthanogenèse ne suffit pas à dégrader le lactate, celui-ci peut être utilisé comme donneur et accepteur d'électron, il est alors oxydé d'une part en pyruvate et réduit d'autre part en propionate ou en butyrate. Ce type de réaction ne génère que peu d'énergie par mole de lactate et est réalisé principalement dans le rumen d'animaux ou lors de la fermentation de produits laitiers (Fig. 1 et Table 2) (71, 72).

Certaines réactions, telles les fermentations malolactique et citrolactique, génèrent de l'énergie par consommation intracellulaire de protons, générant ainsi un gradient de force proton-motrice (Figs. 3 et 4) (102, 104). En effet, l'énergie produite est tellement faible ($<25\text{kJ/mole}$) que la production directe d'ATP est impossible via ce type de réaction (Table 2). L'export de lactate

est réalisé par un antiporteur, par diffusion à travers la membrane sous forme protonée ou par symport avec un ou deux protons (103). Dans le cas de l'utilisation de lactate comme source de carbone et d'électrons, un symporteur à lactate/protons est en général utilisé, comme chez *E. coli* (105). Les gènes d'utilisation du lactate sont alors induits par la présence du substrat, plusieurs types de régulateurs semblant être impliqués dans la reconnaissance de chacun des isomères du lactate (50).

Finalement, l'oxydation de lactate en pyruvate par une lactate oxydase, générant de l' H_2O_2 , peut être utilisée non pas pour les électrons qu'elle apporte, mais pour produire de l' H_2O_2 en tant qu'inhibiteur de croissance (83) ou pour consommer de l' O_2 indésiré (34). Le D-lactate est également incorporé dans la paroi cellulaire de nombreuses bactéries lactiques, offrant ainsi aux bactéries une résistance intrinsèque à la vancomycine (74), et le L-lactate est utilisé par les méthanogènes et les méthanotrophes pour la biosynthèse du cofacteur F_{420} (Fig. 2) (32).

I.2. Deuxième partie : les racémases et la racémisation

I.2.1. Généralités

La racémisation est une réaction d'isomérisation, poussée par la différence d'entropie, qui transforme un composé optiquement actif en un mélange équimolaire des deux isomères (134). Par exemple, l'acide lactique, un α -hydroxyacide, est une molécule chirale et existe donc sous la forme de D-(-)-acide lactique ou L-(+)-acide lactique (Fig. 6).

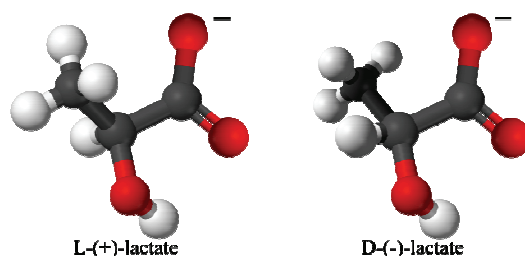


Figure 6. Les deux isomères du lactate.

La racémisation a souvent été considérée comme une réaction indésirée car on perd la pureté optique du composé. Cependant, la racémisation a récemment gagné un certain intérêt dans les processus de déracémisation, qui permet d'obtenir un produit optiquement pur à partir d'un mélange racémique (134). Ainsi, la déracémisation d' α -hydroxyacides peut être réalisée grâce à l'action couplée d'une racémase et d'une lipase qui converti un des deux isomères stéréosélectivement (Fig. 7) (135). L' α -hydroxyacide optiquement pur peut ensuite être récupéré par hydrolyse de l'ester formé.

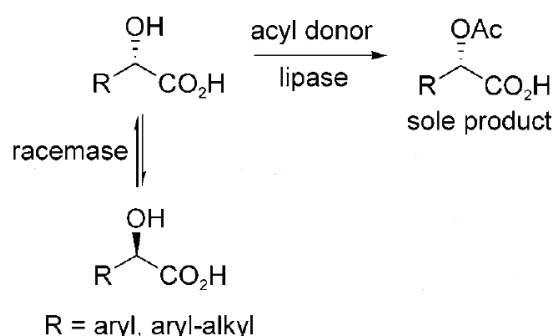


Figure 7. Déracémisation d' α -hydroxyacides par un protocole séquentiel à deux enzymes, une racémase et une lipase. Adapté de (135).

De manière générale, l'interconversion de deux isomères nécessite le clivage et la reformation d'une liaison d'un groupe au centre chiral, cette liaison pouvant être une liaison C-H, C-N, C-O ou C-C (Fig. 8). Quand le centre chiral est adjacent à un groupe carbonyle, ce qui est généralement le cas, le pKa du proton est diminué grâce à la stabilisation par résonance de l'anion résultant. Dans ce cas l'abstraction du proton par une base de l'enzyme est rendue possible et le lien C-H sera donc clivé (136). Ce chapitre sera consacré aux racémases agissant sur le lactate ainsi que sur d'autres substrats structurellement proches du lactate : le mandélate, l'alanine, le glutamate, l'aspartate et la proline. La Ldh sera présentée aussi, étant donné que l'action combinée de deux Ldhs de stéréospécificité opposée peut mener à la racémisation de lactate également.

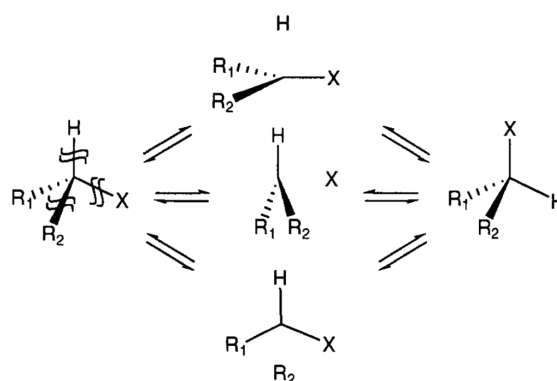


Figure 8. Trois stratégies d'inversion stéréochimique d'un centre chiral (X = OH ou NH₂). Tiré de (136).

I.2.2. Les racémases à acide aminés

Bien que la forme L des 2-aminoacides soit la plus courante dans la nature et la seule nécessaire à la synthèse des protéines par les ribosomes, les acides aminés D sont indispensables pour divers processus biologiques, chez les eucaryotes comme chez les procaryotes. Par exemple, le D-glutamate et la D-alanine interviennent dans la composition du peptidoglycane bactérien (136), la D-alanine intervient dans la régulation de la sporulation (137), tandis que la D-méthionine et la D-leucine interviennent plutôt dans le remodelage de paroi bactérienne et dans la dispersion des biofilms (138). Chez les eucaryotes, la D-sérine est un co-agoniste des récepteurs à glutamate du cerveau des mammifères et le D-aspartate un régulateur majeur de la neurogenèse (138). Tant chez les eucaryotes que chez les procaryotes, finalement, certains peptides incorporent des D-acides aminés, ce qui

contribue à leur bioactivité et leur procure une résistance accrue aux protéases. Ces peptides sont soit synthétisés par des peptides synthases non-ribosomiales, soit obtenus par modification posttraductionnelle de peptides ribosomiaux (138).

Etant donné la faible abondance de ces D-acides aminés dans le milieu naturel, les organismes doivent disposer de voies de synthèse spécifiques. L'une de ces voies consiste à convertir les L-acides aminés en D-acides aminés par l'intermédiaire d'une racémase. Il existe deux grands groupes de racémases à acides aminés, les racémases dépendantes du PLP et les racémases PLP-indépendantes.

I.2.2.1. Les racémase PLP-dépendantes

De nombreuses racémases à acides aminés sont dépendantes du PLP : l'alanine racémase (139), la méthionine racémase (140), l'ornithine racémase (141), l'aspartate racémase animale (142), la sérine racémase (143) et certaines racémase à acides aminés à large spectre (144-146). Dans tous ces cas, le mécanisme catalytique est identique. Pour illustrer ce mécanisme, on prendra comme exemple l'alanine racémase, qui est la mieux caractérisée des racémases PLP-dépendantes. De plus, c'est une enzyme importante chez les bactéries, tant à Gram positif qu'à Gram négatif, car elle est responsable de la synthèse de D-alanine, un composant indispensable du peptidoglycane. Comme la présence de peptidoglycane est un trait omniprésent des bactéries, l'alanine racémase bactérienne est considérée comme une cible prometteuse pour le développement de nouveaux composés antimicrobiens (139).

La réaction des racémases PLP-dépendantes est plutôt simple en apparence: la formation de l'iminium diminue le pKa du proton α du substrat, facilitant ainsi son abstraction et la formation de l'intermédiaire anionique. Ensuite la reprotonation du côté opposé forme le produit (Fig. 9). Deux mécanismes catalytiques ont été proposés pour l'abstraction/reprotonation: un mécanisme à une base avec rotation de l'intermédiaire anionique et un mécanisme à deux bases de part et d'autre de l'intermédiaire. L'étude du mécanisme réactionnel avec des mutants catalytiques et une analyse de la structure tridimensionnelle de l'alanine racémase de *Geobacillus stearothermophilus* a donné la solution : c'est un mécanisme catalytique à deux bases. Une des bases est responsable de l'abstraction de proton d'un côté, l'autre base est responsable de la reprotonation de l'autre côté (147). Une différence caractérise cependant l'alanine racémase par rapport à d'autres enzymes

PLP-dépendantes : le cofacteur PLP est adjacent à une arginine alors qu'il est en général protoné par un résidu acide. Le fait qu'il ne soit pas protoné diminue la stabilisation par résonance de l'intermédiaire. Il semble que la raison pour cela réside dans le fait que la stabilisation de l'intermédiaire favorise les réactions secondaires de transamination. L'alanine racémase sauvage favorise donc une moins bonne stabilisation de l'intermédiaire afin de limiter les réactions secondaires (Fig. 9) (148).

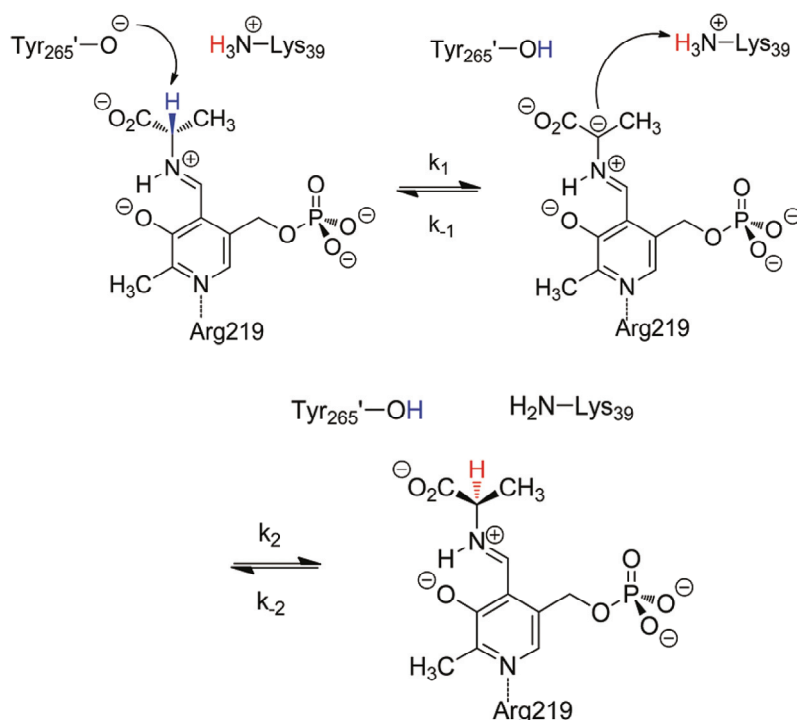


Figure 9. Mécanisme réactionnel de l'alanine racémase. L'iminium formé entre l'alanine et le PLP permet de stabiliser l'intermédiaire anionique par délocalisation des électrons. Tiré de (148).

Sur base de leurs séquences secondaires et de leurs structures 3D, on peut répartir les enzymes à PLP en 5 groupes selon le type de repliement (Table 4). Parmi celles-ci, les alanine racémases eucaryotiques font partie du repliement I, les sérines racémases du repliement II et les alanines racémases bactériennes du repliement III. Cela signifie que les racémases à PLP ont évolué de manière convergente à partir de trois protéines ancestrales différentes (Fig. 10). Exceptionnellement, une levure, *Schizosaccharomyces pombe*, possède une alanine racémase de type bactérienne, probablement obtenue par transfert horizontal de gène (147).

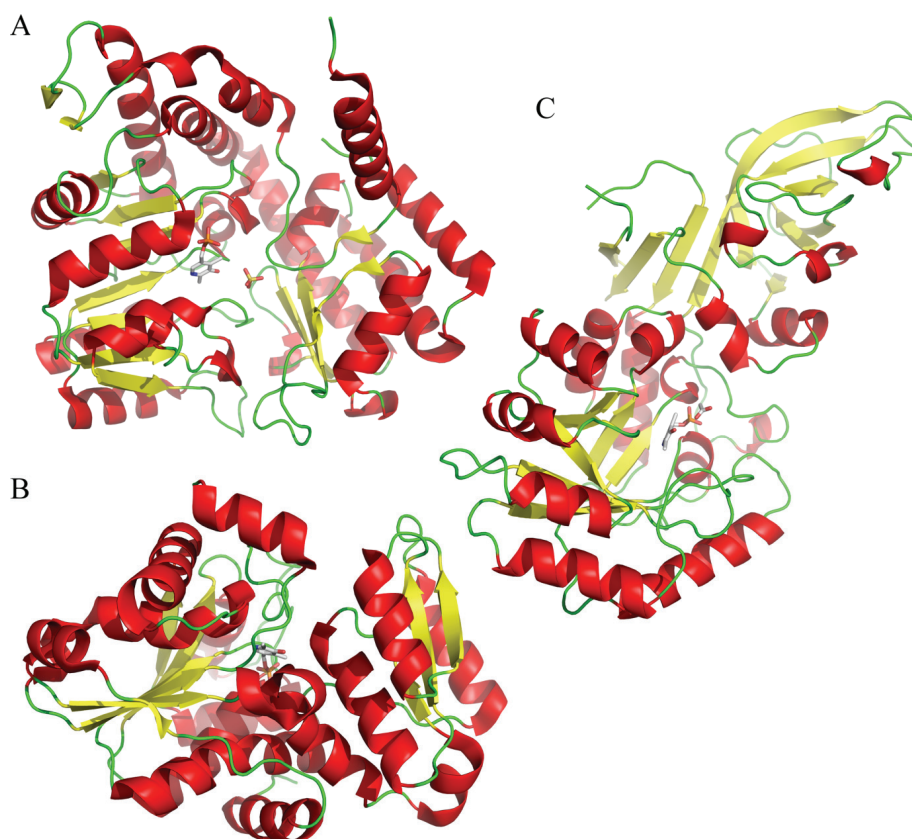


Figure 10. Comparaison entre les repliements de racémases à PLP. **A**, repliement de type I, structure de la sérine méthyltransférase de *Thermus thermophilus* (PDB code : 2DKJ), aucune structure d'alanine racémase de repliement I n'ayant été déterminée. **B**, repliement de type II, structure de la sérine racémase de *Schizosaccharomyces pombe* (PDB code : 1V71). **C**, repliement de type III, structure de l'alanine racémase de *Bacillus stearothermophilus* (PDB code : 1SFT). Les hélices α sont en rouge, les feuillettes β en jaune et les boucles en vert. Le PLP et les inhibiteurs sont illustrés en bâtonnets avec le C en blanc, le O en rouge, le N en bleu, le P en orange et le S en jaune.

Table 4. Types de repliement des enzymes à PLP. Adapté de (141, 145-147).

Types de repliement	Enzyme
I	Alanine racémase (mycète) , ω -acide aminé pyruvate transaminase, aspartate transaminase, cystathionine β -lyase, dialkylglycine décarboxylase, ornithine décarboxylase (procaryote), ornithine transaminase, sérine hydroxyméthyltransférase, thréoninealdolase, tryptophanase, tyrosine-phénol lyase

II	Sérine racémase (eucaryote), aspartate racémase (eucaryote) , O-acétylsérine sulfhydrase, thréonine déaminase, sous-unité β de la tryptophane synthase
III	Alanine racémase (bactérie), racémase à acide aminé à large spectre , ornithine décarboxylase (eucaryote)
IV	D-acide aminé transaminase, 4-Amino-4-déoxychorismate lyase, L-acide aminé branché transaminase
V	Glycogène phosphorylase

I.2.2.2. Les racémases PLP-indépendantes

Les racémases PLP-indépendantes incluent la glutamate racémase (149), la proline racémase (150), l'aspartate racémase procaryotique (151) et la lysine racémase (152). Dans tous ces cas, le mécanisme catalytique est similaire : deux résidus cystéine de chaque côté du substrat agissent comme couple acide/base en protonant le substrat d'un côté et en le reprotonant de l'autre (153). Nous prendrons comme exemple la glutamate racémase, qui a été beaucoup étudiée comme cible pour le développement de nouveaux composés antimicrobiens. En effet, la synthèse des précurseurs du peptidoglycane nécessite du D-glutamate, qui est synthétisé principalement par la glutamate racémase, qu'on ne retrouve que chez les bactéries. De plus, le D-glutamate est un constituant majeur de la capsule de poly- γ -D-glutamyl de *B. anthracis*, qui est un des deux facteurs de virulence de l'anthrax et qui sert à protéger la bactérie contre les composants bactéricides du sérum et la phagocytose (154).

La glutamate racémase d'*Aquifex pyrophilus* est homodimérique, avec chaque monomère composé de deux domaines de repliement α/β , chacun contenant une des deux cystéines catalytiques et un résidu acide (aspartate ou histidine) intervenant également dans le mécanisme catalytique. Le site actif est localisé à l'interface entre ces deux domaines, formant une profonde gorge dans laquelle le substrat est enfoui (155). Les deux domaines présentent un repliement similaire, ce qui suggère qu'ils proviennent d'un seul domaine ancestral qui a été dupliqué (156). La proline racémase, bien que présentant un repliement différent, semble également avoir évolué à partir d'une duplication de gène, comme le suggère sa structure composée de deux domaines semblables (Fig. 11) (157).

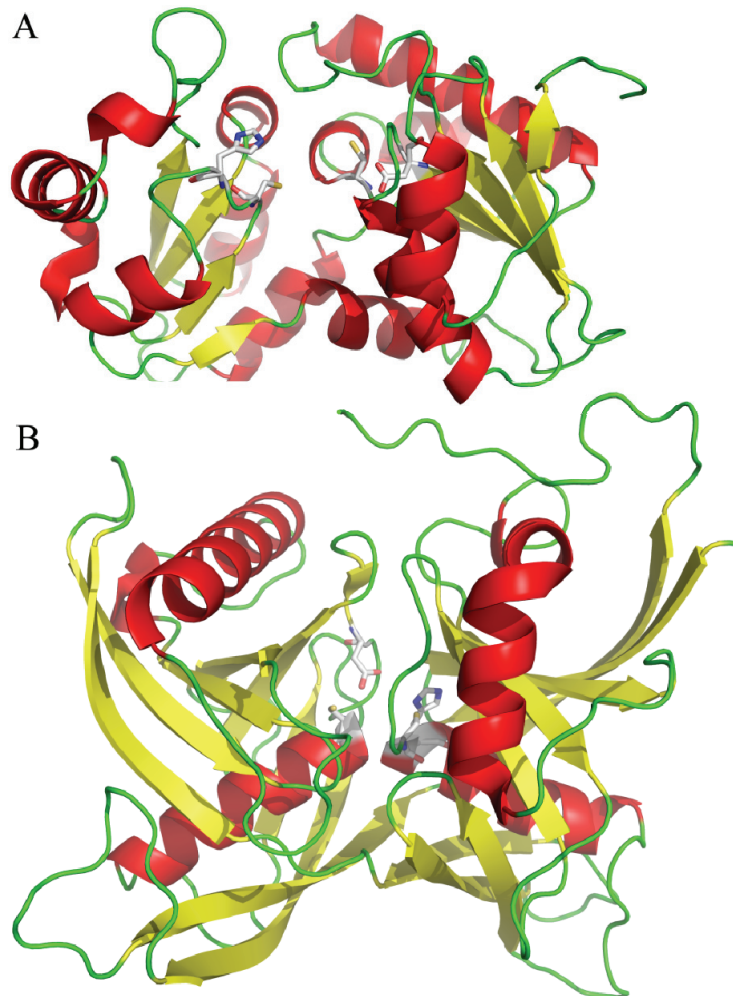


Figure 11. **A**, structure de la glutamate racémase d'*Aquifex pyrophilus* (PDB code : 1B73). **B**, structure de la proline racémase de *Trypanosoma cruzi* (PDB code : 1W61). Les hélices α sont en rouge, les feuillets β en jaune et les boucles en vert. Les résidus catalytiques sont illustrés en bâtonnets avec le C en blanc, le O en rouge, le N en bleu et le S en jaune.

Le mécanisme catalytique de la glutamate racémase se déroule en trois étapes, la première étape consiste en l'abstraction du proton d'un résidu thiol par un résidu basique (aspartate ou histidine). Lors de la deuxième étape le thiolate agit comme une base pour l'abstraction du proton α du glutamate, suivie par la reprotonation de l'autre côté par le deuxième résidu thiol, qui est finalement reprotoné par le deuxième résidu acide (aspartate ou histidine) lors de la troisième étape (Fig. 12).

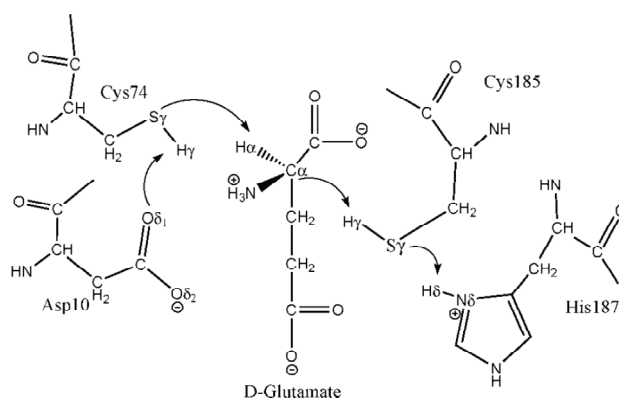


Figure 12. Mécanisme réactionnel de la glutamate racémase. Tiré de (155).

Le glutamate est stabilisé par un réseau de ponts hydrogènes qui solvate le carboxylate et aide à délocaliser la charge négative de l'intermédiaire carbanion (Fig. 13). Le carbanion est également stabilisé par l'interaction avec le groupe ammonium du substrat. Ce dernier revêt également une importance dans la réaction en accompagnant le transfert de protons lors de la catalyse, mais dans la direction opposée, de manière à stabiliser les charges négatives formées (158).

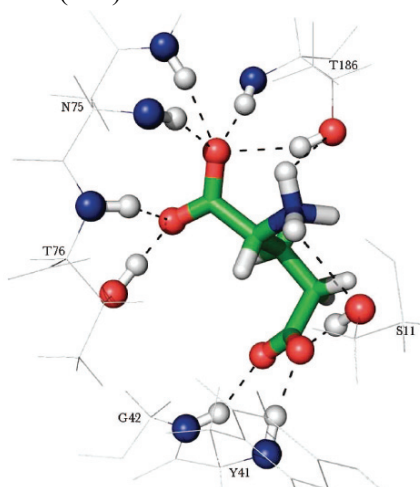


Figure 13. Réseau de ponts hydrogènes stabilisant le substrat dans le site catalytique. Le D-glutamate est illustré en bâtonnets avec le C en vert, le O en rouge et le N en bleu. Tiré de (155).

La raison pour laquelle des résidus thiols sont utilisés par toutes les racémases PLP-indépendantes est curieuse. En effet, les thiols sont de mauvais catalyseurs en milieu aqueux et leur pKa est plus élevé que celui d'un carboxylate, par exemple, ce qui rend leur déprotonation plus difficile

dans la plupart des cas (159). C'est la raison pour laquelle la déprotonation des thiols doit être assistée par des résidus acides (158). Mais les thiols ont l'avantage d'être moins solvatés et sont de meilleurs catalyseurs dans la poche hydrophobe du site catalytique, où la constante diélectrique apparente est plus faible que dans l'eau. Il semble important que la catalyse se déroule dans un environnement avec une faible constante diélectrique car dans ce cas la stabilisation intramoléculaire du carbanion par l'ammonium du substrat est bien plus efficace. Cela explique également pourquoi il est important que le substrat soit enfoui profondément dans la poche hydrophobe de l'enzyme (159).

I.2.3. Les racémases à α -hydroxyacides

I.2.3.1. La mandélate racémase

Divers organismes possèdent la capacité d'utiliser le mandélate comme source de carbone, notamment des levures, des champignons filamenteux et des bactéries. Dans la plupart des cas, ces organismes ne sont capables d'utiliser qu'un seul des deux isomères. Parmi les espèces capables d'utiliser les deux isomères du mandélate, on distingue celles qui possèdent deux mandélate déshydrogénases de stéréosélectivité opposée et celles possédant une seule mandélate déshydrogénase ainsi qu'une mandélate racémase, comme certaines souches de *P. putida* (160).

La mandélate racémase de *P. putida* a été étudiée de manière approfondie. Il s'agit d'une enzyme dépourvue de cofacteur de type PLP mais nécessitant la présence de Mg(II). La mandélate racémase catalyse l'interconversion des isomères du mandélate par un mécanisme de protonation/déprotonation rapide (161). La coupure du lien C-H réalisée par la mandélate racémase n'est pas triviale car le pKa du proton α du mandélate est très élevé, environ 29 (162). L'abstraction du proton et la reprotonation sont réalisées par deux résidus acido-basiques, une lysine et une histidine, de part et d'autre du substrat. Pour réaliser cela, la mandélate racémase stabilise l'intermédiaire énolique très efficacement, accélérant la réaction environ $1,7 \times 10^{15}$ fois. Plusieurs facteurs contribuent à cette stabilisation, le premier est la stabilisation électrostatique du carboxylate par une glycine, une lysine, ainsi que par le cofacteur Mg(II). Ceux-ci permettent de capter la densité électronique par formation de ponts hydrogène lors de la formation de l'intermédiaire énolique. De même, la formation de ponts hydrogènes entre

l' α -hydroxyle et un résidu asparagine de l'enzyme est un facteur important de stabilisation de l'intermédiaire (163). Mais la stabilisation par ponts hydrogène n'est pas suffisante, un dernier facteur de stabilisation indispensable est le substituent aromatique du substrat lui-même, qui permet de délocaliser les électrons de l'intermédiaire énolique (162). Le groupement phényle du mandélate est très efficace pour cela, mais il peut être remplacé par un groupement vinyle ou même un groupement trifluorométhyle, par contre un simple méthyle comme dans le lactate ne suffit pas (164). La comparaison des racémases à acides aminés PLP-indépendantes et de la mandélate racémase nous montre que même si la stabilisation par ponts hydrogène de l'intermédiaire est très importante, cela ne suffit pas à obtenir une catalyse efficace. Une stabilisation interne supplémentaire, par le groupement ammonium de l'acide aminé dans le cas des racémases PLP-indépendantes et par le groupement phényle du mandélate dans le cas de la mandélate racémase, est nécessaire (158, 162).

De nombreuses structures tridimensionnelles de la mandélate racémase native ainsi que des divers mutants ponctuels ont été déterminées (165-169). L'enzyme appartient à la superfamille des énolases, comprenant divers enzymes sans similarité de séquence primaire, mais dont la structure centrale est conservée. La structure typique des enzymes de cette superfamille comporte un domaine de type tonneau $(\beta/\alpha)_7\beta$ qui porte les résidus catalytiques responsables de la catalyse et un domaine $\beta+\alpha$ composé des résidus N- et C-terminaux coiffant le premier domaine et intervenant dans la reconnaissance du substrat (Fig. 14).

Toutes les réactions catalysées par les membres de la superfamille des énolases commencent par l'abstraction d'un proton en α d'un groupe carboxylate, la réaction menant ensuite à différents produits. Dans le cas de la mandélate racémase, la déprotonation est suivie d'une reprotonation, dans le cas de l'énolase on assiste à une déshydratation et dans le cas de l'enzyme de lactonisation du muconate on assiste à la coupure d'un lien C-O (Fig. 15). La présence d'un ou de plusieurs cofacteurs Mg(II) et de résidus catalytiques acido-basiques sont également des caractéristiques centrales des enzymes de cette superfamille. La superfamille comporte actuellement plus de 8000 membres et ce nombre augmente sans cesse au fur et à mesure que de nouveaux membres sont découverts (170).

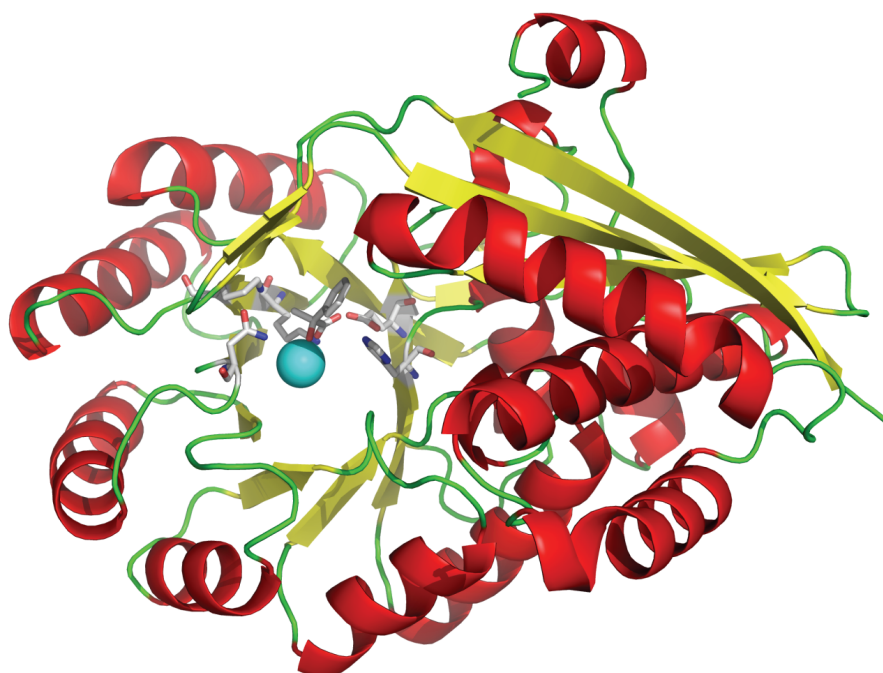


Figure 14. Structure de la mandélate racémase de *P. putida* (PDB code : 1MRA). Les hélices α sont en rouge, les feuillets β en jaune et les boucles en vert. Les résidus catalytiques et l'astrolactate sont illustrés en bâtonnets avec le C en blanc, le O en rouge et le N en bleu. L'ion magnésium est illustré par une sphère cyan.

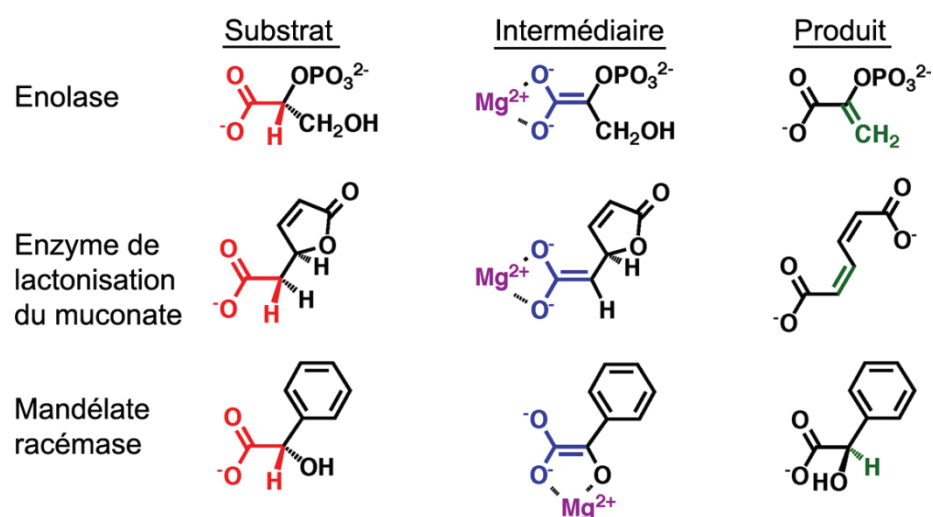


Figure 15. Réactions catalysées par des enzymes de la superfamille des énolases. Adapté de (170).

I.2.3.2. La lactate racémase

La racémisation du lactate a été découverte chez *C. beijerinckii* (anciennement *C. butylicum*) en 1936 (1) et depuis a été mise en évidence chez *C. acetobutylicum* (171), chez certaines bactéries lactiques (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. sakei* et *L. curvatus*) (6, 172), chez *Staphylococcus aureus* (173), chez diverses archées halophiles (*Haloferax volcanii*, *Haloarcula marismortui* et *H. vallismortis*) (174) et chez des bactéries du rumen (*M. elsdenii* et *Se. ruminantium*) (67, 68). Chez les bactéries lactiques, l'activité Lar est induite par le L-lactate et est réprimée par le D-lactate (6, 172). Il semble que le rôle de la racémisation du lactate chez les bactéries lactiques soit de produire du D-lactate pour la synthèse de la paroi, mais la présence chez *L. plantarum* d'une L-Ldh ainsi que d'une D-Ldh rend la présence d'une lactate racémase superflue (6). *L. sakei*, par contre, ne possède pas de D-Ldh et la formation de D-lactate passe donc obligatoirement par la lactate racémase (175).

M. elsdenii est capable de fermenter jusqu'à 97% du DL-lactate présent en acétate, propionate et butyrate (64). Pourtant, *M. elsdenii* ne possède qu'une D-Ldh NAD-indépendante qui lui permet d'oxyder le D-lactate en acétate et une L-lactyl-CoA synthétase qui lui permet de réduire le L-lactate en propionate. En croissance sur du DL-lactate, une lactate racémase est induite par les deux isomères du lactate, ce qui permet à la bactérie d'utiliser ces deux isomères indifféremment (Fig. 16) (68).

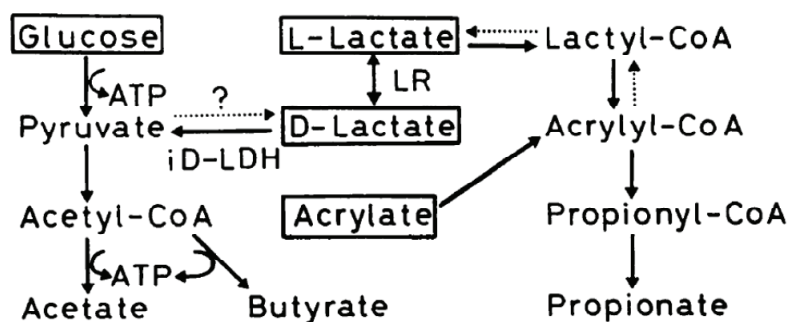


Figure 16. Voies métaboliques produisant des acides gras volatils (butyrate, propionate, acétate) à partir de glucose, de lactate et d'acrylate chez *M. elsdenii*. LR : lactate racémase, CoA : coenzyme A, iD-LDH : D-Ldh NAD-indépendante. Tiré de (68).

Se. ruminantium, une autre bactérie présente dans le rumen, est capable de produire et de consommer du D-lactate, alors qu'elle ne possède qu'une L-Ldh NAD-dépendante et une L-Ldh NAD-indépendante produisant et

consommant le L-lactate, respectivement. Ceci s'explique également par la présence d'une lactate racémase chez cette espèce (Fig. 17) (176).

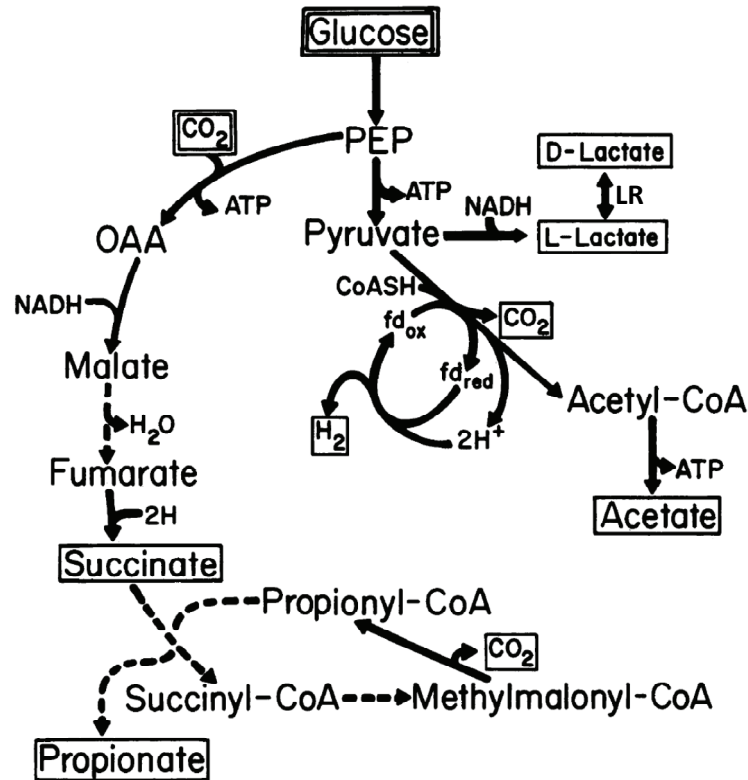


Figure 17. Voies métaboliques produisant des acides gras volatils (propionate, acétate) à partir de glucose chez *Se. ruminantium* HD4. En traits plein, les réactions enzymatiques détectées dans les extraits cellulaires. En pointillés, les réactions enzymatiques supposées présentes. LR : lactate racémase, CoA : coenzyme A, PEP : phosphoénolpyruvate, OAA : oxaloacétate, fd_{ox} : ferrédoxine oxydée, fd_{red} : ferrédoxine réduite. Tiré de (67).

Chez *C. acetobutylicum* on observe l'inverse, la bactérie ne possède qu'une D-Ldh mais est capable de produire et de consommer le L-lactate grâce à l'action d'une lactate racémase induite par le DL-lactate (177). Finalement, chez certaines archées halophiles, la présence d'une activité de racémisation du lactate a été rapportée. Chez *Hx. volcanii*, la présence d'une lactate racémase semble liée à la consommation d'acide lactique, en effet la lactate racémase est induite par le lactate et la bactérie possède une activité d'oxydation du D- et L-lactate mais aucune activité de réduction du pyruvate. Chez *H. marismortui* et chez *H. vallismortis*, l'activité lactate racémase

semble constitutive et pourrait être liée tant à la production qu'à la consommation de lactate (174).

Bien que l'activité Lar ait été décrite de nombreuses fois, seules les enzymes de *L. sakei* et *C. beijerinckii* ont été purifiées et caractérisées (4, 5). Des purifications partielles ont également été réalisées pour les enzymes d'autres espèces. Les poids moléculaires estimés varient entre 25 kDa et 82,4 kDa suivant l'espèce et la technique utilisée (4, 5, 172). Toutes les enzymes étudiées semblent sensible à l'oxygène, mais l'ajout d'agents réducteurs (glutathion, cystéine, β -mercaptoéthanol ou acide L-ascorbique) permet de conserver l'activité Lar d'un extrait cellulaire brut (5, 172). Aucun cofacteur n'a été identifié pour l'enzyme Lar de *L. sakei* et de *C. beijerinckii* (4, 5), alors que chez *C. acetobutylicum* la pyridoxamine 5'-phosphate a un effet stimulant sur l'activité Lar mesurée dans des extraits bruts (178). Certains ions métalliques ont également un effet stimulant sur l'activité Lar : le Fe(II) chez *L. sakei* et chez *C. acetobutylicum* (4, 178), le Mn(II) et le Mg(II) chez *C. beijerinckii* (5).

Certains paramètres cinétiques de la lactate racémase ont été déterminés : K_m = 17 mM pour le D-lactate et 80 mM pour le L-lactate chez *L. sakei* (4), des K_m identiques chez *C. beijerinckii* (5). L'optimum de pH de l'enzyme Lar se situe entre 5,8 et 6,2 chez *L. sakei* (4), vers 5,5 chez *C. beijerinckii* (179) et entre 9,0 et 10,0 chez *H. volcanii* (174).

Une étude mécanistique plus poussée a été réalisée sur la lactate racémase de *C. beijerinckii* partiellement purifiée (180). Le mécanisme proposé est un transfert d'hydrure intramoléculaire (Fig. 18), basé sur les observations suivantes:

- Un effet isotopique primaire a été observé avec du deuteriolactate. L'oxygène α n'est pas échangé avec le milieu durant la réaction, montrant que la coupure du lien C-H en α est l'étape limitante de vitesse (180).
- Le proton α n'est pas échangé avec le milieu durant la réaction, ce qui est peu compatible avec l'hypothèse d'un transfert de proton (180).
- La réaction de racémisation est inhibée par l'hydroxylamine, indiquant l'existence d'un intermédiaire de réaction de type carbonyle (179, 181).

- En présence d'hydroxylamine, cet intermédiaire est lié à l'enzyme sous forme d'oxime et la réduction de cet intermédiaire par le NaBH_4 en présence de lactate produit du lactaldéhyde, suggérant la présence du carbonyle en α du lactate (179).

Cependant, l'hypothèse du transfert d'hydrure est basée sur le fait que le mécanisme de la lactate racémase pourrait être proche de celui proposé à l'époque pour la glyoxalase I, qui catalyse une réaction d'isomérisation produisant du D-lactate (Fig. 41 p. 62), l'hypothèse d'un mécanisme de déprotonation/reprotonation n'ayant même pas été envisagée par les auteurs (5, 180). Néanmoins, ces observations ne permettent pas d'éliminer définitivement l'hypothèse d'un mécanisme de transfert de proton, comme cela a d'ailleurs été montré plus tard pour la glyoxalase I (182). En effet, le proton de la glyoxalase est également très peu échangé avec le solvant, montrant par là que l'absence d'échange du proton avec le milieu n'est pas incompatible avec un mécanisme de transfert du proton (183).

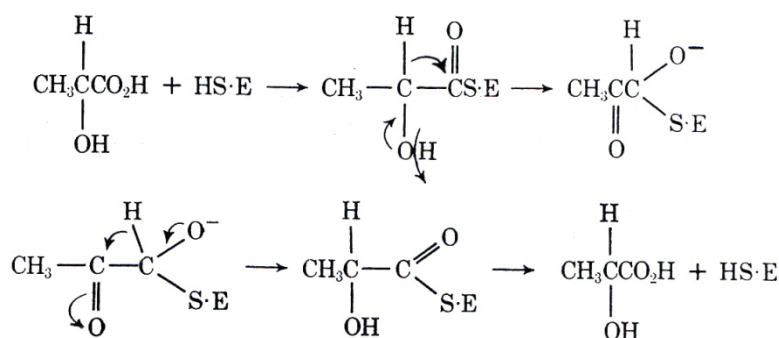


Figure 18. Mécanisme catalytique de la lactate racémase par transfert intramoléculaire d'hydrure. Tiré de (179).

Dans le cas d'un transfert de proton, le proton du carbone α doit être suffisamment acide pour permettre son abstraction par une base de l'enzyme. La valeur de la constante d'acidité (pK_a) du proton sur le carbone α n'a pas été mesurée mais devrait vraisemblablement être ≈ 3 unités plus grande que celle du proton α du mandélate, qui est égale à 29 (162, 184). Le pK_a du proton α du lactate devrait donc avoir une valeur d'environ 32, indiquant que ce proton n'est pas considéré comme acide, rendant le mécanisme de déprotonation plus difficile que pour d'autres racémases. La mandélate racémase, qui est pourtant capable de racémiser le trifluorolactate, ne possède aucune activité lactate racémase (164). Dans le cas où la lactate racémase fonctionnerait par déprotonation/reprotonation, l'enzyme devrait

donc réaliser une stabilisation de l'intermédiaire encore meilleure que celle réalisée par la mandélate racémase, qui est pourtant déjà remarquable en soi (162). Il semble donc que la racémisation du lactate par déprotonation/reprotonation soit pratiquement « mission impossible » pour la lactate racémase.

I.2.4. Les lactate déshydrogénases

Nous nous intéresserons brièvement au mécanisme catalytique des Ldhs car ces enzymes sont impliquées dans la production et l'utilisation du lactate et sont parfois intimement liées à l'activité lactate racémase. De plus, l'oxydation/réduction de lactate par des Ldhs de stéréosélectivité opposée peut être à l'origine d'une activité de racémisation du lactate. Selon le type de cofacteur utilisé, on différencie les Ldhs NAD(P)-dépendantes et les Ldhs NAD(P)-indépendantes, qui regroupent les Ldhs FMN-dépendantes et FAD-dépendantes (3, 185). Les Ldhs NAD(P)-dépendantes sont principalement liées à la production de lactate, alors que les Ldhs NAD(P)-indépendantes sont plutôt liées à son utilisation (3, 41). Parmi les Ldhs NAD(P)-indépendantes, la L-Ldh FMN-dépendante de *S. cerevisiae* est sans conteste la mieux étudiée (Fig. 19). Deux mécanismes catalytiques de déshydrogénation du lactate ont été formulés et testés depuis de nombreuses années et sont toujours débattus actuellement, même si un consensus sur un des deux mécanismes s'installe (186).

Le premier mécanisme envisagé est l'abstraction du proton en α par une base de l'enzyme, générant un intermédiaire de type carbanion. Ce carbanion transfère ensuite deux électrons à la flavine, qui en ainsi réduite, et perd ensuite un deuxième proton pour former le pyruvate (Fig. 20a). L'autre mécanisme catalytique implique l'abstraction du proton de l'hydroxyle en α , suivi du transfert d'un hydrure directement du lactate vers la flavine (Fig. 20b) (187). Parmi les arguments avancés favorables au mécanisme catalytique par abstraction de proton en α il y a le fait que le pKa du groupe qui accepte le proton α du lactate (pKa 9) correspond plutôt au pKa d'une histidine (pKa 6) qu'au pKa du N₅ de la flavine (pKa 20)(188). Il a également été observé que la mutation de l'acide glutamique interagissant avec l'histidine 373 faisait chuter le pKa du groupe accepteur de proton d'une unité pH, soutenant l'hypothèse que l'histidine 373 est responsable de l'abstraction du proton α (Fig. 19) (189).

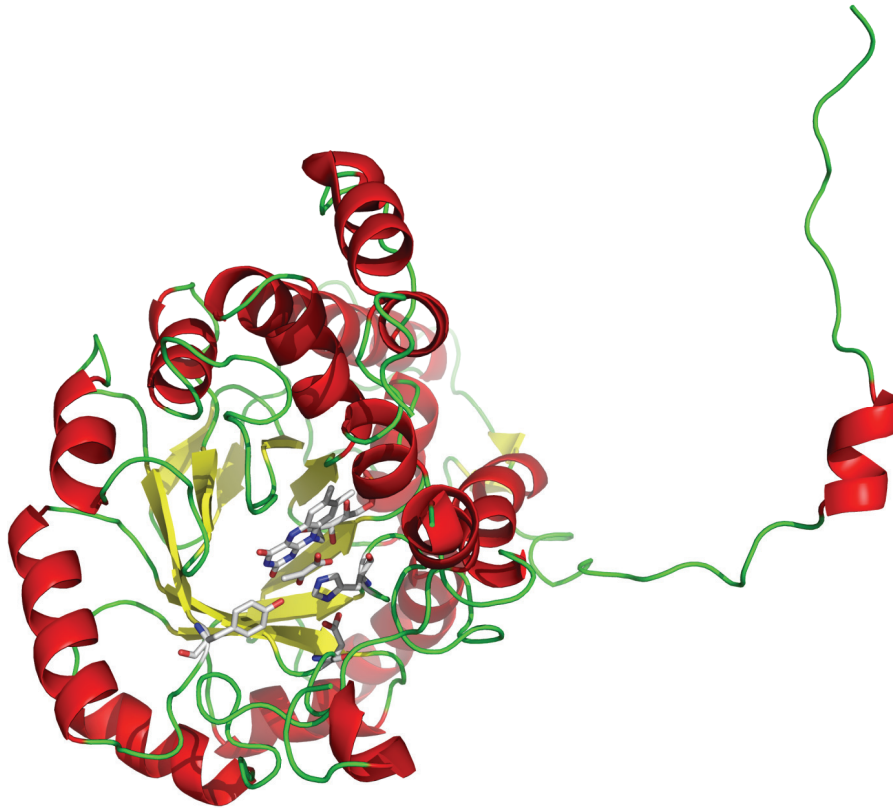


Figure 19. Structure de L-Ldh FMN-dépendante de *S. cerevisiae* (PDB code : 1FCB). Les hélices α sont en rouge, les feuillets β en jaune et les boucles en vert. Les résidus catalytiques, le pyruvate et la flavine mononucléotide sont illustrés en bâtonnets avec le C en blanc, le O en rouge et le N en bleu.

D'autres arguments suggèrent par contre qu'un transfert d'hydrure correspondrait mieux à la réalité. Notamment le fait que la réaction puisse être catalysée par un analogue à la flavine, la 5-déazaflavine, connu pour n'accepter que des hydrures (190) ou alors la combinaison d'effets isotopiques du substrat et du solvant obtenus avec l'enzyme sauvage et une enzyme mutée (191). Finalement, c'est la résolution de la structure d'une enzyme mutée qui a permis de déterminer, par analogie avec le mode de liaison du phénylglyoxylate, le mode de liaison du lactate dans le site catalytique et confirmer le transfert d'hydrure comme étant le mécanisme catalytique correct (192). Des simulations informatiques du mécanisme catalytique ont par ailleurs confirmé que ce mécanisme était le plus cohérent dans le cadre de l'oxydation du lactate (187).

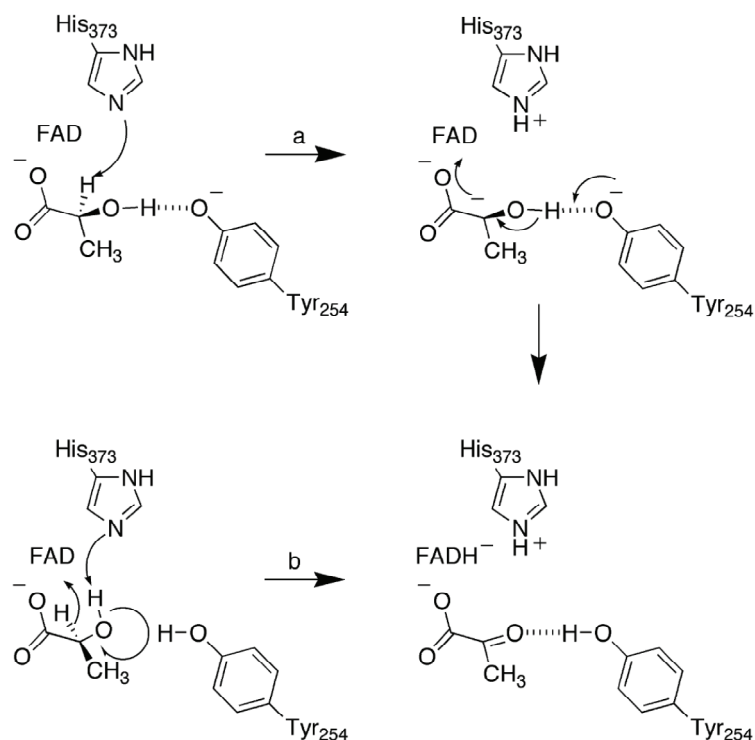


Figure 20. Mécanismes d'oxydation du lactate par la Ldh FAD-dépendante. Mécanisme a, abstraction du proton α par His373. Mécanisme b, abstraction du proton de l'hydroxyle, avec transfert d'hydrure. Tiré de (191).

I.2.5. Conclusion : mécanismes de racémisation

Les exemples de racémases qui ont été présentés illustrent les différents moyens utilisés par celles-ci afin de diminuer le pKa de leur proton en α , qui est ensuite abstrait par une base de l'enzyme pour générer l'intermédiaire carbanion. Dans le cas des racémases PLP-dépendantes, la formation d'un iminium entre le substrat et le cofacteur PLP permet d'acidifier le proton. Dans le cas des racémases PLP-indépendantes, cette fonction est réalisée par la stabilisation intramoléculaire et les ponts hydrogènes, et dans le cas de la mandélate racémase, ce sont les ponts hydrogènes, la stabilisation intramoléculaire et le cofacteur Mg(II) qui acidifient le proton.

Par contre, le mécanisme utilisé par les Ldhs implique le transfert de l'hydrogène α sous forme d'hydrure et non sous forme de proton. La présence d'une base est néanmoins nécessaire afin d'abstraire le proton de l'hydroxyle en α . Vu que dans tous les cas une catalyse acido-basique est nécessaire, il est parfois difficile de discriminer un mécanisme par

abstraction de proton d'un mécanisme par transfert d'hydrure. Ceci est d'ailleurs bien illustré par le débat, aujourd'hui résolu, sur le mécanisme catalytique des lactates déshydrogénases.

Par analogie avec le mécanisme catalytique des Ldhs, on pourrait imaginer que la lactate racémase utilise un mécanisme catalytique par transfert d'hydrure. Les données obtenues avec la lactate racémase de *C. beijerinckii* vont dans le sens de cette hypothèse (180). Dans ce cas, la lactate racémase serait la première racémase à utiliser un mécanisme de ce type pour la racémisation de son substrat. Cependant, par analogie avec la glyoxalase I on pourrait aussi imaginer un mécanisme catalytique par abstraction de proton où les protons sont protégés du milieu et ne seraient donc pas échangés avec celui-ci. Mais dans ce cas, l'acidification du proton nécessiterait une stabilisation de l'intermédiaire carbanion encore plus efficace que celle réalisée par la mandélate racémase.

I.3. Troisième partie : le nickel et les enzymes à nickel

I.3.1. Généralités

I.3.1.1. Le nickel dans la cellule

Les éléments chimiques essentiels à la vie sont répartis en trois grandes catégories : les éléments majoritaires (H, C, N, O, P, S), les macrominéraux (Na, K, Mg, Ca, Cl...) et les éléments traces dont font partie les métaux de transitions (Fe, Zn, Cu, Mo, Ni, Co, Mn...) (193). Bien qu'ils soient utilisés en très faible quantité, on parle en général de mg ou de µg par kg de matière organique, les éléments traces sont essentiels à la vie de tous les organismes. A l'exception du fer et du zinc, qu'on pense être utilisés par tous les organismes vivants, tous les autres éléments traces sont utilisés par une large gamme d'organismes tant chez les eucaryotes que chez les procaryotes. De plus, tous les métaux ne sont pas utilisés dans les mêmes proportions dans tous les règnes du vivant. Ainsi, on peut voir que le nickel est employé par environ 80% des archées, 60% des bactéries et seulement 30% des eucaryotes dont le génome a été séquencé (Fig. 21) (194).

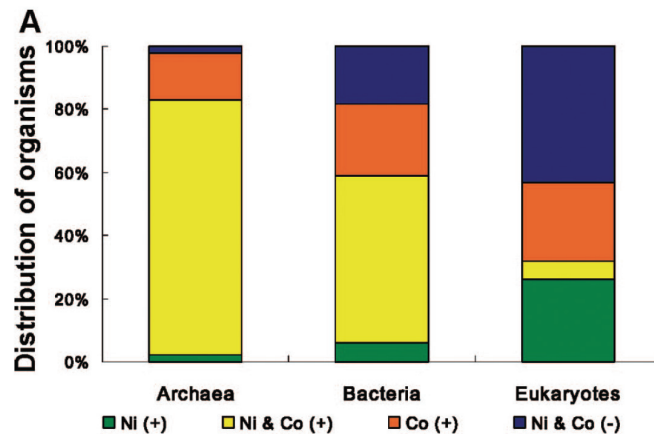


Figure 21. Occurrence de gènes d'utilisation du nickel et du cobalt dans les trois domaines de la vie. Ni(+) ou (-) : organismes utilisant (+) ou n'utilisant pas (-) de nickel. Co(+) ou (-) : organismes utilisant (+) ou n'utilisant pas (-) de cobalt. Tiré de (194).

L'importance des ions métalliques provient du fait qu'ils confèrent à certaines protéines les propriétés catalytiques et structurales indispensables à leur activité (193). Les ions métalliques inertes du point de vue redox, tels le magnésium et le zinc, servent généralement à stabiliser des charges négatives ou à activer des substrats grâce à leur caractéristique d'acides de Lewis, tandis que les ions métalliques actifs du point de vue redox servent comme acides de Lewis mais également comme centres redox. Parmi ces derniers, le plus commun est le fer, suivi du manganèse, du cobalt, du molybdène, du cuivre et du nickel. On voit que les enzymes à nickel se situent parmi les groupes comptant le moins de représentants (Fig. 22), on compte en effet seulement 8 enzymes nickel-dépendantes (195).

Une manière de contrôler la réactivité des ions métalliques redox-actifs est de les associer avec des cofacteurs organiques, comme c'est souvent le cas pour le cobalt et le molybdène et plus rarement le cas pour le fer et le nickel (196). Une seule enzyme à nickel utilise un cofacteur organique pour coordonner du nickel, la méthyle-coenzyme M réductase (MCR) avec le F₄₃₀, un tétrapyrrole. Les autres enzymes à nickel possèdent soit un site mononucléaire Ni, soit un site dinucléaire NiNi ou NiFe, soit un site plus complexe composé de Ni, de Fe et de S (Table 5) (195). Pour une description plus détaillée des enzymes à nickel, voir point I.3.3.

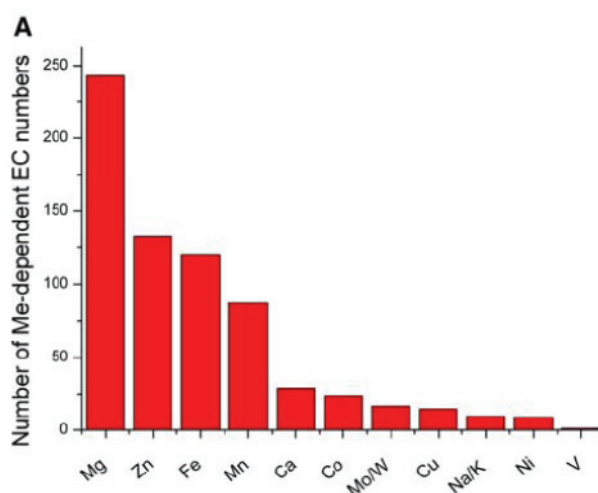


Figure 22. Occurrence des ions métalliques catalytiques dans les enzymes de structure connue. Les barres représentent le nombre de numéros EC d'enzymes dont la structure est connue et qui lient l'ion métallique catalytique correspondant. Tiré de (196).

Table 5. Liste des enzymes nickel-dépendantes connue. Traduit de (7)(196)

Métallocentre	Enzyme	Fonction	Occurrence chez les bactéries	Occurrence chez les archées
Mononucléaire				
[Ni]	Glyoxalase I	glutathion + méthylglyoxal → S-D-lactoylglutathion	NS	NS
[Ni]	Superoxyde dismutase	$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	4 %	0 %
[Ni]	Aciréductone dioxygénase	aciréductone ^a + O ₂ → HCOOH + CO + méthylthiopropionate	NS	NS
Dinucléaire				
[NiNi]	Uréase	urée + 2H ₂ O → H ₂ CO ₃ + NH ₃	34 %	11 %
[NiFe]	Hydrogénase	H ₂ ↔ 2H ⁺ + 2e ⁻	31 %	70 %
Complexe				
[Ni-4Fe-4/5S]	CO-déshydrogénase	CO + H ₂ O ↔ CO ₂ + 2e ⁻ + 2H ⁺	7 %	19 %
[Ni-Ni-4Fe- 4S]	Acetyl-CoA ^b synthase/décarbonylase	CO + CH ₃ - Co(III)P ^c + CoA - SH ↔ CH ₃ - CO - S - CoA + Co(I)P	2 %	32 %
Tétrapyrrole				
F ₄₃₀ [Ni]	Méthyle-coenzyme M réductase	CH ₃ - S - CoM ^d + CoB - SH ^e → CH ₄ + CoB - S - S - CoM	0 %	38 %

NS pour « non-spécifique », signifie que l'enzyme utilise également d'autres ions métalliques que le nickel.
^a 1,2-dihydroxy-3-céto-5-méthylthiopentane

^b CoA est le coenzyme A

^c P est une protéine à corrinolde/fer-soufre

^d CoM - SH est le coenzyme M ou thioéthanesulfonate et CH₃ - S - CoM est la forme méthylée

^e CoB-SH est le coenzyme B ou N-7-mercaptopheptanoylthréonine phosphate

Les enzymes à nickel les plus courantes chez les bactéries sont l'uréase et la [NiFe]-hydrogénase, qu'on retrouve dans 34% et 31% des génomes analysés, respectivement. Les autres enzymes à nickel ont une répartition plus limitée (<8% des génomes analysés) et sont distribuées en mosaïque (7). Chez les archées, la distribution est différente, la [NiFe]-hydrogénase est la plus représentée des enzymes à nickel (70% des génomes analysés), suivie de la MCR (38% des génomes analysés), qu'on retrouve exclusivement chez les archées (7).

I.3.1.2. L'import du nickel

La biosynthèse des enzymes à nickel dépend du transport actif de nickel dans la cellule, la concentration habituelle dans l'environnement étant très basse, environ 92 nM dans l'eau de mer par exemple (197). Le système le mieux étudié est le transporteur à nickel de type ABC (pour ATP-binding cassette) NikABCDE. Ce transporteur est composé d'une protéine périplasmique (NikA), de deux protéines membranaires (NikB et NikC) et de deux ATPases (NikD et NikE) (Fig. 23). Un autre transporteur à nickel de type ABC, NikMNQO, est souvent trouvé à côté des gènes de l'uréase dans les génomes bactériens (Fig. 23) (7). Ce second type de transporteur est composé de trois protéines membranaires NikQ, NikM et NikN, dont les deux dernières sont parfois fusionnées en Nik(MN). La protéine NikM semble être plutôt impliquée dans la reconnaissance du nickel, alors que la protéine NikQ posséderait un site de liaison à l'ATPase cytoplasmique NikO. NikN est parfois remplacée par NikL chez certaines protéobactéries et cyanobactéries (198).

Un autre transporteur de type ABC, connu pour transporter des sidérophores, semble être impliqué dans le transport du nickel et du cobalt chez *Helicobacter mustelae* en association avec un transporteur à nickel TonB-dépendant situé dans la membrane externe (Fig. 23) (199) et il pourrait donc y avoir encore d'autres transporteurs à nickel et cobalt de ce type.

Des transporteurs secondaires sont également impliqués dans le transport du nickel. Les perméases à nickel et/ou cobalt NiCoT (aussi appelés HoxN, HupN, NicT, NixA ou NhlF dans divers organismes) sont des perméases à 8 traverses transmembranaires fort répandues au sein des bactéries et qu'on retrouve également chez certaines archées et mycètes. Plusieurs sous-types de NiCoT transportent préférentiellement le nickel ou le cobalt ou les deux sans distinction (Fig. 23) (7).

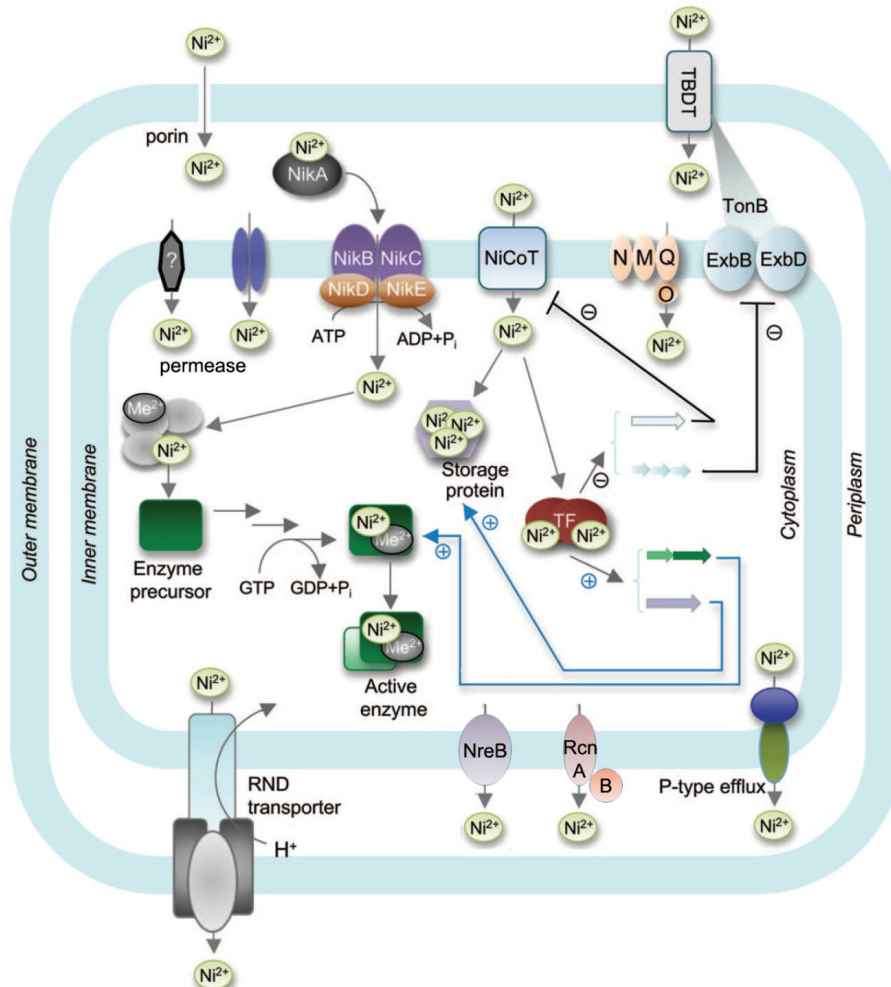


Figure 23. Schéma des différents systèmes impliqués dans l'homéostasie du nickel, illustrée ici chez une bactérie à Gram négatif. TF : facteur de transcription, TBDT : transporteur TonB-dépendant, RND : protéine de la famille des « heavy metal Resistance-Nodulation-Division », NiCoT : transporteur à nickel et/ou cobalt. Les flèches bleues et noires indiquent une induction et une répression de l'expression, respectivement. Adapté de (8).

Les protéines de type UreH sont des perméases à nickel à 6 traverses transmembranaires qu'on retrouve dans des opérons uréase ou ailleurs dans certains génomes. Les perméases à 6 traverses membranaires de type HupE/UreJ sont également fort répandues au sein des bactéries et sont souvent associées à des gènes de l'uréase ou de la [NiFe]-hydrogénase (Fig. 23). La particularité de ces perméases, quand elles sont associées à des gènes

de l'uréase ou de la [NiFe]-hydrogénase, est le fait que le transport du nickel semble être spécifiquement lié à son incorporation dans les métallochaperones correspondantes. Dans de nombreuses cyanobactéries, des protéines associées aux gènes de la superoxyde dismutase (SOD) Ni-dépendante sont prédites comme étant des perméases à nickel, même si cela n'a pas encore été prouvé expérimentalement (200). Il semble donc que l'import du nickel soit le fait d'une large variété de transporteurs et le fait qu'on retrouve des protéines à nickel, mais pas de transporteurs à nickel, dans de nombreux génomes bactériens montre qu'il y a encore probablement de nombreux transporteurs à nickel à découvrir (7).

I.3.1.3. L'homéostasie du nickel

Afin de ne pas perturber l'homéostasie du fer, le nickel ne doit pas s'accumuler dans la cellule. Chez *E. coli*, par exemple, la concentration intracellulaire de nickel est de 5 μ M seulement (197). Pour cela des enzymes de stockage de nickel sont utilisées, qui permettent de lier de nombreux ions nickel avec une haute capacité (Fig. 23). UreE est la protéine de stockage et d'insertion du nickel associée à l'uréase. L'UreE de *Klebsiella aerogenes* contient 10 histidines résidus parmi ces 15 acides aminés finaux et lie 6 ions nickel. D'autres UreE ne possèdent pas cette région riche en histidine qui permet de stocker le nickel, mais peuvent néanmoins toujours activer l'uréase (201).

Dans le cas de l'hydrogénase, c'est la métallochaperone HypB qui est responsable de la liaison et l'insertion de nickel. Celle-ci possède parfois aussi une région riche en histidine, comme l'HypB de *Bradyrhizobium japonicum* qui possède 24 histidines parmi ses 39 premiers résidus, ce qui permet la liaison de 9 ions nickel par monomère (202). D'autres HypB, comme celle de *E. coli*, ne possèdent pas cette région et ne lient qu'un ion nickel. Dans ce cas, la protéine SlyD, appartenant à la famille des peptidylprolyl isomérases et possédant un domaine C-terminal capable de lier plusieurs ions métalliques, permet de stocker le nickel et contribue à l'insertion du nickel dans l'hydrogénase (195, 203). *He. pylori* possède une métallochaperone particulière, HspA, homologue à la protéine « heat shock » GroES mais possédant un domaine C-terminal riche en histidines liant le nickel. HspA est impliquée dans la séquestration du nickel intracellulaire et dans l'insertion de nickel dans l'hydrogénase (204). Deux autres protéines riches en histidines d'*He. pylori*, Hpn et Hpn-like, sont impliquées dans le stockage et la détoxification du nickel. Hpn relargue son

nickel à faible pH et Hpn-like est induite à faible pH, laissant penser que ces protéines seraient impliquées dans la régulation de l'activité uréase en fonction du pH. En effet, l'activité uréase permet justement de tamponner le milieu à bas pH (205).

L'opéron codant pour la CO-déshydrogénase (CODH) possède également un gène codant pour une protéine de stockage du nickel, CooJ, qui possède 16 histidines parmi ses 34 acides aminés finaux et lie 4 ions nickel par monomère. CooJ semble responsable de la liaison et l'insertion du nickel dans l'apo-CODH (201).

Quand la concentration en métaux lourds devient trop importante, le surplus doit être excrété hors de la cellule. Les bactéries à Gram négatif utilisent pour cela trois mécanismes principaux. Les représentants de la famille des protéines RND (« heavy metal Resistance-Nodulation-Division ») s'étendent de l'intérieur de la cellule à l'extérieur à travers le périplasme et utilisent un mécanisme d'antiport avec des protons pour pomper les ions métalliques hors de la cellule (Fig. 23). La famille des facilitateurs de diffusion cationique utilisent également un mécanisme d'antiporteur avec des protons, avec la différence qu'ici les ions sont seulement transportés à travers la membrane cytoplasmique. Finalement, les ATPases de type P utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour catalyser l'efflux des cations métalliques au travers de la membrane cytoplasmique (Fig. 23) (206). Les protéines de type RND adaptées au transport du nickel sont plutôt rares et se retrouvent principalement chez des espèces adaptées aux milieux riches en nickel. De même, les protéines de la famille des facilitateurs de diffusion cationique ou les ATPases de type P ne sont que rarement impliquées dans la détoxification du nickel. Quelques espèces bactériennes utilisent des protéines de type NreB ou CnrT, qui sont des protéines membranaires à 14 ou 12 traverses transmembranaires appartenant à la superfamille MFS (« Major Facilitator Proteins »). Ces transporteurs possèdent un domaine C-terminal riche en histidines et exportent le nickel à travers la membrane cytoplasmique (Fig. 23) (206). Plus récemment, un exportateur à nickel à deux composantes, RcnAB, a été découvert chez *E. coli*. RcnA code pour une perméase à 6 traverses transmembranaires et RcnB code pour une protéine périplasmique modulant l'activité de RcnA (Fig. 23) (207, 208).

I.3.1.4. La régulation Ni-dépendante

Les protéines métallorégulatrices sont principalement divisées en deux groupes : un groupe responsable de réguler l'import des métaux essentiels et l'autre groupe responsable de la régulation de l'export des ions métalliques indésirables. Parmi le premier groupe, les régulateurs sensibles au nickel sont NikR, Nur et NimR, alors que les régulateurs de la famille ArsR de *Mycobacterium tuberculosis*, NmtR et KmtR et les régulateurs RcnR, NcrB et InrS font partie du deuxième groupe (209). Certains régulateurs contrôlent des gènes qui ne sont pas directement impliqués dans la régulation de transporteurs à nickel, comme SmnRQ qui contrôle l'expression d'une SOD Fe-dépendante et Mua qui régule l'expression de l'uréase (210, 211).

Le régulateur Nur, un membre de la famille de régulateurs Fur (« ferric-uptake regulator »), contrôle l'homéostasie du nickel chez *Streptomyces coelicolor* en réprimant l'expression des gènes *nikABCDE* codant pour un transporteur à nickel et en induisant l'expression des gènes codant pour la SOD Ni-dépendante en présence de nickel (212). Nur est une protéine dimérique possédant deux sites de liaison métalliques, un non-spécifique et l'autre spécifique pour le nickel (Fig. 24A) (213).

NikR est le représentant d'une famille de régulateurs Ni-dépendants largement répandus au sein des bactéries. Comme Nur, NikR réprime l'expression des gènes *nikABCDE* en présence de nickel. Par contre, NikR est un tétramère en solution et possède deux sites de liaison au nickel. Un premier site à très haute affinité pour le nickel favorise la liaison du régulateur à l'ADN et le second site, de moins haute affinité pour le nickel, augmente encore l'étendue et la force de l'interaction ADN-protéine (212). La structure du complexe NikR-ADN a été résolue et bien que le site à très haute affinité soit bien déterminé, le deuxième site de liaison du nickel n'a pas été observé (Fig. 24C) (214).

Les régulateurs NmtR et KmtR sont tous deux impliqués dans la régulation d'exportateurs à nickel chez *My. tuberculosis*. NmtR (Fig. 24B) contrôle l'expression de NmtA, une ATPase de type P, en réponse à une haute concentration en nickel ou cobalt. KmtR contrôle l'expression d'un membre de la famille des facilitateurs de diffusion cationique, Cdf (209, 215). RcnR est un régulateur tétramérique qui déréprime l'expression de l'exportateur à nickel et cobalt, RcnAB, en présence d'une concentration élevée de ces ions. RcnR parvient à discriminer le nickel et le cobalt des autres ions métalliques

en liant ces ions avec une géométrie différentes des autres, l'amine N-terminale et une histidine étant impliquées dans cette discrimination (216).

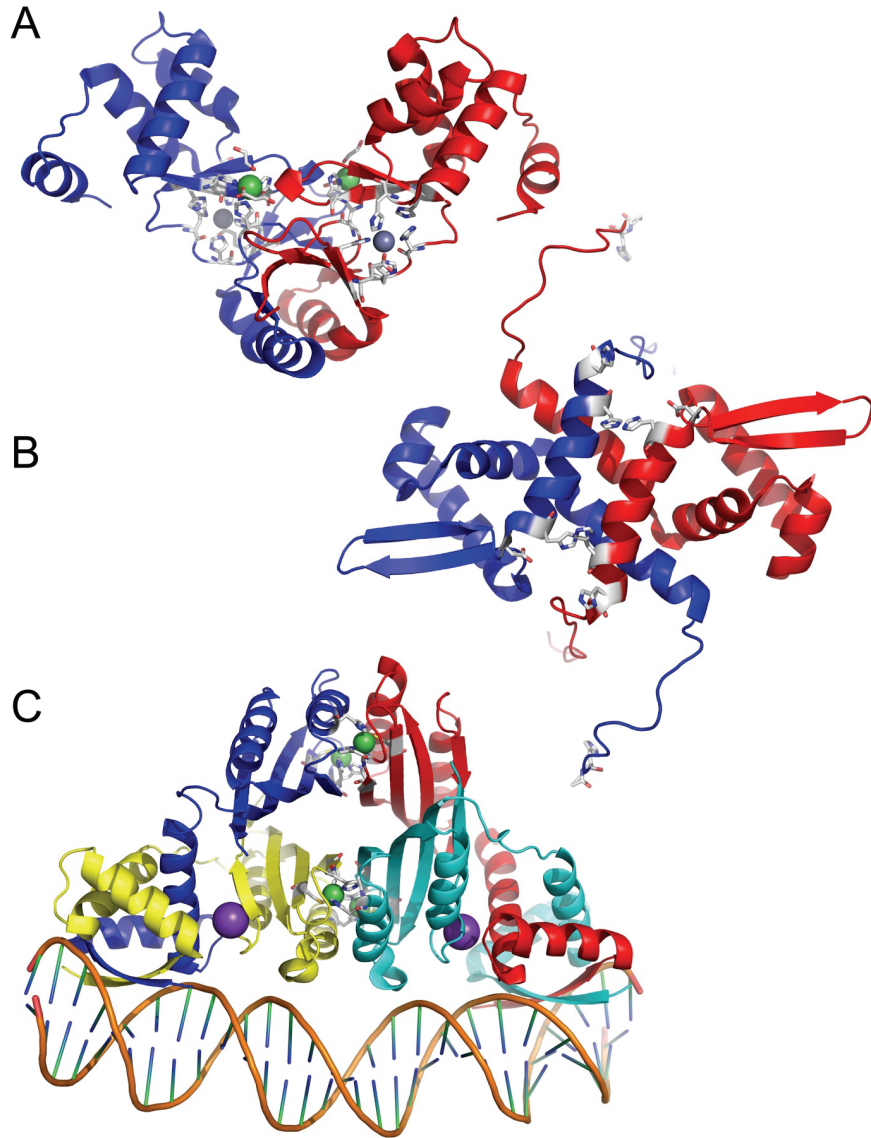


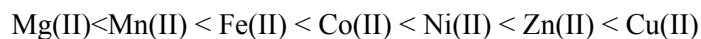
Figure 24. **A**, structure de Nur de *Sm. coelicolor* (PDB code : 3EYY). **B**, structure de NmtR de *My. tuberculosis* dans la forme apo (PDB code : 2LKP). **C**, structure du complexe de NikR d'*E. coli* avec son site opérateur (PDB code : 2HZV). Chacun des monomères est dans une couleur différente, bleue, rouge, jaune ou cyan. Les acides aminés et autres ligands impliqués dans la liaison du nickel sont illustrés en bâtonnets avec le C en blanc, le O en rouge, le N en bleu et le S en jaune. Les ions métalliques sont illustrés en sphères avec le Ni en vert, le Zn en gris et le K en violet.

NcrB est un régulateur nickel-dépendant qui ne possède pas d'homologie avec les autres régulateurs transcriptionnels mais est riche en histidines et possède un domaine « leucine zipper » qui pourrait interagir avec l'ADN (217).

Chez les cyanobactéries, deux régulateurs sont impliqués dans l'export du nickel. Le système à deux composants NrsR/NrsS est responsable de la régulation du nickel périplasmique et le régulateur InrS, ressemblant à RcnR, régule le nickel cytoplasmique. InrS possède une constante d'affinité très faible, environ 2×10^{-14} M, ce qui a pour résultat de maintenir la concentration intracellulaire en nickel quasiment nulle (218).

I.3.2. La spécificité pour le nickel

Tout au long de la série des métaux de transition la taille des ions diminue, tandis que l'affinité de l'ion métallique pour les électrons augmente (inversé pour le zinc). En conséquence, l'affinité relative du métal pour les atomes non-métalliques ou les anions qui peuvent donner ou partager des électrons augmente. Ainsi la série d'Irving-Williams classe les métaux en fonction de leur capacité d'interaction avec les ligands (219).



En général, l'affinité des métaux pour les métalloprotéines suit l'ordre défini par cette série. Ainsi, le cuivre et le zinc ont souvent des affinités plus fortes pour la majorité des métalloprotéines que les autres métaux. Afin d'éviter que les métaux à plus haute affinité ne viennent prendre la place des autres ions métalliques, la cellule doit pouvoir déterminer quel ion se lie à quelle métalloprotéine. Plusieurs stratégies permettent à la cellule d'insérer l'ion métallique correct dans les métalloprotéines correspondantes.

La première stratégie est l'utilisation de transporteurs favorisant la présence dans le cytoplasme d'ions de moindre affinité pour les protéines. Le Mg(II), le Mn(II) et le Fe(II) sont donc fortement importés dans la cellule, alors que le Cu(II) et le Zn(II) sont plutôt exportés. Le Co(II) et le Ni(II), d'une affinité intermédiaire, sont soit importés soit exportés, en fonction de la concentration extracellulaire. Les régulateurs participent à cette régulation de la concentration en ions métalliques en liant leurs métaux respectifs avec une affinité adaptée à la concentration cellulaire optimale. Les régulateurs de Cu(II) et de Zn(II), par exemple, ont une affinité pour leur ion métallique de

10^{-21} M et 10^{-15} M, respectivement (Fig. 25). Au-delà de cette concentration, les exportateurs sont activés et empêchent l'accumulation de ces ions métalliques (220). Chez *E. coli*, l'import de nickel est activé quand la concentration intracellulaire en nickel est inférieure à 10^{-12} M, mais le nickel est exporté si la concentration augmente au delà de 10^{-8} M (Fig. 25), ce qui maintient la concentration intracellulaire en nickel entre ces deux valeurs (221). Pour terminer, les régulateurs à Mg(II) et à Mn(II) ont une affinité pour leurs ions de 10^{-3} M et 10^{-5} M environ, ce qui correspond à la concentration intracellulaire de ces ions (Fig. 25) (220).

Une deuxième stratégie consiste à adapter la demande (les métalloprotéines) à l'offre (les ions métalliques). Ainsi, quand certains ions métalliques sont en excès, la cellule favorise l'expression des protéines qui lient ces ions et réprime l'expression des autres métalloprotéines. Ceci est surtout possible quand la même fonction peut être remplie par plusieurs métalloprotéines différentes, comme c'est par exemple le cas des SODs Ni-dépendante et Fe-dépendante de *Sm. griseus*, qui sont régulées en fonction des ions présents (210). Mais la bactérie peut également produire des protéines de stockage qui vont séquestrer les ions en excès, les empêchant ainsi de venir occuper les sites prévus pour des ions moins compétitifs (220).

Une troisième stratégie consiste à utiliser des métallochaperones spécifiques pour délivrer les ions métalliques corrects à leur métalloprotéine correspondante. Dans le cas de la [NiFe]-hydrogénase, c'est le complexe HypAB ou HypAB-SlyD qui reçoit le nickel directement de l'importeur NikA-E pour le délivrer à l'hydrogénase. Dans le cas de l'uréase, le site de liaison du nickel est inaccessible aux ions métalliques et seul UreE est capable d'insérer ses ions nickel dans le site catalytique, de manière spécifique (220).

Finalement, certaines métalloprotéines sont capables de discriminer un métal par rapport à un autre grâce aux différences d'affinités des métaux ou à leurs différences en terme de géométrie de coordination. En plus de leur affinité globale pour les ligands, définie par leur position dans la série d'Irving-Williams, les ions métalliques ont des affinités différentes pour certains ligands par rapport à d'autres. La sphère de coordination primaire (les ligands directs) et la sphère de coordination secondaire (les atomes plus éloignés n'interagissant pas directement avec l'ion métallique) peuvent établir un biais en faveur d'un ion métallique particulier (220). Le Ni(II), par exemple, est plus souvent coordonné par des ligands de type imidazole

(histidine) ou hydroxyle, alors que le Zn(II) et le Cd(II) sont plus souvent coordonnés par les S de cystéines, indiquant la préférence des ces ions pour un certain type de ligand (222).

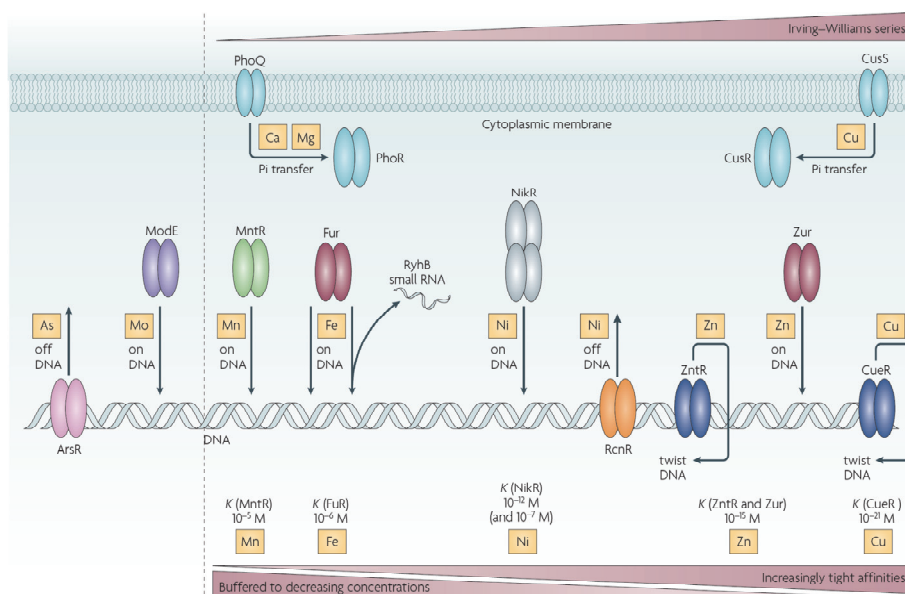


Figure 25. Les régulateurs métalliques chez *E. coli*. Le nombre d'ion métalliques dans la cellule est contrôlé par des régulateurs sensibles aux différents ions. Ils montrent des sensibilités différentes envers leurs ions respectifs afin que la concentration intracellulaire des ions métalliques soit inversement proportionnelle à leur affinité pour les ligands. Les flèches indiquent le type de régulation, soit par dérépression (flèche vers le haut), soit par corépression (flèche vers le bas), soit par activation par déroulement de l'ADN (flèche en spirale), de même que les systèmes de régulation à deux composants. Les sensibilités envers les ions métalliques sont indiquées et les couleurs correspondent aux différentes familles de régulateurs : MerR (bleu foncé), ArsR-SmtB (rose), Fur (rouge), systèmes à deux composants (bleu clair), DtxR (vert foncé), CsoR-RcnR (orange), NikR (gris) et ModE (violet). K représente l'affinité pour un ion métallique donnée. Tiré de (220).

La géométrie de coordination peut également permettre une reconnaissance des ions métalliques par les metalloprotéines. Le fait que la taille et la répartition des électrons de la couche d soient différentes donne à chaque ion une préférence pour un certain type de coordination. Le Co(II), comme le Ni(II), préfère une géométrie de coordination de type octaédrale à six ligands mais le Ni(II) adopte également facilement une géométrie de coordination de type planaire à 4 ligands, alors que le Zn(II) préfère une géométrie de coordination tétraédrique à 4 ligands (223). Cette préférence pour certaines géométries particulières permet à certains métallorégulateurs et transporteurs

de changer de conformation en fonction de la géométrie adoptée par l'ion métallique dans le site de liaison. Seul l'ion métallique liant le métallorégulateur ou le transporteur dans la géométrie correcte permet le changement allostérique rendant la protéine opérationnelle. Dans le cas de NmtR, par exemple, bien que le Zn(II) lie le métallorégulateur avec une plus haute affinité que le Co(II) et le Ni(II), seuls ces derniers le lient avec une géométrie octaédrique permettant le changement allostérique nécessaire à la dérépression (220). L'état d'oxydation des ions métalliques, en influençant la géométrie de coordination, est également un facteur de discrimination. Seule la liaison d'un ion métallique dans la géométrie de coordination planaire, telle qu'adoptée par le Ni(II), permet d'activer NikR. Cela permet à NikR de discriminer le Ni(II) du Co(II), qui adopte une géométrie octaédrique, et du Zn(II), qui adopte une géométrie tétrahédrique. Mais cela ne permet pas à NikR de discriminer le Ni(II) du Cu(II), qui adopte également une géométrie planaire carrée. Cependant, dans le cytosol, le Cu(II) est réduit en Cu(I), qui adopte une géométrie trigonale. Le Cu(II) n'est donc pas un problème pour NikR *in vivo* (224). Pour ce qui est de la spécificité des transporteurs à Ni(II), il semble que celle-ci pourrait être liée au fait que certains transporteurs lient non pas le Ni(II) libre mais plutôt un complexe Ni(II)-métallophore, par analogie avec les sidérophores.

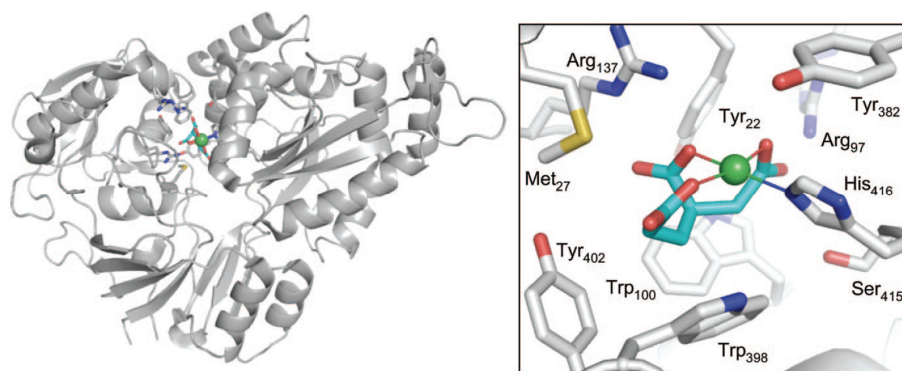


Figure 26. Structure de la protéine périplasmique Nika d'*E. coli* (PDB code : 3DP8). La protéine possède un nickel liée à l'His416 et à un ligand organique ressemblant au butane-1,2,4-tricarboxylate (en cyan). Les résidus autour du site de liaison sont représentés en bâtonnets avec le C en blanc, le O en rouge, le N en bleu et le S en jaune. Les ions métalliques sont illustrés en sphères avec le Ni en vert. Tiré de (8).

En effet Nika, la protéine périplasmique du transporteur NikA-E, a été cristallisée en présence d'un métallophore ressemblant à du butane-1,2,4-

tricarboxylate (Fig. 26). Ce métallophore n'a cependant pas été formellement identifié (225).

I.3.3. Les enzymes à nickel

I.3.3.1. Introduction

Huit enzymes à nickel ont été formellement identifiées et seront décrites ci-dessous. D'autres enzymes ont été montrées comme étant activées en présence de nickel, notamment la quercétinase QueD de *Sm. sp. FLA*, la déshydrogénase à glycérol-1-phosphate AraM de *B. subtilis* et la méthylènediurée d'une espèce de *Burkholderia* (226). Cependant, le fait d'être actif en présence de nickel ne suffit pas à démontrer que la protéine est Ni-dépendante. Il y a des exemples de protéines originellement classifiées comme protéines à nickel, mais dont on a démontré par la suite qu'elles utilisaient un autre cofacteur *in vivo* (8).

I.3.3.2. Les [NiFe]-Hydrogénases

I.3.3.2.1. Activité des [NiFe]-hydrogénases

Les hydrogénases sont des enzymes qui catalysent la formation d'hydrogène gazeux à partir de protons et d'électrons et/ou la réaction inverse. Ces enzymes sont centrales dans le métabolisme de nombreuses bactéries et archées, surtout en condition anaérobie. Les hydrogénases peuvent oxyder l'hydrogène pour son utilisation comme source d'électrons, réduire des protons en hydrogène pour évacuer un excès d'équivalents réducteurs ou encore agir comme senseur pour détecter la disponibilité en hydrogène dans le milieu. Il existe trois catégories d'hydrogénases, les [NiFe]-hydrogénases, les [FeFe]-hydrogénases et les [Fe]-hydrogénases (227). Les [NiFe]-hydrogénases forment une classe phylogénétiquement distincte des autres hydrogénases et sont largement répandues au sein des bactéries et des archées (227). Les hydrogénases permettent à certaines bactéries pathogènes, comme *He. pylori* ou *Salmonella enterica*, de survivre grâce à l'hydrogène produit par d'autres microorganismes dans le corps de l'hôte (8).

Le site actif dinucléaire NiFe se situe profondément enfoui dans la grosse sous-unité de la protéine hétérodimérique qu'est la [NiFe]-hydrogénase. Le nickel est lié par 4 cystéines qui proviennent de deux motifs CxxC, l'un

d'eux étant situé proche du C-terminus. Une cystéine de chaque paire fait le lien avec le fer qui possède en plus deux cyanures et un monoxyde de carbone comme ligands (Fig. 27A).

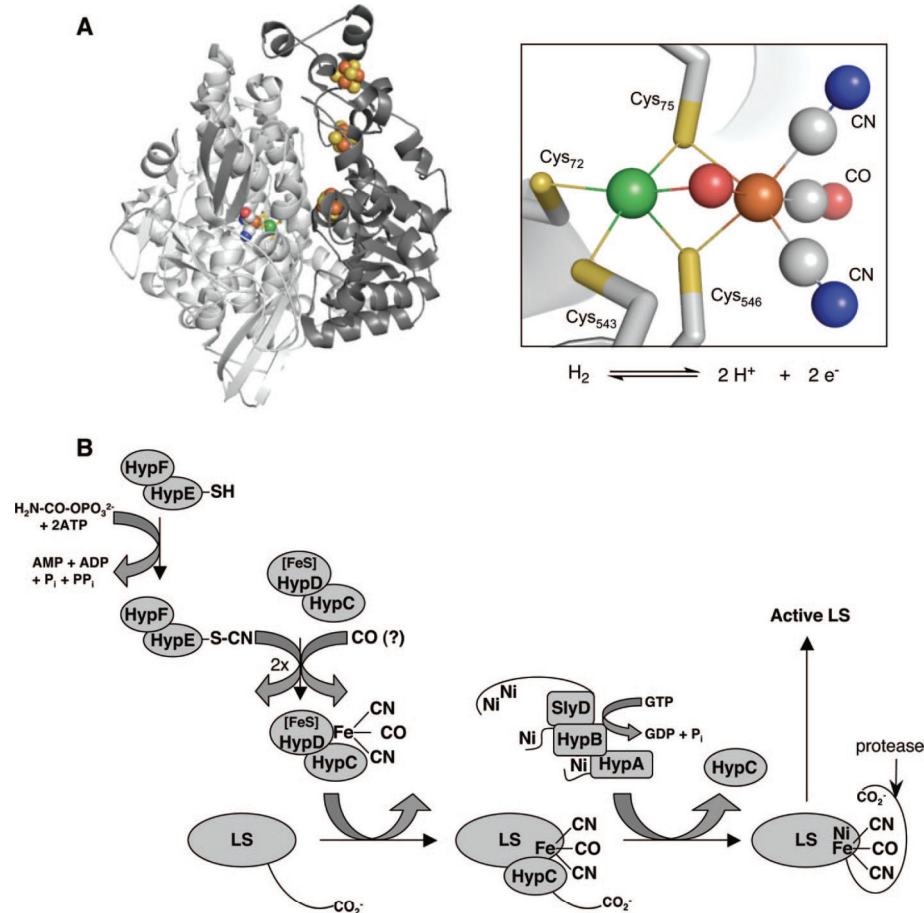


Figure 27. Structure, site catalytique, assemblage et réaction catalysée par les [NiFe]-hydrogénases. **A**, structure de la forme oxydée de la [NiFe]-hydrogénase de *D. fructosovorans* (PDB code : 1YRQ) et de son site catalytique. La large sous-unité est gris clair et la petite sous-unité est gris foncé. Les ligands sont indiqués en bâtonnets avec le C en blanc et le S en jaune. Les ions métalliques et leurs ligands non-protéiques sont indiqués en sphères avec le C en blanc, le O en rouge, le N en bleu, le S en jaune, le Ni en vert et le Fe en orange. **B**, modèle d'assemblage du centre catalytique de la large sous-unité de la [NiFe]-hydrogénase chez *E. coli*. LS : grosse sous-unité. Tiré de (8).

Le mécanisme catalytique, bien que la réaction semble simple, est plutôt complexe et est encore intensément étudié (228). Le mécanisme décrit ci-dessous a été construit par simulation moléculaire et est cohérent avec les résultats expérimentaux, même s'il n'est pas encore prouvé

expérimentalement. Dans ce mécanisme, le site catalytique au repos, Ni-S, clive l'hydrogène moléculaire en un proton, qui est porté par le S d'une cystéine, et un hydruire reliant le Fe(II) et le Ni(II), formant l'intermédiaire Ni-SR (Fig. 28). Cet intermédiaire perd ensuite le proton du S et un électron provenant du Ni(II), formant l'intermédiaire Ni-C, composé d'un noyau Ni(III)Fe(II) (Fig. 28).

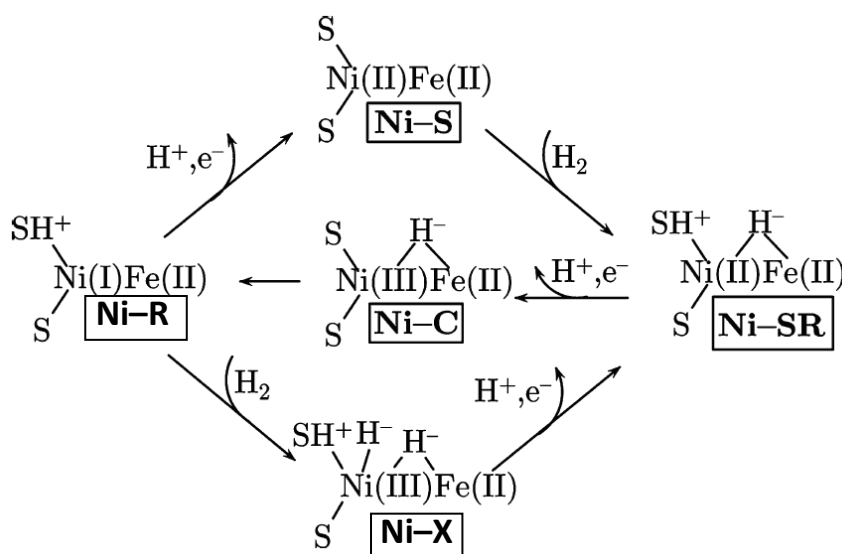


Figure 28. Mécanisme catalytique proposé par (229). Adapté de (228).

L'hydruire est alors transféré sur le Ni(III), réduisant celui-ci en Ni(I) et formant l'intermédiaire Ni-R. Celui-ci peut alors soit revenir au stade de repos Ni-S en perdant un électron et un proton, ou alors cliver un second hydrogène, formant deux hydrures et oxydant le Ni(I) en Ni(III). Cet intermédiaire, appelé Ni-X, peut ensuite perdre deux protons et deux électrons et revenir à l'intermédiaire Ni-R via l'intermédiaire Ni-SR (Fig. 28). Les intermédiaires Ni-S, Ni-SR et Ni-C ont été observés expérimentalement, les autres intermédiaires ne sont que des hypothèses construites par simulation moléculaire. Les calculs de simulation montrent que le deuxième clivage d'hydrogène, appelé clivage oxydatif comme il oxyde le Ni(I), a une barrière d'activation plus basse que le premier clivage d'hydrogène, qui est néanmoins nécessaire pour obtenir l'intermédiaire réactif Ni-R. Ce mécanisme catalytique est donc appelé mécanisme autocatalytique car une fois que le premier clivage d'hydrogène a eu lieu, les clivages suivantes sont plus faciles à réaliser (229).

I.3.3.2.2. Maturation des [NiFe]-hydrogénases

Les gènes de maturation de l'hydrogénase sont appelés HypA-F et sont responsables de la maturation des différentes isoenzymes de la [NiFe]-hydrogénase. La première étape du processus de maturation est la formation d'un complexe HypEF, qui va hydrolyser un ATP pour catalyser le transfert d'un groupe carboxamide du carbamoyl phosphate sur une cystéine de HypE. La déshydratation de ce groupe couplée à l'hydrolyse d'un second ATP produira le complexe HypE-SCN (Fig. 27B). Lors de la deuxième étape, deux complexes HypE-SCN transféreront deux groupes cyanures sur un complexe HypCD réduit, formant un centre fer à deux ligands, qui sera ensuite complété par un troisième ligand de type monoxyde de carbone (Fig. 27B). La troisième étape consiste au transfert du centre fer sur la grosse sous-unité (LS pour « large subunit »), auquel reste complexé HypC (Fig. 27B). Le complexe ainsi formé est prêt à recevoir son ion nickel lors de la quatrième étape. Cette étape est catalysée par HypA et HypB, parfois avec l'aide de SlyD, et nécessite l'hydrolyse d'un GTP par HypB. HypB possède un site de haute affinité pour le nickel et parfois une région riche en histidines servant au stockage du nickel. HypA sert d'échafaudage à l'assemblage du complexe d'insertion du nickel. Un excès de nickel dans le milieu peut partiellement remplacer l'activité de ces enzymes, qui ne sont donc pas strictement nécessaires. Le rôle de HypC dans ce processus serait de maintenir la LS dans une conformation ouverte qui permette l'insertion du nickel, il se dissocie d'ailleurs de la LS après cela (Fig. 27B). Lors de la dernière étape, une protéase spécifique pour chaque isoenzyme va cliver la queue C-terminale de l'enzyme, permettant à l'enzyme d'adopter sa configuration finale (Fig. 27B). L'association avec la petite sous-unité, qui possède des noyaux Fe-S, permettra le transfert des électrons à partir de et vers le site catalytique. Finalement, l'enzyme complète sera dirigée vers sa destination cellulaire ultime, souvent sur la face externe de la membrane cytoplasmique (8, 203).

I.3.3.3. Les [FeFe]-hydrogénases

Les [FeFe]-hydrogénases, même si ce ne sont pas des enzymes à nickel, possèdent un mécanisme de maturation qui leur est propre et qui sera abordé brièvement ici, en comparaison avec le mécanisme de maturation des [NiFe]-hydrogénases. On retrouve les [FeFe]-hydrogénases chez les procaryotes anaérobies qui produisent du H₂, comme les clostridies, les réducteurs de soufre et également chez certains eucaryotes anaérobies. Alors

que les [NiFe]-hydrogénases sont principalement associées à la consommation de H_2 , les [FeFe]-hydrogénases sont plutôt associées à sa production. Les [FeFe]-hydrogénases sont généralement monomériques, alors que les [NiFe]-hydrogénases possèdent toujours deux sous-unités au moins. Le noyau H, où s'opère la catalyse, est composé d'un noyau binucléaire FeFe relié à un noyau Fe_4S_4 par une cystéine. Des ligands non-protéiques CN et CO sont reliés au noyau binucléaire FeFe et les deux Fe partagent également deux ligands soufrés reliant les Fe entre eux et provenant d'une petite molécule de type di(thiométhyl)amine (Fig. 29) (227). Le mécanisme catalytique des [FeFe]-hydrogénases est fort semblable à celui des [NiFe]-hydrogénases, malgré quelques petites différences. La version active de l'hydrogénase contient un noyau Fe(I)Fe(II), qui est encore réduit en Fe(I)Fe(I) avant la capture d'un proton, qui forme un hydrure en oxydant les deux Fe(I) en Fe(II). Un second transfert d'électron et de proton génère l'hydrogène et le noyau Fe(I)Fe(II) de départ (230).

Malgré leur ressemblance mécanistique, la biosynthèse du noyau H des [FeFe]-hydrogénases est pourtant fort différente de la biosynthèse du noyau NiFe des [NiFe]-hydrogénases. Trois protéines seulement sont responsables de la maturation de l'apoprotéine HydA : HydG et HydE sont des enzymes à fer-soufre qui utilisent la S-adénosylméthionine (SAM) et HydF est une GTPase qui possède également un noyau fer-soufre (Fig. 29). L'expression hétérologue de ces trois protéines est suffisante pour permettre la maturation d'une [FeFe]-hydrogénase hétérologue (HydA) chez *E. coli*. De plus, elles ne doivent pas forcément provenir du même organisme que HydA, ce qui indique que le mécanisme de maturation est conservé (231). Ces trois protéines accessoires sont responsables de la synthèse et du transfert du noyau binucléaire FeFe au complet avec ses ligands sur HydA possédant déjà le noyau Fe_4S_4 assemblé par la machinerie de l'hôte (Fig. 29) (232). Cette activation s'opère de manière rapide et ne nécessite pas de cofacteur *in vitro*, indiquant que le noyau FeFe est déjà pré-assemblé sur les protéines accessoires (233). Quand HydF exprimée en présence de HydE et HydG est purifiée et mise en présence de HydA *in vitro*, une activation partielle de HydA est observée, ce qui suggère que l'assemblage s'opère sur HydF (234). Il semble en réalité que l'assemblage s'opère d'abord sur HydG qui synthétise le noyau FeFe à partir de tyrosine et de SAM avec l'aide de la machinerie de synthèse des noyaux fer-soufre de l'hôte. Ce noyau est ensuite transféré, avec la participation de HydE, sur HydF et puis finalement sur HydA (Fig. 29) (235). L'hydrolyse de GTP est nécessaire dans ce processus

et semble impliquée dans la dissociation des protéines accessoires HydG et HydE de HydF (236). Ce processus implique donc plusieurs étapes, mais à l'inverse de la [NiFe]-hydrogénase où le noyau NiFe est assemblé progressivement sur l'apoprotéine, ici le noyau est pré-assemblé sur une protéine accessoire qui le transfère ensuite à une autre protéine accessoire qui le transfère finalement à l'apoprotéine.

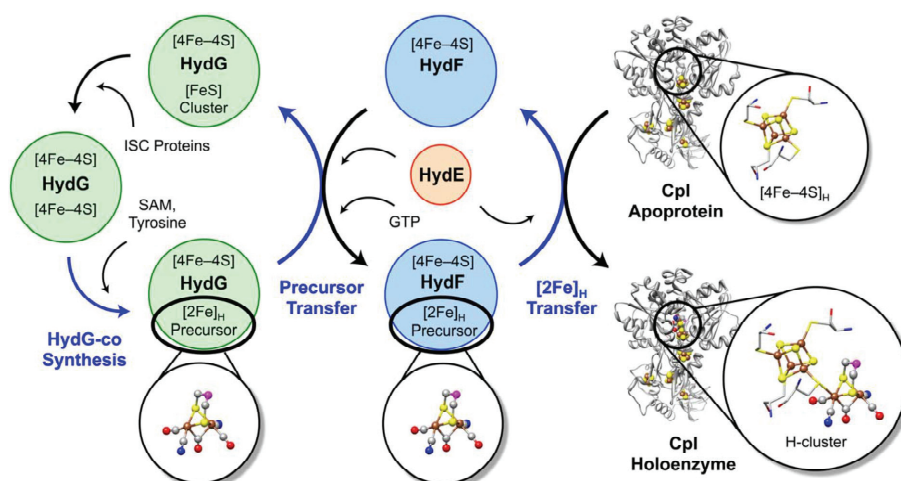


Figure 29. Modèle d'assemblage du noyau H de la [FeFe]-hydrogénase. Les flèches en bleu indiquent les étapes directement impliquées dans la synthèse et le transfert du précurseur bimétallique FeFe. ISC signifie « Iron-Sulfur Cluster ». Les précurseurs du noyau H sont indiqués en boules et bâtonnets avec le C en blanc, le O en rouge, le N en bleu, le S en jaune, le Fe en brun et les atomes indéterminés en magenta. Tiré de (235).

I.3.3.4. L'uréase

I.3.3.4.1. Activité de l'uréase

L'uréase joue un rôle critique dans le métabolisme azoté de nombreux organismes et elle est une enzyme clé dans le cycle global de l'azote car elle permet aux plantes d'utiliser l'urée comme source d'azote. De plus, l'uréase est un facteur de virulence pour une variété de microorganismes pathogènes, chez qui la formation d'ammoniaque par l'uréase permet de survivre en milieu acide, comme *He. pylori* dans l'estomac, par exemple (8).

L'uréase forme un trimère de trimères (UreABC)₃ chez la plupart des procaryotes (Fig. 30A). Chez certains autres procaryotes, l'enzyme forme un trimère de dimères (UreAB)₃, dans lequel deux sous-unités sont fusionnées

en une seule. Chez les plantes, les trois sous-unités sont fusionnées et l'enzyme forme donc un simple trimère, dont le repliement est cependant identique à celui des enzymes procaryotiques (237). Le site catalytique profondément enfui dans l'enzyme possède deux ions Ni(II) coordonnés par 4 histidines, un aspartate et une lysine carboxylée qui fait le pont entre les deux ions Ni(II). Divers molécules d'eau complètent la coordination des Ni(II) et un ion hydroxyde relie également les deux Ni(II) entre eux (Fig. 30) (8).

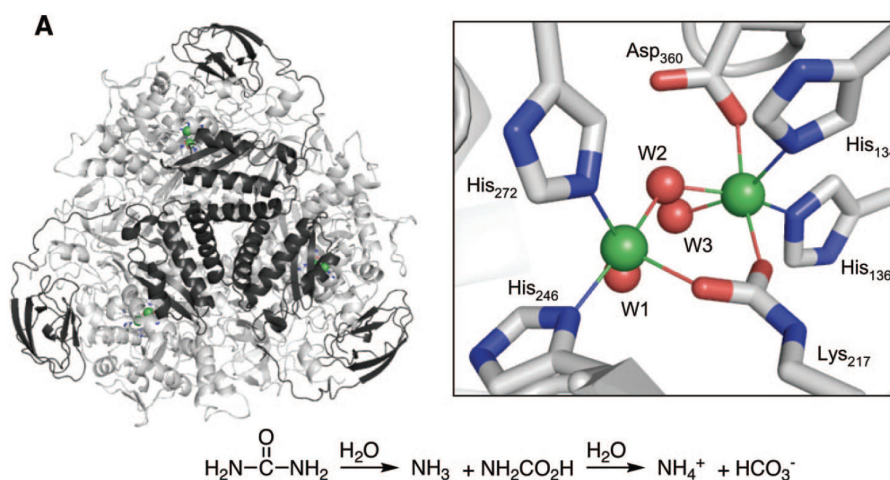


Figure 30. Structure, site catalytique et réaction catalysée par l'uréase de *K. aerogenes* (PDB code : 1FWJ). La sous-unité UreC, qui contient le site actif, est indiquée en gris clair et les sous-unités UreA et UreB sont indiquées en gris foncé. Les ligands sont indiqués en bâtonnets avec le C en blanc, le O en rouge et le N en bleu. Les ions métalliques et leurs ligands non-protéiques sont indiqués en sphères avec le Ni en vert et le O en rouge. Tiré de (8).

Le mécanisme catalytique se déroule comme suit : l'urée se lie au premier ion Ni(II) par son carbonyle et au 2^e Ni(II) par un groupe amine. Le groupe hydroxyle entre les deux ions attaque ensuite le carbonyle, qui est activé par ses liens avec les ions Ni(II). Dans l'intermédiaire ainsi formé, le proton du groupe hydroxyle devient très acide et est transféré sur le groupe amine distal, ce qui provoque le clivage du lien C-N entre ce groupe et le carbonyle (Fig. 31). L'ammoniaque et le carbamate formés se dissocient de l'enzyme et ce dernier se décompose ensuite naturellement, formant un ammonium et du bicarbonate (238).

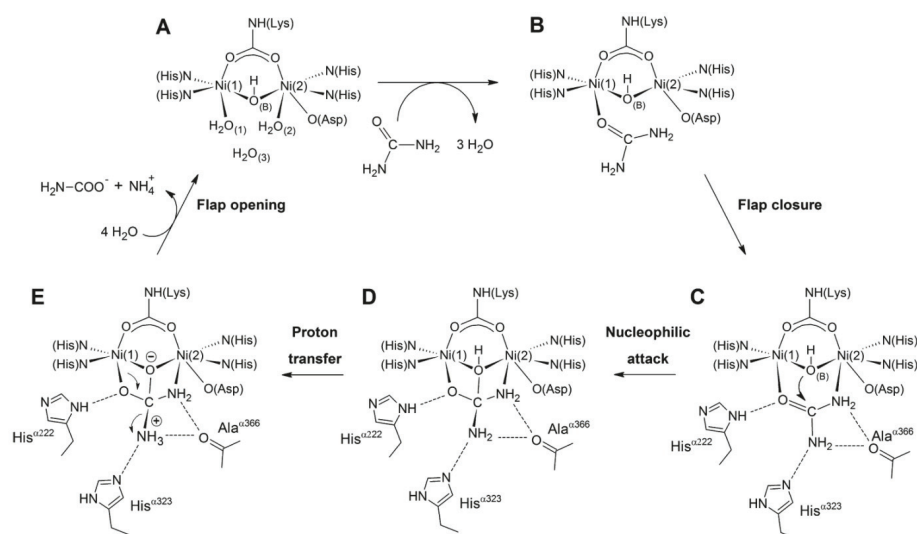


Figure 31. Mécanisme catalytique de l'uréase. Adapté de (238).

I.3.3.4.2. Maturation de l'uréase

Quatre protéines accessoires, UreD-G, sont typiquement impliquées dans la biosynthèse du métallocentre de l'uréase et sont nécessaires à l'activation complète de l'uréase. UreD semble se lier en premier à l'apo-uréase et induirait un changement conformationnel. UreF viendrait ensuite se fixer et faciliterait la carboxylation de la lysine, via un changement conformationnel. UreG se joindrait ensuite au système afin de coupler l'hydrolyse du GTP à l'activation de l'uréase (Fig. 32).

L'hydrolyse du GTP pourrait être couplée à la formation de carboxyphosphate, qui servirait à carboxyler la lysine du site catalytique. UreG est une enzyme intrinsèquement désordonnée, qui n'acquiert sa forme ordonnée et son activité GTPase qu'en interagissant avec ses partenaires. Pour terminer, UreE viendrait délivrer les ions Ni(II) à l'apoprotéine, en partenariat avec UreG (Fig. 32). En effet, UreE interagit avec UreG, formant un dimère de dimères. UreE possède en outre un site de liaison du Ni(II) à l'interface des deux monomères, plus au moins une histidine impliquée dans la liaison au Ni(II) dans sa partie C-terminal flexible. Au repos, le Ni(II) serait lié à un site périphérique d'UreE et serait ensuite transféré à l'apo-uréase via le site de liaison se trouvant à l'interface des monomères. Il n'est pas exclu qu'UreE transfère un noyau de deux ions Ni(II) directement (8, 238).

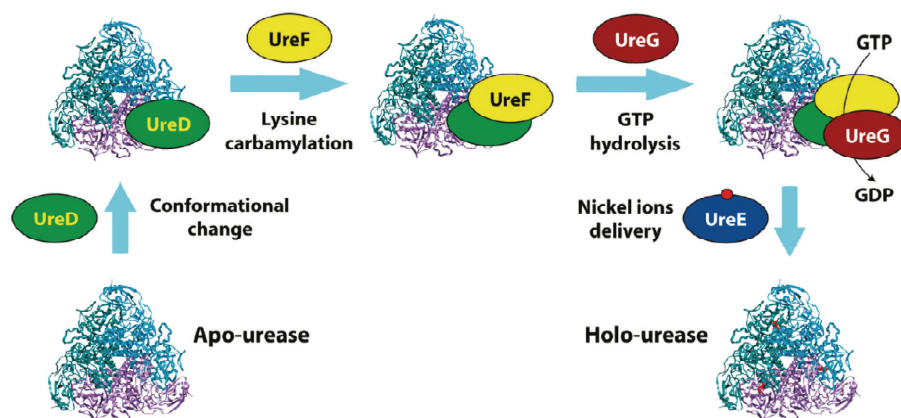


Figure 32. Modèle d'assemblage du site catalytique de l'uréase. Tiré de (238).

I.3.3.5. La méthyle-coenzyme M réductase

La MCR est l'enzyme terminale de la biosynthèse du méthane chez les archées méthanogènes et a également été identifiée chez les archées méthanotrophes. Cette enzyme, qui participe significativement au cycle du carbone, catalyse la réduction du méthyle-coenzyme M avec le coenzyme B comme donneur d'électrons, ce qui produit du méthane et un pont disulfure entre les coenzymes M et B. Pour catalyser cette réaction, l'enzyme utilise le Facteur 430, qui est une porphyrine possédant un nickel, qui absorbe à 430 nm et que se trouve enfoui au cœur de l'enzyme (Fig. 33).

La biosynthèse de ce cofacteur passe par la formation d'acide aminolévulinique et d'uroporphynogène III, suivie de plusieurs étapes de modification, incluant un transfert de méthyle, une amidation, une synthèse de cycle lactame, une déshydrogénation, une deuxième cyclisation, un transfert de Ni(II) ainsi qu'une réduction du Ni(II) en Ni(I). Seulement deux intermédiaires de cette voie de biosynthèse ont pu être isolés et, à part le gène de la méthyle transférase catalysant la première réaction, aucun gène de protéine intervenant la biosynthèse de ce cofacteur n'a été identifié (239).

Concernant le mécanisme catalytique, il commence par l'addition du groupe méthyle du méthyle-coenzyme M sur le Ni(I), l'oxydant en Ni(III). Ensuite, le coenzyme M réduit le Ni(III) en Ni(II) et donne un proton au méthyle, qui est alors libéré sous forme de méthane. Pour terminer, le coenzyme M est à son tour réduit par le coenzyme B, formant un lien disulfure et réduisant une deuxième fois le Ni(II) en Ni(I) (Fig. 34) (240).

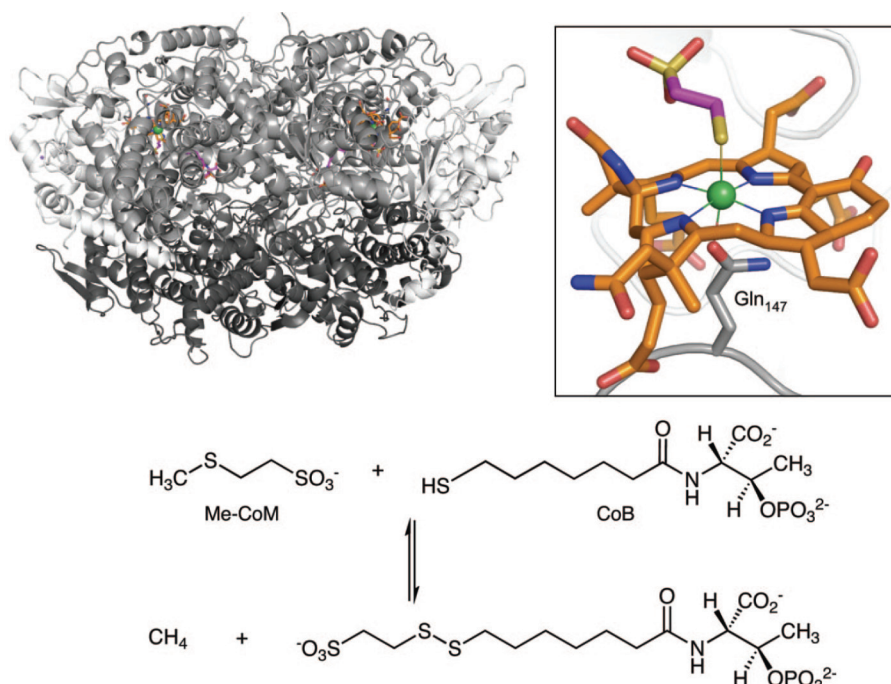


Figure 33. Structure, site catalytique et réaction catalysée par la MCR de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (PDB code : 1MRO) et de son site catalytique contenant le Facteur 430 (en orange) et le cofacteur M (en violet). Les ligands sont indiqués en bâtonnets avec le O en rouge, le N en bleu et le S en jaune. Le Ni est indiqué par une sphère verte. Me-CoM : méthyle-coenzyme M, CoB : coenzyme B. Tiré de (8).

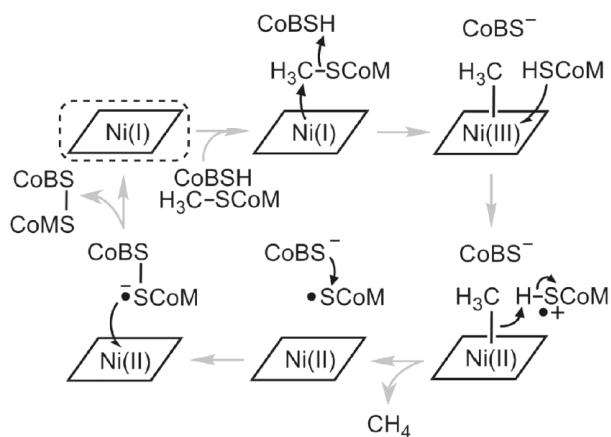


Figure 34. Mécanisme catalytique de la MCR. CoB, coenzyme B et CoM, coenzyme M. Tiré de (240).

La première étape d'addition oxydative du méthyle ressemble à l'addition oxydative d'hydrogène sur le noyau Ni(I)Fe(II) de l'hydrogénase. D'ailleurs,

quand le coenzyme M seul réagit avec la méthyle-coenzyme M réductase, il se forme un intermédiaire ressemblant à du Ni(III)-hydrure, qui pourrait intervenir dans le mécanisme de la réaction inverse, c'est-à-dire lors de l'oxydation du méthane (241).

I.3.3.6. Les CO-déshydrogénase et acétyl-CoA synthase

I.3.3.6.1. Activité des enzymes

La CODH catalyse la réaction redox de conversion du CO en CO₂, ce qui permet aux organismes possédant cette enzyme d'utiliser le monoxyde de carbone comme source d'électrons. La CODH contient de nombreux noyaux métalliques, dont trois Fe₄S₄ qui transfèrent les électrons de ou vers le site catalytique, ainsi que deux noyaux C, composés d'un Fe₃S₄ lié à un 4^e fer et à un nickel (Fig. 36) (8). Dans la version active du site catalytique, un hydroxyde fait le pont entre le nickel et le fer, comme dans le cas de l'uréase. Dans le cas de l'oxydation du CO, celui-ci se lie d'abord sur le Ni(II) et réagit avec l'hydroxyde, formant du COO²⁻. Ce dernier transfère ensuite deux électrons à un proton qui forme un Ni(II)-hydrure puis un Ni(0) et est ensuite remplacé par un hydroxyle, ce qui libère le CO₂. Le Ni(0) est finalement oxydé deux fois afin de retrouver la situation de départ (Fig. 35).

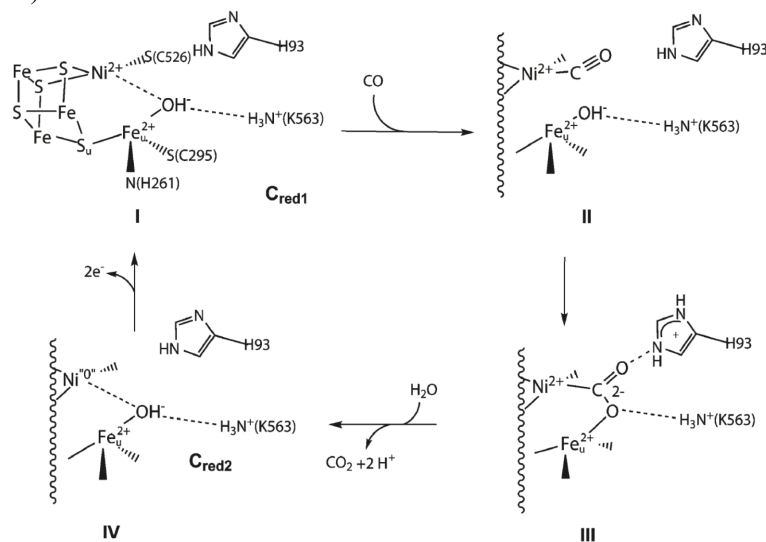


Figure 35. Mécanisme catalytique de la CODH. C_{red1} et C_{red2} sont deux états observés expérimentalement. Tiré de (242).

La réaction de réduction du CO₂ est identique mais fonctionne dans le sens inverse (242).

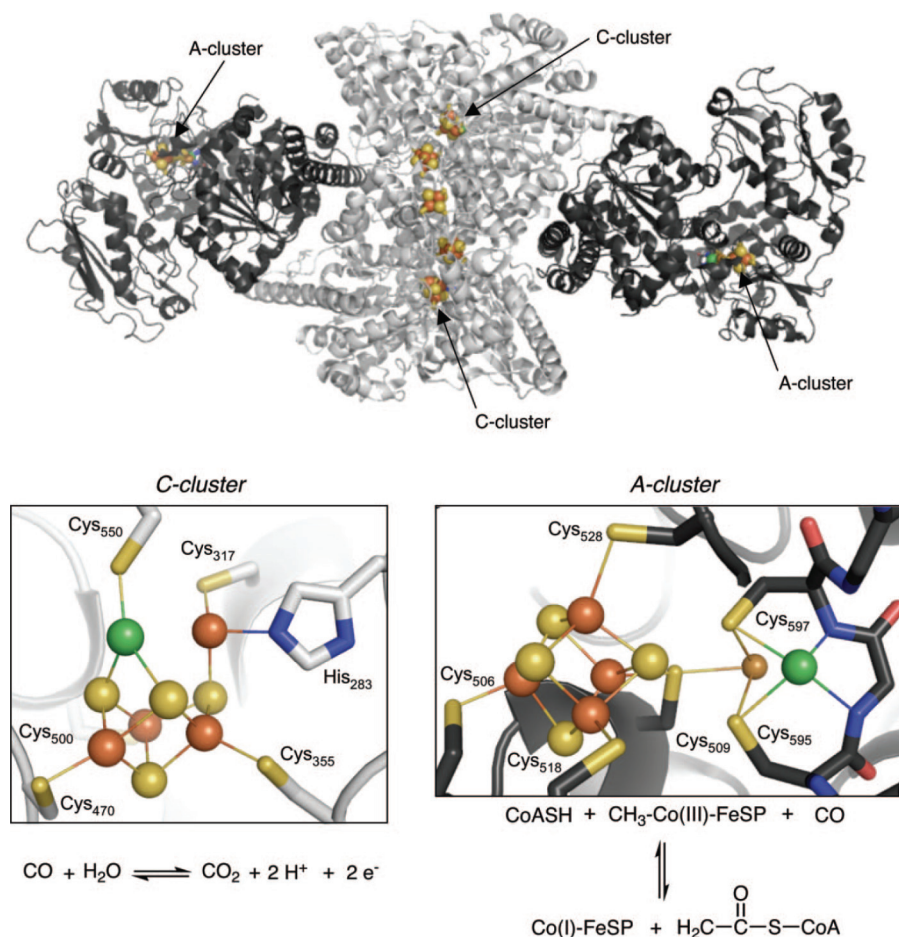


Figure 36. Structure, sites catalytiques et réactions catalysées par le complexe CODH/ACS de *Moorella thermoacetica* (PDB code : 2Z8Y). Les deux monomères de la CODH sont en gris clair, flanqués de deux ACSs en gris foncé. Les ligands sont indiqués en bâtonnets avec le O en rouge, le N en bleu et le S en jaune. Les ions métalliques et leurs ligands non-protéiques sont indiqués en sphères avec le S en jaune, le Ni en vert, le Fe en orange et le Cu en ocre. CoASH : coenzyme A, Co(I)-FeSP et CH₃-Co(III)-FeSP : protéine à corrinoïde/fer-soufre et sa forme méthylée. Tiré de (8).

Certaines CODHs sont des composantes d'un complexe enzymatique plus large où le CO₂ est d'abord réduit en CO et ensuite utilisé pour la synthèse d'acétyle-CoA par une acétyle-CoA synthase (ACS) (Fig. 36). Le CH₃ nécessaire à cette synthèse est fourni par la protéine corrinoïde/fer-soufre. Ce complexe peut aussi fonctionner dans le sens inverse, on l'appelle alors

acétyl-CoA décarboxylase/synthase (ACDS). La synthèse ou la décarbonylation de l'acétyl-CoA est catalysée par un métallocentre appelé noyau A, qui est séparé du noyau C par un long tunnel clos qui permet au CO de diffuser du site catalytique où il est produit au site catalytique où il est consommé. Le noyau A est composé d'un noyau $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ relié par une cystéine à un site binucléaire composé de deux nickels (Fig. 36). Le nickel le plus éloigné du noyau fer-soufre (nickel distal) est lié dans une géométrie planaire carrée à deux azotes du squelette peptidique et à deux cystéines qui lient également le nickel le plus proche (nickel proximal). Dans certaines structures tridimensionnelles, ce dernier est parfois remplacé par du cuivre ou du zinc (Fig. 36), mais de nombreuses études suggèrent que le nickel est l'ion métallique physiologique de ce site. Concernant le mécanisme catalytique, la question de savoir quel substrat lie en premier le site catalytique a longtemps été débattue. Les chercheurs s'accordent sur le fait que l'acétyl-CoA se forme sur le nickel proximal, mais lequel, entre le CO et le CH_3 , se lie en premier ? Actuellement, un point de vue dominant est que les deux mécanismes sont également possibles et que la liaison du premier substrat pourrait être aléatoirement le CO ou le CH_3 . Après la formation de l'acétyl sur le nickel, le coenzyme A viendrait décrocher celui-ci, pour former l'acétyl-CoA (Fig. 37). Le nickel proximal, responsable de l'activité catalytique, doit être réduit en Ni(I) ou en Ni(0) pour que l'enzyme soit active (243, 244).

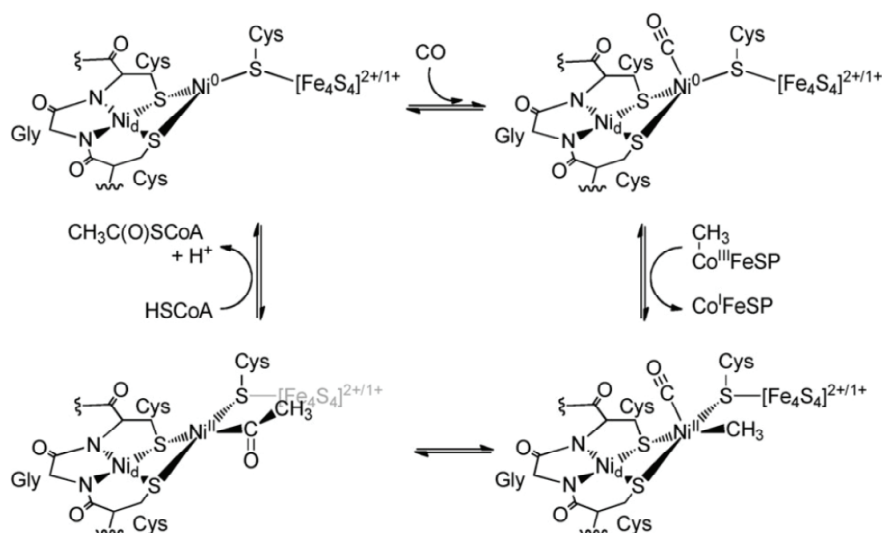


Figure 37. Mécanisme catalytique de l'ACS. Tiré de (243).

I.3.3.6.2. Activation des enzymes

Deux protéines accessoires, une NTPase (CooC) et une métallochaperone (CooJ), sont impliquées dans la biosynthèse de la CODH (Fig. 38). Comme HypB et UreG, CooC possède un motif de type P-loop de liaison à un nucléotide qui hydrolyse l'ATP. Comme HypB et UreE, CooJ possède une séquence C-terminale riche en histidine de stockage du nickel dispensable à son activité. Ces protéines accessoires sont nécessaires à l'activation de CODH en conditions physiologiques, néanmoins la CODH purifiée à partir de cellules déficientes en nickel peut être activée *in vitro* en présence d'un excès de NiCl_2 . La protéine purifiée dans ces conditions possède des noyaux fer-soufre intacts, indiquant que l'assemblage du nickel s'opère directement sur la protéine. Un troisième gène a été identifié entre *cooC* et *cooJ* : *cooT*, mais son rôle n'est pas encore été établi (8, 226).

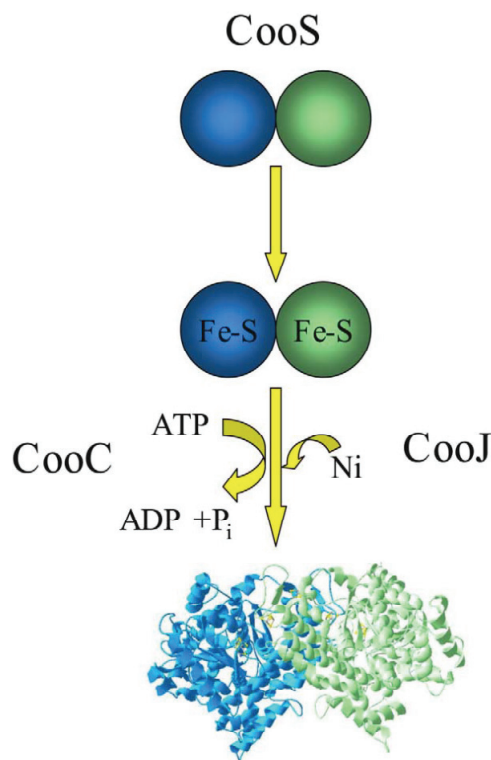


Figure 38. Mécanisme d'activation de la CODH de *Rhodospirillum rubrum* (PDB code : 1JQK). CooS est l'apoenzyme de la CODH. Tiré de (245).

Dans beaucoup d'organismes possédant le complexe CODH/ACS, on trouve une NTPase homologue à CooC appelée AcsF, qui hydrolyse faiblement

l'ATP. Cette protéine pourrait être impliquée dans la biosynthèse du noyau A, même si cela n'a pas encore été démontré expérimentalement (246).

I.3.3.7. La superoxyde dismutase

La SOD catalyse la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène gazeux, protégeant la cellule des dommages oxydatifs du superoxyde. On différencie plusieurs classes de SOD en fonction du contenu métallique de leur site catalytique : les SODs à fer ou manganèse (Fe-SOD et Mn-SOD), les SODs à noyaux bimétalliques cuivre-zinc (CuZn-SOD) et les SODs à nickel (Ni-SOD) (247). Lors de la catalyse, le noyau métallique oxyde un premier radical superoxyde en oxygène, ce qui permet au noyau métallique de réduire un second radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène. C'est donc une succession d'étapes d'oxydation et de réduction qui prend place au niveau du noyau métallique (247). On retrouve les Ni-SODs dans le genre *Streptomyces*, chez certaines cyanobactéries et chez quelques autres organismes. La structure tridimensionnelle de la Ni-SOD révèle un Ni(III) lié dans un site pyramidal carré à deux cystéines, une histidine, un azote du squelette peptidique et l'azote N-terminal (Fig. 39).

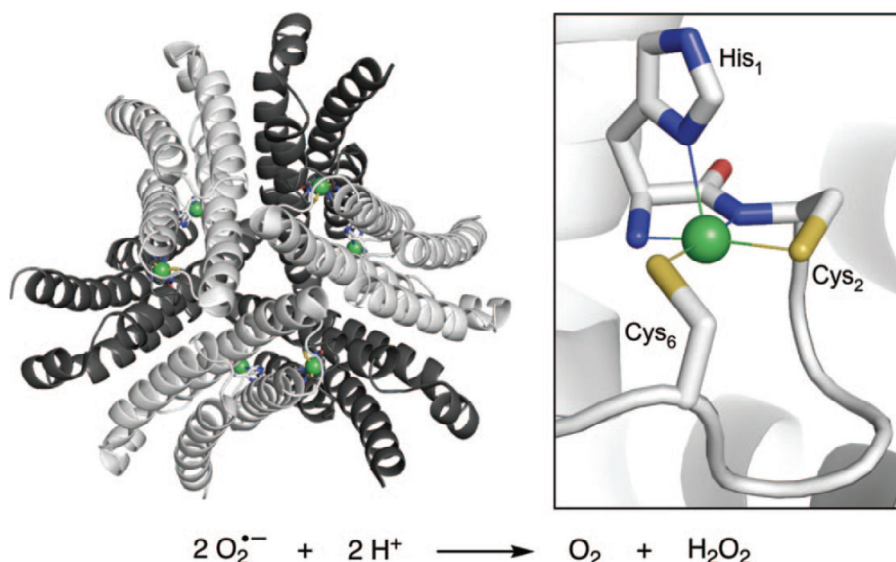


Figure 39. Structure, site catalytique et réaction catalysée par la Ni-SOD de *Sm. coelicolor* (PDB code : 1T6U). Les ligands sont indiqués en bâtonnets avec le O en rouge, le N en bleu et le S en jaune. Le Ni est indiqué par une sphère verte. Tiré de (8).

La forme réduite de la Ni-SOD possède un Ni(II) lié dans le même site mais avec une géométrie de coordination planaire carrée sans l'histidine. En absence de nickel, la séquence N-terminale est désordonnée et une coupure protéolytique est nécessaire pour que l'histidine devienne N-terminale et puisse coordonner le nickel. Une peptidase présumée homologue aux protéases à sérine se situe généralement en aval des gènes de la Ni-SOD et est nécessaire à l'activité de l'enzyme exprimée dans un hôte hétérologue. Une peptidyl-prolyl isomérase est également nécessaire pour l'isomérisation de la Pro5, mais aucune métallochaperone n'a été identifiée pour la Ni-SOD (8).

I.3.3.8. La glyoxalase I

La glyoxalase I est une enzyme cytosolique qui détoxifie le méthylglyoxal ainsi que d'autres α -cétoaldéhydes en isomérisant ceux-ci en leur D- α -hydroxyacide correspondant. La glyoxalase I forme donc du D-lactate à partir de méthylglyoxal, ce qui la rend particulièrement intéressante à comparer à la lactate racémase. Il existe deux classes de glyoxalase I : la glyoxalase I Zn-dépendantes qui est présente chez les eucaryotes et chez certains procaryotes et la glyoxalase I Ni-dépendante, qui est présente chez la plupart des procaryotes. Cette dernière est également active, mais dans une moindre mesure, en présence de Co(II), de Cd(II) et de Mn(II). La glyoxalase I Ni-dépendante est inactive en présence de Zn(II), que l'enzyme lie avec une plus forte affinité que le Ni(II) (248). L'ion métallique est coordonné par deux histidines, deux glutamates et deux molécules d'eau, formant une géométrie de coordination octaédrique (Fig. 40).

Dans la cellule, le méthylglyoxal se lie avec le glutathion (GSH) de manière non-enzymatique, formant l'hémithioacétal. Lors de la catalyse, les deux molécules d'eau qui coordonnent l'ion métallique sont remplacées par l'hémithioacétal, ce qui acidifie le proton et permet son abstraction par un glutamate. On passe alors par un intermédiaire de type énediol avant la reprotonation sur le carbone adjacent, générant le lactoylglutathion (Fig. 41). Ce dernier est finalement hydrolysé en D-lactate et glutathion par la glyoxalase II (249). Aucune connexion n'a pu être établie entre la glyoxalase I Ni-dépendante et les autres facteurs de l'homéostasie du nickel et son mécanisme d'activation reste inconnu (8).

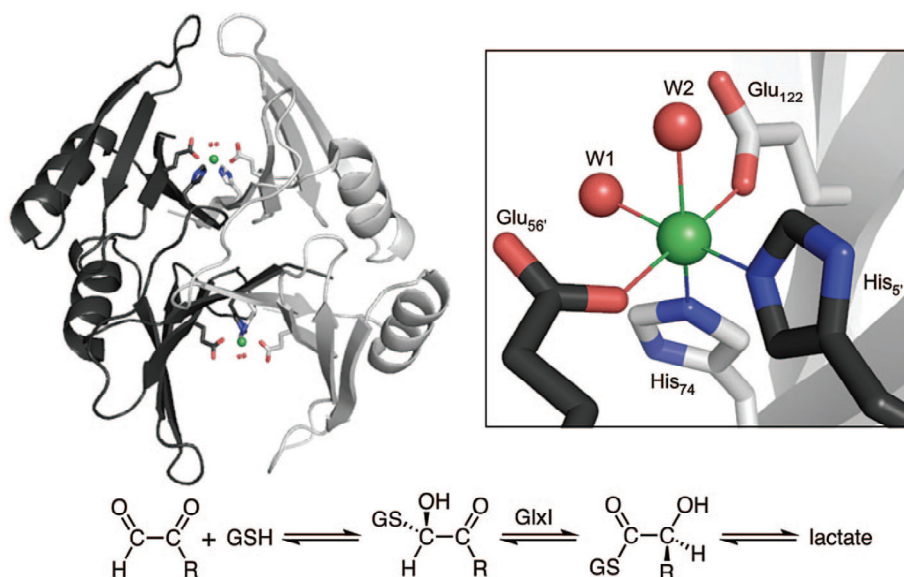


Figure 40. Structure, site catalytique et réaction catalysée par la glyoxalase I de *E. coli* (PDB code : 1F9Z). Les ligands sont indiqués en bâtonnets ou en sphères avec le O en rouge et le N en bleu. Le Ni est indiqué par une sphère verte. GSH : glutathion. Tiré de (8).

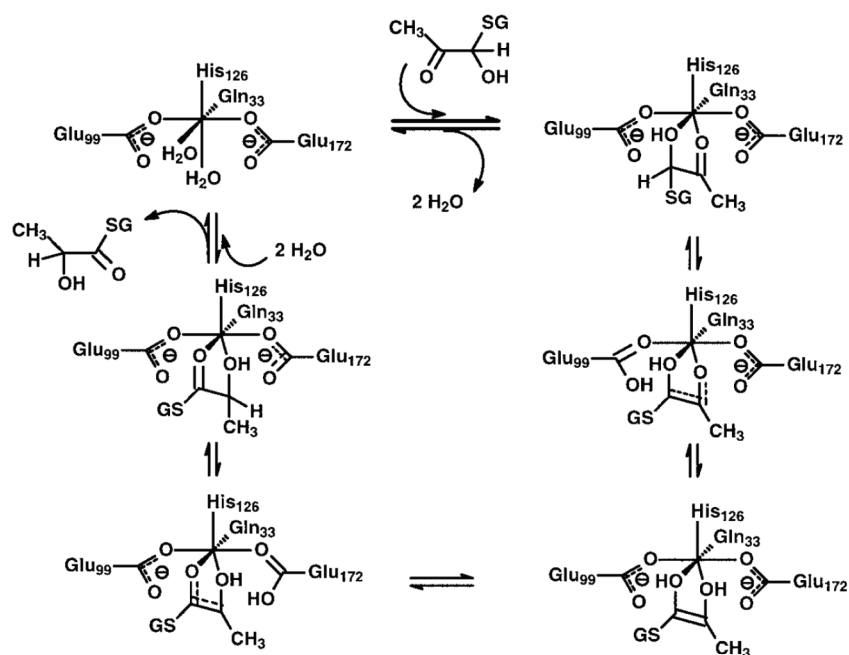


Figure 41. Mécanisme catalytique de la glyoxalase I. Tiré de (249).

I.3.3.9. L'aciréductone dioxygénase

L'aciréductone dioxygénase (ARD) fait partie de la voie métabolique omniprésente de recyclage de la méthionine, aussi appelée cycle de la méthylthioadénosine. L'ARD est présente chez la plupart des bactéries et des eucaryotes mais absente des archées, il serait donc intéressant de voir s'il existe une voie correspondante chez les archées ou chez les anaérobies en général, car en absence d'O₂ l'ARD n'est pas fonctionnelle (250). Le nickel est un cofacteur de l'aciréductone dioxygénase de *K. oxytoca* et c'est d'ailleurs la seule oxygénase qui fonctionne avec du nickel (251). Le Ni(II) est lié à la protéine par trois histidines et un glutamate, deux molécules d'eau complétant la sphère de coordination de géométrie octaédrique (Fig. 42).

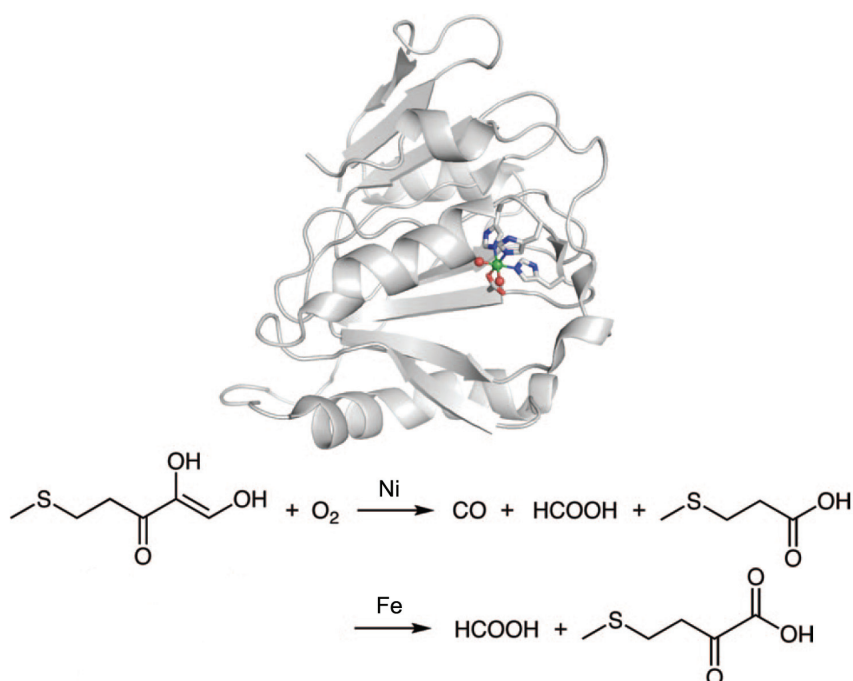


Figure 42. Structure de l'ARD de *K. oxytoca* avec du nickel dans le site catalytique (en vert) (PDB code : 1ZRR) et réactions catalysées en présence de Ni et de Fe dans le site catalytique. Les ligands sont indiqués en bâtonnets ou en sphères avec le O en rouge et le N en bleu. Adapté de (8).

Etonnamment, le Fe(II) peut également se lier au même site, mais cela produit une conformation différente et des produits enzymatiques différents. Lors de la catalyse, l'ion métallique est coordonné par l'aciréductone, remplaçant les molécules d'eau, ce qui favorise la liaison de l'oxygène sous forme de peroxyde sur le 1^{er} carbone (Fig. 43). La suite dépend du type d'ion

métallique : le Ni(II) favorise l'attaque nucléophile sur le 3^e carbone et la formation d'un peroxyde cyclique à 5 membres alors que le Fe(II) favorise l'attaque nucléophile sur le 2^e carbone et la formation d'un peroxyde cyclique à 4 membres (Fig. 43). En présence de Ni(II) on obtient au final un carboxylate, un CO et un formate alors qu'en présence de Fe(II) on obtient un α -cétoacide et un formate. Seul le cétoacide produit par l'ARD en présence de Fe(II) pourra être recyclé en méthionine, les produits de l'ARD en présence de Ni(II) quittent la voie métabolique de la méthionine (252). Le mécanisme d'insertion du nickel ou de fer dans cette enzyme est inconnu (251).

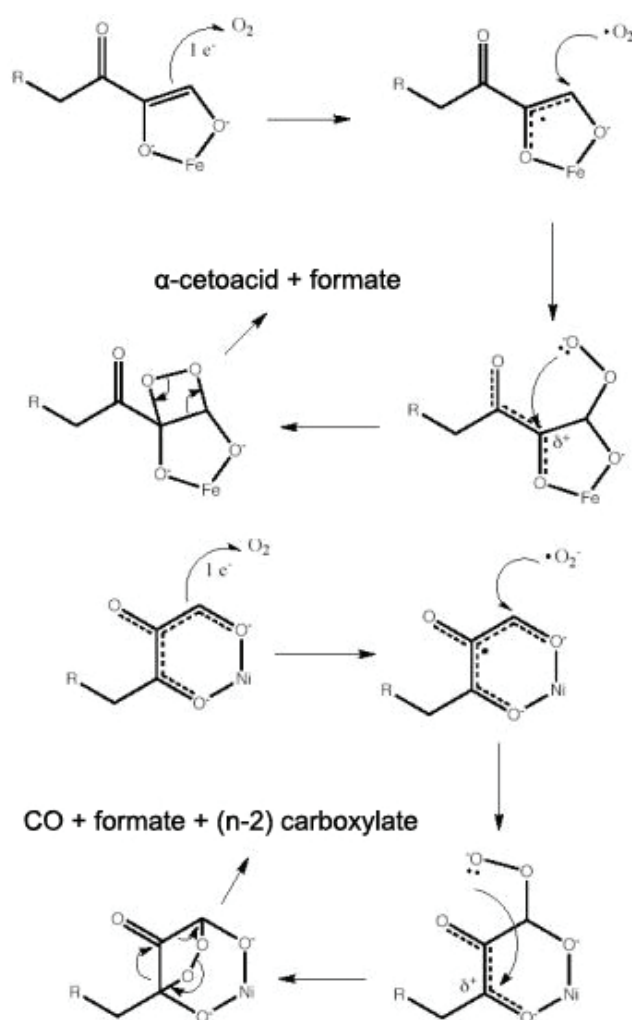


Figure 43. Mécanismes catalytiques de l'ARD en présence de Fe (à gauche) et en présence de Ni (à droite). Tiré de (252).

I.3.4. Conclusion : pourquoi le nickel ?

Le nickel, en tant qu'ion métallique actif du point de vue redox, peut participer à la catalyse tant comme acide de Lewis que comme centre redox. On peut classer les enzymes à nickel suivant le rôle de l'ion métallique.

L'uréase, la glyoxalase I et l'ARD sont les seules enzymes à nickel qui utilisent le nickel uniquement comme acide de Lewis et dont l'état d'oxydation du nickel ne change pas au cours de la catalyse. Deux facteurs semblent importants, qui justifient l'utilisation du nickel lors de la catalyse. Premièrement, le nickel adopte une géométrie de coordination propre, souvent octaédrique ou planaire carrée, qui peut être nécessaire à la catalyse. Le Zn(II), bien que liant la glyoxalase I avec une plus forte affinité que le Ni(II), n'adopte pas la conformation requise à l'activité enzymatique (248). Dans le cas de l'ARD, la conformation différentielle adoptée par le Ni(II) par rapport au Fe(II) permet à l'enzyme de former différents produits à partir du même substrat (252). De même, les ions nickel de l'uréase adoptent des géométries de coordination inadaptées au Zn(II) (238). Deuxièmement, le Ni(II) semble être un meilleur électrophile que le Zn(II) et est donc un meilleur catalyseur de réaction d'hydrolyse, comme l'hydrolyse d'urée, par exemple (253). Mais pourquoi alors les hydrolases n'utilisent pas toutes du Ni(II) au lieu de Zn(II) ? Vu le système complexe nécessaire à l'importation et à l'incorporation du Ni(II) dans l'uréase, on comprend que cela demande beaucoup d'énergie à la cellule et que, dans le cas où du Zn(II) est suffisant pour obtenir une catalyse correcte, le Ni(II) ne soit pas nécessaire. Seulement quand la catalyse est plus difficile, comme c'est le cas pour l'uréase, l'utilisation de Ni(II) acquiert tout son sens (253).

L'utilisation de nickel dans le cas de la Ni-SOD semble plutôt liée à la disponibilité du nickel chez les organismes utilisant cette enzyme. En effet, celle-ci est exprimée en présence de Ni(II) seulement et en absence de Ni(II) c'est une Fe-SOD qui est exprimée (247). Dans ce cas la principale raison d'utiliser le nickel semble être sa disponibilité dans le milieu.

Les 4 dernières enzymes à nickel, la [NiFe]-hydrogénase, la MCR, la CODH et l'ACS partagent toutes certaines propriétés communes. Premièrement, elles sont toutes sensibles à l'oxygène et se retrouvent principalement impliquées dans le métabolisme des bactéries anaérobies. Deuxièmement, le noyau métallique de ces enzymes passe toujours par un état réduit lors de la catalyse, le Ni(II) étant alors réduit en Ni(I), voire en Ni(0). Finalement, à

part la MCR, elles possèdent toutes un noyau bimétallique composé d'un nickel comme centre redox et d'un deuxième ion métallique (Fe(II) ou Ni(II)) inerte du point de vue redox. Les deux métaux se trouvent à une distance permettant un lien métal-métal de se former, ce qui pourrait faire baisser le potentiel de réduction du couple bimétallique et ainsi faciliter la réduction du noyau métallique ou l'addition d'un substrat riche en électron (254). Dans ces cas-là, la présence d'un nickel semble se justifier par la possibilité de réduire facilement le Ni(II) en Ni(I), voire en Ni(0).

En conclusion, l'utilisation de nickel dans les enzymes nickel-dépendantes se justifie généralement par l'extrême plasticité de cet ion métallique en termes de géométrie de coordination et de catalyse redox. Le centre métallique de la Ni-SOD est capable de processus redox dont les potentiels s'étendent de +890 mV à -160 mV, tandis que les centres métalliques de la MCR et de la CODH sont capables d'atteindre des potentiels jusqu'à -600 mV. Les centres catalytiques à nickel sont donc capables de réaliser des réactions redox sur une gamme de potentiel de 1,5 V (255).

I.4. Quatrième partie : les régulateurs transcriptionnels de la famille Crp-Fnr

I.4.1. Généralités

I.4.1.1. Diversité des régulateurs de la famille Crp-Fnr

Les bactéries vivent dans des environnements très divers. Ces environnements sont rarement stables et exposent les bactéries à des changements continuels et à des manques de nutriments chroniques. Les bactéries doivent donc pouvoir répondre rapidement à des conditions transitoires et à un déséquilibre des ressources en activant les voies métaboliques nécessaires et en réprimant celles qui sont inutiles. Les régulateurs transcriptionnels de la famille Crp-Fnr permettent aux bactéries de réaliser les changements d'expression nécessaires et de s'adapter aux conditions changeantes du milieu en répondant à un grand nombre de signaux différents. Les fonctions de ces régulateurs s'étendent du contrôle de la virulence à de la dégradation des cycles aromatique en passant par la photosynthèse, la fixation d'azote et la régulation des différents types de respiration. Le premier membre découvert de cette famille est le régulateur Crp pour protéine réceptrice de l'AMP cyclique (cAMP), aussi appelé CAP pour protéine activatrice du catabolisme. Cette protéine représente le paradigme du régulateur transcriptionnel et est largement décrite dans les livres de références. Le régulateur Fnr, quant à lui, représente le paradigme du régulateur transcriptionnel sensible à l'oxygène et illustre la diversité de la famille Crp-Fnr. Fnr détecte la présence d'oxygène grâce à un noyau fer-soufre dont la dissociation inactive le régulateur. Fnr signifie régulateur de fumarate et nitrate réductase, qui sont les principales enzymes impliquées dans le métabolisme anaérobie d'*E. coli*. Depuis la découverte de Crp et de Fnr, de nombreux régulateurs ont rejoint la grande famille des régulateurs transcriptionnels de type Crp-Fnr. Pour certains régulateurs, l'effecteur est connu, par exemple Flp est sensible au stress oxydatif chez les bactéries lactiques, Dnr et Nnr sont sensibles au NO, NtcA est sensible au taux d'azote chez les cyanobactéries via le taux de 2-oxoglutarate, HbaR régule la 4-hydroxybenzoate-coenzyme A ligase en présence de 4-hydroxybenzoate, CprK est sensible aux substrats halogénés, CooA est sensible au CO et NarR

est sensible au nitrate ou au nitrite (Fig. 44). Pour certains membres de la famille, le rôle du régulateur est connu mais le signal reconnu par la protéine n'a pas été identifié. Par exemple, YeiL est impliquée dans la survie en phase stationnaire, PrfA dans la régulation de la virulence, MalR est sensible au maltose et ArcR est impliquée dans l'utilisation de l'arginine, mais les molécules effectrices de ces régulateurs sont encore inconnues. De nombreux autres membres de la famille Crp-Fnr ont été identifiés dont la fonction reste encore à découvrir (256).

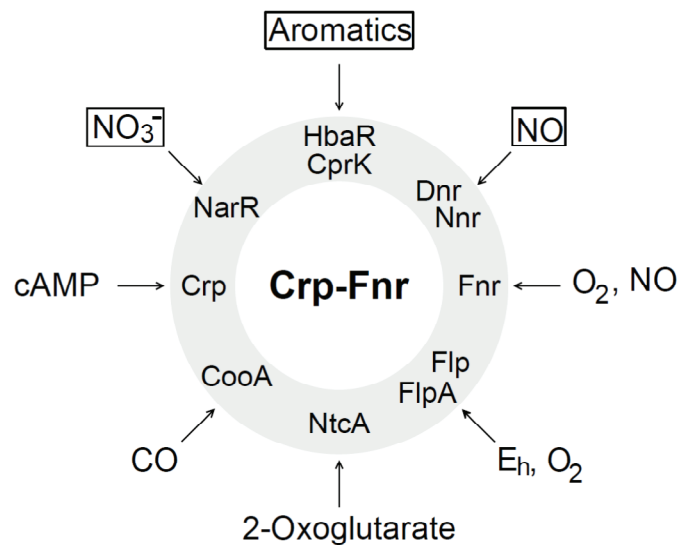


Figure 44. Signaux reconnus par les régulateurs de la famille Crp-Fnr. Les signaux entourés sont ceux dont on n'a pas encore prouvé d'interaction directe avec le régulateur correspondant. Tiré de (254).

I.4.1.2. Structure des régulateurs de la famille Crp-Fnr

Les régulateurs de cette famille ont une taille généralement constante, comprise entre 230 et 250 acides aminés. Ils sont caractérisés par un domaine C-terminal possédant un motif HTH pour « helix-turn-helix » qui forme deux hélices α interagissant avec le sillon majeur de l'ADN (Fig. 45). C'est ce domaine qui est responsable de la reconnaissance de l'ADN et de la fonction d'activation ou de répression du régulateur. Le domaine N-terminal, de 170 acides aminés environ, est homologue aux domaines de liaison du cAMP (Fig. 45). C'est ce domaine qui est sensible aux signaux perçus par le régulateur et qui influence la liaison à l'ADN. Entre ces deux domaines principaux, une longue hélice α est responsable de la dimérisation du

régulateur. Trois modes de reconnaissance peuvent être utilisés par le domaine N-terminal pour la perception des signaux. Le mode le plus basique est la modification directe de ce domaine par le signal. L'oxydation d'une cystéine ou la réaction avec une molécule réactive, telle que le NO, permet une modification directe du régulateur par le signal. Le deuxième mode de reconnaissance utilise un groupe prosthétique lié à la protéine, tel qu'un noyau fer-soufre ou un hème, pour lier une petite molécule signal comme l'O₂, le NO ou le CO. Dans le troisième mode de liaison, le domaine N-terminal lie directement la molécule signal et le changement conformationnel induit par ce changement modifie la liaison du domaine C-terminal à l'ADN. La forme du régulateur liant l'ADN est généralement la forme du régulateur ayant perçu le signal, mais le cas inverse existe aussi. Par exemple, c'est la perte du signal par FlpA qui induit sa liaison à l'ADN (256).

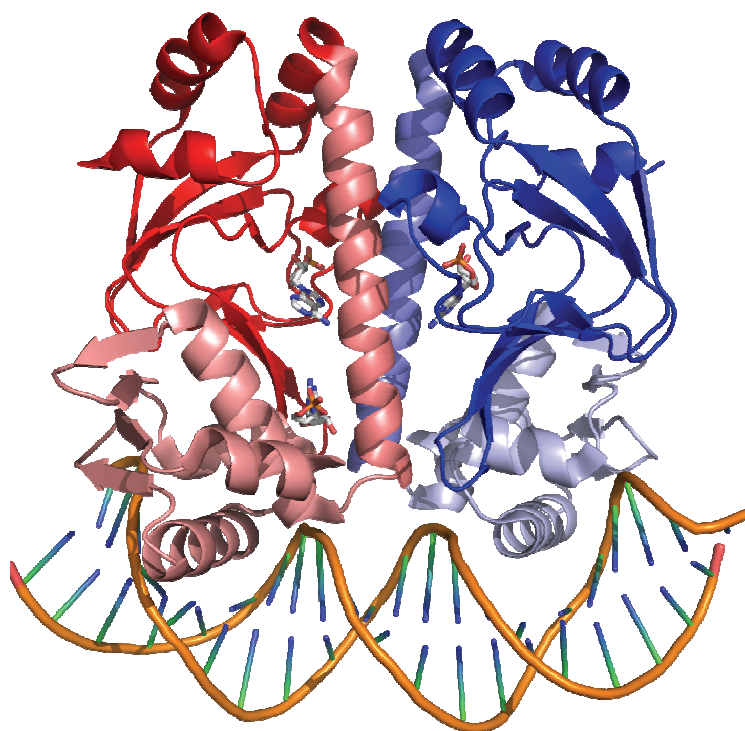
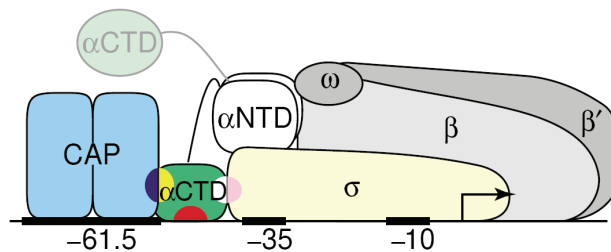


Figure 45. Structure de Crp de *My. Tuberculosis* en complexe avec l'ADN (PDB code : 3MZH). Les deux monomères sont en bleu et en rouge et pour chaque monomère le domaine N-terminale est en foncé, le domaine C-terminal est en clair et l'hélice α responsable de la dimérisation est dans une tonalité intermédiaire. Les molécules d'AMP cyclique sont indiquées en bâtonnets avec le C en blanc, le O en rouge, le N en bleu et le P en orange.

I.4.1.3. Modes de régulation du régulateur Crp

Les régulateurs de la famille Crp-Fnr lient l'ADN sous forme de dimères et reconnaissent généralement un motif palindromique de 14 à 22 paires de bases, propre à chaque régulateur (256). En fonction de la position de ce palindrome par rapport au début de la transcription, plusieurs modes de régulation par les membres de la famille Crp peuvent être établis. Ces modes de liaison sont illustrés par les différents types de promoteurs régulés par Crp. Les promoteurs régulés par Crp peuvent en effet être regroupés en trois classes. Dans le cas des promoteurs de classe I, Crp interagit avec la partie C-terminale de la sous-unité α de l'ARN polymérase (ARNP). Le site de fixation unique de Crp sur le promoteur se situe alors à une distance de $61,5 + n \cdot 10,5$ ($n = 0, 1, 2$ ou 3) paires de bases en amont du début de la transcription (Fig. 46). En effet, seulement à ces distances le régulateur Crp et l'ARNP sont correctement alignés et peuvent interagir l'un avec l'autre. Les promoteurs de classe II possèdent un site de fixation de Crp qui remplace la boîte -35 reconnue par la sous-unité σ de l'ARNP. Dans ce cas Crp interagit avec la partie N-terminale de la sous-unité α de l'ARNP et se situe donc plus près du début de la transcription, à 41,5 paires de bases (Fig. 46).

(a)



(b)

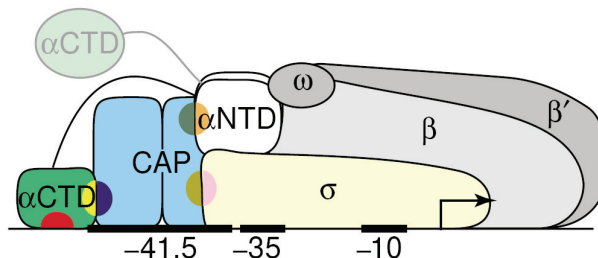


Figure 46. Activation de la transcription par Crp (ici dénommé CAP). **A**, promoteur de classe I. **B**, promoteur de classe II. α NTD et α CTD, partie N- et C-terminale de la sous-unité α de l'ARN polymérase, respectivement. Tiré de (257).

Les promoteurs de classe III nécessitent plusieurs régulateurs pour une activation complète de la transcription. Plusieurs dimères de Crp peuvent être impliqués dans la régulation, ou alors une combinaison d'un ou plusieurs Crp avec un autre régulateur. Ce type de promoteur possède alors plusieurs sites de liaison à l'ADN, situés généralement soit à une distance de $61,5 + n \cdot 10,5$ ($n = 0, 1, 2$ ou 3) paires de bases du début de la transcription, comme pour les promoteurs de classe I, soit à 41,5 paires de bases du début de la transcription, comme pour les promoteurs de classe II. Les promoteurs de classe III combinent donc des sites de liaisons des promoteurs de classe I et II (257, 258).

De manière plus générale, dans le cas d'activateurs transcriptionnels, les sites de liaison à l'ADN se situent généralement entre 40 et 100 paires de bases du début de la transcription et dans le cas des répresseurs de la transcription, ceux-ci se situent plutôt entre 1 et 60 paires de bases du début de la transcription, à l'endroit où se lie la RNAP. Cela suggère que l'activation de la transcription s'opère principalement par un des mécanismes décrit ci-dessus, alors que la répression de la transcription s'opère plutôt par encombrement stérique du site de liaison de l'ARNP (259).

I.4.2. Le groupe PrfA

I.4.2.1. PrfA

Le groupe PrfA est un groupe de régulateurs transcriptionnels de la famille Crp-Fnr principalement lié à la régulation de la virulence. Comme LarR, le régulateur transcriptionnel probablement impliqué dans la régulation de l'opéron *larA-E* chez *L. plantarum*, est phylogénétiquement très proche des membres de ce groupe, nous nous intéresserons plus particulièrement à ceux-ci. Le membre principal du groupe est PrfA (« Positive regulatory factor A »), qui est le régulateur de la virulence chez *Listeria monocytogenes*. PrfA induit l'expression des gènes impliqués dans la virulence au moment où le pathogène se retrouve dans le cytosol de son hôte. L'activation de ces gènes s'effectue par liaison d'un dimère de PrfA sur la séquence consensus TTAACANNTGTTAA, appelée PrfA-box, généralement située 41,5 paires de bases en amont du début de la transcription (Fig. 47) (260). L'activation

de PrfA s'effectue par la liaison d'un facteur de l'hôte qui n'a pas encore été identifié, probablement une petite molécule anionique de type messenger secondaire (261).

I.4.2.2. Srv et Ers

Srv et Ers sont tout deux des régulateurs également impliqués dans le contrôle de la virulence, chez *St. pyogenes* pour Srv et chez *En. faecalis* pour Ers (262, 263). Ils se lient également à un motif de l'ADN ressemblant à la PrfA-box, à quelques différences près. Le site de liaison de Srv est plus contracté que la PrfA-box de 2 paires de bases (264) et le consensus du site de liaison d'Ers ne fait que 11 paires de bases (Fig. 47) (265). Une différence importante par rapport à PrfA est la plus grande variabilité des distances séparant ces sites de liaison du début de la transcription. Les sites de liaison de Srv sont situés à 28, 43, 113 et 207 paires de bases en amont et les sites de liaison d'Ers à 50, 67 et 186 paires de bases en amont du début de la transcription (264, 265). Ces distances ne correspondent pour la plupart pas aux distances observées chez Crp, mais cela n'empêche apparemment pas les régulateurs de réaliser leur fonction d'activation. Comme PrfA, Srv semble nécessiter la liaison d'un ligand pour être actif, alors qu'Ers semble être constitutivement actif (264, 265).

I.4.2.3. RcfB

RcfB est un membre du group PrfA qui est induit en condition de stress acide chez *Lc. lactis*. L'expression des gènes régulés par RcfB dépend de la présence, 41,5 paires de bases en amont du début de la transcription, d'une séquence d'ADN ressemblant assez à la PrfA-box et appelée ACID-box (Fig. 47). RcfB serait donc responsable de la réponse de *Lc. Lactis* au stress acide, et peut-être également à d'autres stress. L'effecteur de RcfB n'est pas connu (266).

I.4.2.4. Fnr_{Bac}

Le régulateur Fnr_{Bac} est responsable de l'adaptation de *B. subtilis* à un environnement anaérobie. Bien que possédant également un cluster fer-soufre sensible à l'oxygène comme Fnr, Fnr_{Bac} n'appartient pas au groupe phylogénétique de Fnr mais plutôt au groupe PrfA. En outre, le noyau fer-soufre de Fnr_{Bac} se situe dans son domaine C-terminal, alors que le noyau fer-soufre de Fnr se situe dans la partie N-terminale du régulateur. Fnr_{Bac}

reconnait une séquence d'ADN différente de la PrfA-box et plus proche de celle reconnue par le régulateur Crp (Fig. 47). Cette séquence est située 41,5 paires de bases en amont du début de la transcription, comme pour les promoteurs de classe II (267).

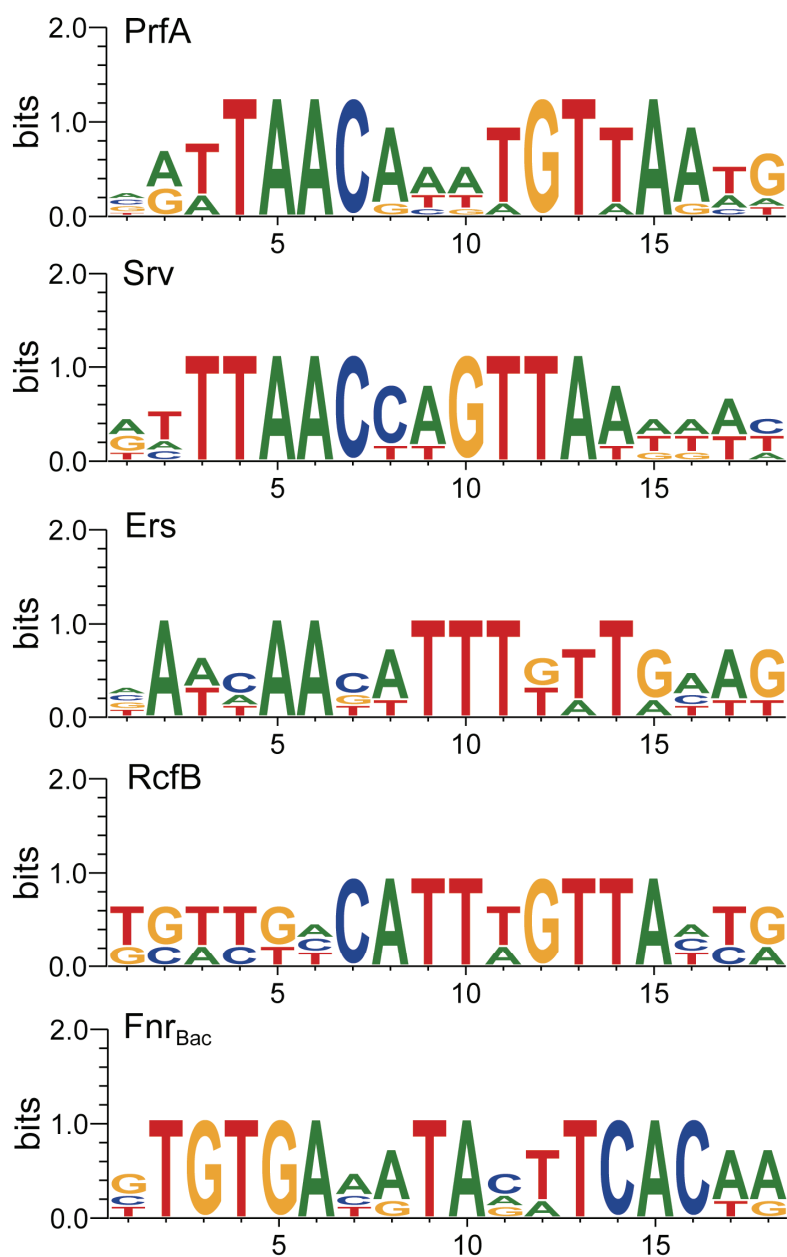


Figure 47. Logos des séquences reconnues par les régulateurs du groupe PrfA. Les logos ont été générés par Weblogo 3 (<http://weblogo.threeplusone.com/>).

II. Objectifs

Objectifs

Au démarrage de cette thèse, les données biochimiques sur la lactate racémase étaient très fragmentaires et avaient seulement été obtenues au départ de protéines partiellement purifiées (4, 5). Les raisons de ce manque de données étaient diverses. Premièrement, le gène de la lactate racémase est longtemps resté indéterminé, ce qui rendait impossible son expression hétérologue. Deuxièmement, la sensibilité de la lactate racémase à l'oxygène (172) rendait la purification de l'enzyme très délicate et son étude biochimique compliquée. Troisièmement, le(s) cofacteur(s) de la lactate racémase étant inconnu(s), de nombreuses hypothèses ont été émises quant à la nature de ce(s) cofacteur(s), mais le nickel n'a jamais été proposé parmi ceux-ci (4, 5, 178).

Une avancée majeure a été réalisée dans le domaine lors de la découverte par notre laboratoire d'un locus de neuf gènes impliqué dans l'activité de racémisation du lactate chez *L. plantarum*. Ce locus a été appelé *lar* pour lactate racémase. La présence d'un transporteur à nickel dans ce locus suggéra par ailleurs que la lactate racémase puisse être une enzyme utilisant le nickel comme cofacteur. La délétion de ce transporteur et la complémentation du phénotype du mutant par l'ajout de nickel exogène confirma cette hypothèse. Ces données ont permis de répondre à la question du cofacteur de la lactate racémase et de déterminer le rôle de trois des neuf protéines du locus *lar*.

De plus, les délétions de l'opéron *larA-E* et du gène *larR* ont montré que tous deux étaient indispensables à l'activité de racémisation du lactate chez *L. plantarum*. Les protéines LarA-B-C-E seraient responsables de l'activité lactate racémase, LarR serait un régulateur transcriptionnel régulant le locus *lar* en réponse au ratio L-/D-lactate et LarD serait une aquaglycéroporine impliquée dans le transport d'une petite molécule en lien avec la lactate racémase. Bien que suspectée, le rôle de chacune de ces protéines restait cependant encore à démontrer.

L'objectif de la thèse était donc de caractériser génétiquement et biochimiquement l'ensemble du système de racémisation du lactate chez *L. plantarum*. Pour cela, nous avons procédé à la caractérisation des protéines du locus *lar* en trois étapes :

1. Caractérisation des protéines LarA-B-C-E.

Quelle est l'enzyme responsable de la racémisation du lactate ? La lactate racémase est-elle composée de plusieurs sous-unités et/ou utilise-t-elle des protéines accessoires ? Le lactate racémase est-elle une enzyme nickel-dépendante ? Si oui, comment celui-ci est-il chargé dans l'enzyme ? Quelle est la structure tridimensionnelle de la lactate racémase ? Quel est son mécanisme catalytique ?

2. Caractérisation de l'aquaglycéroporine LarD.

LarD est-elle impliquée dans le transport d'acide lactique, d'un cofacteur de la lactate racémase ou d'une autre molécule ? Quel est le rôle des autres aquaglycéroporines de *L. plantarum* ?

3. Caractérisation du régulateur LarR.

LarR est-il responsable à lui seul de la régulation des deux opérons du locus *lar* ? Comment cette régulation s'effectue-t-elle ? Via quel motif LarR se lie-t-il à l'ADN ? Quel(s) est(sont) la(les) molécule(s) effectrice(s) de LarR ?

III. Résultats

III.1. Première partie : l'opéron *larA-E*

L'opéron *larA-E* a été montré comme étant nécessaire à l'activité de racémisation du lactate chez *L. plantarum*. Pourtant les racémases sont généralement composées d'une seule sous-unité, comment peut-on alors expliquer que 4 protéines soient nécessaires à la racémisation du lactate chez *L. plantarum* ?

Afin de répondre à cette question, une étude génétique de chacun des gènes constituant l'opéron *lar*, ainsi qu'une étude biochimique des protéines encodées par ces gènes, ont été réalisées.

Nous avons choisi de travailler avec un système hétérologue en exprimant l'entièreté de l'opéron *larA-E* chez *Lc. Lactis*, une bactérie lactique dépourvue d'activité Lar. Une fois ce système validé, nous avons réalisé la délétion de chacun de gènes de l'opéron, afin de déterminer quels gènes étaient indispensables à l'activité Lar. Nous avons ainsi pu montrer que les 4 gènes *larA*, *larB*, *larC* et *larE* étaient indispensables à l'activité Lar.

L'étape suivante a été la purification des protéines encodées par ces gènes afin d'étudier la fonction de chacune d'elle *in vitro*. Une fois purifiée, LarA seule était capable de racémiser l'acide lactique, montrant par là qu'elle est la lactate racémase au sens strict. La caractérisation biochimique de la lactate racémase a ensuite été réalisée : les constantes cinétiques, le profil pH et le profil de température ont été déterminés. Plusieurs inhibiteurs compétitifs ont été étudiés et le processus d'inactivation de la lactate racémase a également été investigué. Le fait que LarA soit une protéine nickel-dépendante a été confirmé par la dépendance entre l'activité enzymatique et le contenu en nickel de LarA.

Cependant, le rôle des trois autres protéines LarB, LarC et LarE restait encore indéterminé. Etant donné que l'activité de LarA est conditionnée à la coexpression des protéines LarB, LarC et LarE, celles-ci joueraient probablement le rôle de protéines accessoires. Cette hypothèse a été confirmée par l'activation *in vitro* de LarA par LarE purifiée. Cette activation était néanmoins conditionnée à la coexpression de LarB et LarC lors de la surexpression de LarE. Nous en avons donc conclu que le processus d'activation de LarA se déroule en au moins deux étapes : une ou plusieurs étape(s) d'activation de LarE par LarB et LarC suivie de l'activation de LarA par LarE. LarC étant très fortement chargée en nickel et

LarE étant également chargée en nickel, le processus d'activation implique vraisemblablement le transfert du nickel de LarC vers LarE et finalement vers LarA.

Vu que la séquence primaire de LarA ne montre de similarité avec aucune protéine de structure ou de fonction connue, la détermination de la structure tridimensionnelle de LarA a été réalisée. Cette structure originale montre un repliement jamais observé auparavant. Cependant, l'absence de cofacteur ou de substrat dans la structure nous a peu éclairés sur le mécanisme catalytique de la lactate racémase. Des données obtenues par spectrométrie d'absorption des rayons X ont indiqué que le nickel serait coordonné par plusieurs histidines et adopterait une géométrie de coordination de type pyramide carrée.

La confrontation de nos données avec les données antérieures nous a mené à émettre l'hypothèse d'un transfert d'hydrure sur le nickel comme mécanisme catalytique probable.

Finalement, une analyse bioinformatique nous a permis de déterminer la répartition des gènes de lactate racémase au sein des procaryotes et ainsi évaluer la prévalence de cette réaction enzymatique chez ceux-ci.

Article soumis au journal « Proceedings of the National Academy of Sciences ».

Contribution des auteurs de ce travail.

Benoît Desguin : surexpression de l'opéron *larABCDE* chez *Lc. Lactis* et délétions individuelles des gènes de l'opéron. Purification des protéines LarA, LarB, larC et LarE et analyse biochimique de LarA et de son processus d'activation. Analyse bioinformatique des gènes *lar*. Ecriture de l'article.

Eric Viaene : délétion des gènes *lar(MN)OQ* chez *L. plantarum* et complémentation du phénotype par le nickel.

Philippe Goffin et Michiel Kleerebezem : obtention et analyse des données transcriptomique de *L. plantarum* en présence de L- et de DL-Lactate. Contribution à l'écriture de l'article.

Vlad Martin-Diaconescu et Michael Maroney : obtention et analyse des données de spectrométrie d'absorption des rayons X (EXAFS et XANES).

Résultats : la lactate racémase

Jean-Paul Declercq : cristallisation de LarA et résolution de sa structure tridimensionnelle.

Patrice Soumilion et Pascal Hols : superviseurs du travail.

Lactate racemase, a chaperone-activated nickel-dependent enzyme with a novel α/β fold

Short title: Ni-dependent lactate racemase

Benoît Desguin^a, Philippe Goffin^{a*}, Eric Viaene^a, Michiel Kleerebezem^{b,c}, Vlad Martin-Diconescu^d, Michael J Maroney^d, Jean-Paul Declercq^{e,a}, Patrice Soumillion^{a,e,1,2} and Pascal Hols^{a,1,2}

^aInstitute of Life Sciences and ^eInstitute of Condensed Matter and Nanosciences, Université catholique de Louvain, 1348 Louvain-La-Neuve, Belgium

^bNIZO Food Research, 6718 ZB Ede, The Netherlands

^cHost Microbe Interactomics Group, Wageningen University, 6708 WD Wageningen, The Netherlands

^dDepartment of Chemistry, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts 01003, United States

*Present address: GlaxoSmithKline Vaccines, 1330 Rixensart, Belgium

¹P.S. and P.H. contributed equally to this work

²Corresponding authors. Pascal Hols and Patrice Soumillion, Institut des Sciences de la Vie, Université catholique de Louvain, Place Croix du Sud 5, Box L7.07.06, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium. P.H., Tel. +32 10 478896, pascal.hols@uclouvain.be. P.S., Tel. +32 10 473075, patrice.soumillion@uclouvain.be.

MANUSCRIPT INFORMATION: number of characters 40,000, of figures 4 and of tables 1

CLASSIFICATION: Biological sciences, Biochemistry

DATA DEPOSITION FOOTNOTE: Atomic coordinates for the LarA of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID code 2YJG). The normalized transcriptome data have been deposited in the GEO database (accession no. GSE43518).

ABBREVIATIONS: MALDI-TOF, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation- time-of-flight mass spectrometry; EXAFS, Extended X-Ray Absorption Fine Structure; XANES, X-Ray Absorption Near Edge Structure, ICP-AES, Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy.

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare no conflict of interest

AUTHOR CONTRIBUTIONS: B.D., P.G., P.S., and P.H. designed research; B.D., E.V., V.M.-D., and J.-P.D. performed research; B.D., P.G., M.K., V.M.-D., M.J.M., P.S., and P.H. analyzed data; and B.D., P.S., and P.H. wrote the paper.

SUPPLEMENTARY TEXT INCLUDED

Abstract

Lactic acid is ubiquitous in nature and is involved in the energy metabolism of many prokaryotic species, as a product of sugar fermentation or as a carbon and electron source to sustain growth. It can even be a component of the bacterial cell-wall. Remarkably, micro-organisms have the ability to metabolize both lactic acid isomers, via L- and D-lactate dehydrogenases and/or lactate racemase (Lar). Since the discovery of Lar activity 77 years ago, the biochemistry of the Lar enzyme has remained largely unexplored due to a lack of molecular characterization. Here, we show that four proteins (LarA, LarB, LarC, and LarE) and nickel as a cofactor, are absolutely required for lactate racemization. The purified Ni-containing LarA protein was identified as the lactate racemase, while LarBCE constitute an original maturation machinery required for the activation of LarA. *In vitro* experiments demonstrate that LarE is pre-activated by LarB and LarC, a process including its Ni loading by LarC. Activated LarE then acts alone as a maturation protein required for the activation of LarA. The structure of LarA was solved and revealed a novel α/β fold. LarA crystals were devoid of Ni, but EXAFS and XANES results predict a five square pyramidal Ni center coordinated by at least two histidines. The presence of lactate racemase associated genes in 25 % of all prokaryotic genomes strongly suggests a broad function of high physiological relevance.

Introduction

Many microorganisms can produce either one of the two lactic acid isomers or a racemic mixture from sugar fermentation. This is achieved by the reduction of the glycolytic pyruvate via stereospecific NAD-dependent lactate dehydrogenases (L-Ldh and D-Ldh) possibly followed by isomer interconversion via a lactate racemase (Lar) (1). Lactate is much more than a waste product of sugar fermentation as it can also serve as a growth substrate for many microorganisms, either in aerobic or in anaerobic conditions (1). This explains why only very low lactate concentrations are usually found in anaerobic ecosystems, despite the fact that lactate is a major fermentation end product (2). Lactate utilization involves stereospecific lactate dehydrogenases (NAD-dependent or NAD-independent) converting lactate to pyruvate, which is then oxidized to acetate and/or CO₂ (1, 3). If only one stereospecific iLdh is present, lactate utilization of the other isomer may proceed via lactate racemization.

Lactate racemase (Lar) activity was first reported in *Clostridium beijerinckii* (formerly *C. butylicum*) (4) and, since then, it has been found in a restricted number of species including lactobacilli (5-8). *Megasphaera elsdenii* and *Selenomonas ruminantium*, for instance, use lactate racemization in order to grow on both isomers of lactate (7, 8). For lactic acid producers, such as *Lactobacillus sakei*, which produces both lactate isomers via a single stereospecific L-Ldh, followed by racemization (9), the physiological role of lactate racemization is less obvious, since lactic acid is mainly excreted as a waste product of fermentation. The situation is even more puzzling in species where both L- and D-Ldh are found, such as *Lactobacillus plantarum* (10). In this case, lactate racemization may be used as an alternative route for D-lactic acid production besides pyruvate reduction by D-Ldh (10). This alternative pathway appears to be active in slow-growing cells of *L. plantarum* (11). In the context of lactic acid producers, lactate racemization thus appears to be involved in the production of D-lactate, an essential component of the cell wall of vancomycin-resistant lactobacilli, where D-lactic acid replaces the terminal D-alanine of the peptidoglycan mucopeptide precursor (12, 13).

In many racemases, catalysis involves a carbon protonation/deprotonation mechanism, the pKa of the proton being lowered through intermediate stabilization (14). In mandelate racemase, which is the only characterized enzyme that racemizes an hydroxyacid, stabilization of the deprotonated intermediate takes place through electrostatic interactions with a Mg^{2+} ion, hydrogen bonding with the enzyme, and electronic delocalization (15). In the case of the Lar enzyme, the mechanism is unknown but lactic acid deserves a special mention because the absence of resonance after deprotonation of the α -carbon results in a pKa ~ 3 units higher compared to mandelic acid, and consequently, more difficult proton abstraction (16). A few reports have addressed the biochemical characterization of the Lar enzymes of *L. sakei*, *C. beijerinckii* and *C. acetobutylicum* (9, 17, 18). The most biochemically relevant study concerns Lar of *C. beijerinckii*, which has been partially purified and its catalytic mechanism investigated (18). The authors concluded that lactate racemization may proceed via hydride transfer rather than proton abstraction (19). However, neither the genetic determinants nor the structure of Lar enzymes were investigated in these species. In *L. plantarum*, a previous study identified a gene cluster, which is positively regulated by L-lactate and is required for lactate racemization (10). This locus, named *lar*, is composed of five genes that are organized in an operon:

larA, *larB*, *larC*, *larD* (*glpF1*), and *larE*. Except for the *larD* gene, encoding a membrane protein of the aquaglyceroporin family, the role of the Lar proteins in the racemization of lactate could not be defined based on their primary sequence (10). No similarity to any protein of known structure or function could be found for LarA and LarC. As for LarB and LarE, although similar proteins were found, the resulting predictions were not very informative: LarE was predicted as an ATP-utilizing enzyme of the PP-loop superfamily, and part of the C-terminal sequence of LarB was found to be similar to N₅-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase (10).

In this study, we characterize the genetic basis of lactate racemization, demonstrate the involvement of Ni as an indispensable cofactor, show the implication of accessory proteins for the activation of LarA, and describe the novel fold of the LarA structure.

Results

Nickel is an essential cofactor for Lar activity. A detailed transcriptomic analysis of the genes that are up-regulated by L-lactate in *L. plantarum* revealed that, besides the *larA-E* operon previously identified (10), a second operon consisting of four genes (*lp_0103* to *lp_0100*) is positively induced by L-lactate (Table S1). This operon is located upstream of the *larA-E* operon in an opposite orientation (Fig. 1A). The first gene of the operon, named *larR*, codes for a transcriptional regulator of the Crp-Fnr family while the other three genes, *lar(MN)QO*, encode a three component ATP-binding cassette (ABC) transporter (Fig. 1A). Intriguingly, this ABC transporter is homologous to high-affinity Ni transporters, which are generally associated to Ni-dependent enzymes although no such enzyme is known or predicted in *L. plantarum* (20). We investigated the contribution of this transporter to the Lar activity of *L. plantarum* by marker-less gene inactivation. Deletion of *larQO* resulted in the same Lar-deficient phenotype as deletion of the entire *larA-E* operon (Fig. 1B). Complementation of this phenotype was attempted through supplementation of the culture medium with Co(II), Ni(II), and other divalent metals. Among all tested supplements, only Ni(II) was able to restore Lar activity in the Δ *larQO* mutant. This Ni(II)-dependent recovery of Lar activity was dose-dependent, and 1.5 mM Ni(II) was required for full recovery of the wild-type activity (Fig. 1B). These results demonstrate that Ni is required for the lactate racemization activity.

Table S1. Genes differentially regulated in response to L- or DL-lactate

Locus tag	Gene name	Product	Fold change (log ₂) vs. untreated culture*	
			L-lactate	DL-lactate
lp_0100		nickel transport ATP-binding protein	+ 2.6	not regulated
lp_0101		nickel permease	+ 3.8	not regulated
lp_0102		nickel permease	+ 3.0	not regulated
lp_0103	<i>larR</i>	transcription regulator	+ 3.9	not regulated
lp_0104	<i>larA</i>	unknown	+ 6.1	not regulated
lp_0105	<i>larB</i>	NCAIR mutase, PurE-related protein	+ 5.9	not regulated
lp_0106	<i>larC1</i>	unknown	+ 5.3	not regulated
lp_0107	<i>larC2</i>	unknown	+ 5.2	not regulated
lp_0109	<i>larE</i>	unknown	+ 6.0	not regulated
lp_0230	<i>pts2CB</i>	mannitol PTS, EIICB	- 2.3	not regulated
lp_0242	<i>ndk</i>	nucleoside-diphosphate kinase	- 2.2	not regulated
lp_1108	<i>citE</i>	citrate lyase, beta chain	- 2.1	not regulated
lp_1109	<i>citF</i>	citrate lyase, alpha chain	- 2.3	not regulated
lp_1679	<i>accD2</i>	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase subunit beta	+ 2.7	not regulated
lp_1680	<i>accA2</i>	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase subunit alpha	+ 2.8	not regulated
lp_2371	<i>pyrP</i>	uracil transport protein	not regulated	- 2.5
lp_2696		integral membrane protein	not regulated	- 2.9
lp_2702	<i>pyrC</i>	dihydroorotase	not regulated	- 3.6
lp_2703	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	not regulated	- 3.0
lp_2704	<i>pyrR1</i>	pyrimidine operon regulator	not regulated	- 2.0
lp_2780	<i>pts20A</i>	cellobiose PTS, EIIA	- 2.4	not regulated
lp_2830	<i>ansB</i>	aspartate ammonia-lyase	not regulated	- 2.1
lp_3271	<i>guaC</i>	GMP reductase	not regulated	- 3.6
lp_3313	<i>pflB2</i>	formate C-acetyltransferase	- 2.2	not regulated

*Only genes for which at least 50% of the probes displayed a 4-fold difference vs. control (untreated) conditions were considered regulated (see *Material and Methods*).

Four Lar proteins are required for *in vivo* Lar activity. The *larA-E* operon was cloned on a multicopy plasmid and expressed in the heterologous host *Lactococcus lactis* – a lactic acid bacterium with no Lar activity –, under the control of a nisin-inducible promoter. Nisin-induced cultures of the transformed *Lc. lactis* strain displayed Lar activity at a level 3- to 4-fold higher than in *L. plantarum*. Similar to *L. plantarum*, the Lar activity in *Lc. lactis* was strictly Ni(II)-dependent (Fig. 1C). Each individual gene of the *larA-E* operon was then deleted from the *larA-E* expression plasmid and the Lar activity of the mutants was assayed in *Lc. lactis*. Of the 5 genes of the operon, four were strictly required for Lar activity, while the aquaglyceroporin encoding gene (*larD*) appeared to be dispensable (Fig. 1C). These results suggest that the lactate racemase is either composed of different subunits or activated by accessory proteins.

LarA as the catalytically active lactate racemase. In order to purify the Lar proteins, each one was individually fused to a StrepII-tag at either its N- or C-terminus, and expressed in *Lc. lactis* using the *larA-E* expression vector. Compatibility of the inserted StrepII-tags with Lar activity was verified prior to purification (Fig. S1A). Purification of LarA and LarE could readily be achieved from the strain expressing the entire operon, whereas tagged LarB and LarC could only be purified when the corresponding genes were individually subcloned (Fig. 1D). The identity of each purified Lar protein was confirmed by MALDI-TOF analysis (Dataset S1 on CD-ROM). Upon purification of StrepII-tagged LarC, two distinct proteins were observed with molecular weights around 36 and 55 kDa (Fig. 1A and 1D). The small protein corresponded to the protein encoded by the *larC1* open reading frame (ORF) alone (LarC1). The higher molecular weight protein was found to be a fusion between the proteins encoded by the *larC1* and *larC2* ORFs, most likely resulting from a programmed ribosomal frameshift (Fig. S2) (21).

To confirm this hypothesis, the *larA-E* expression plasmid was modified by inserting 1 base pair at the end of *larC1*, changing the poly-A sequence A₁₀ in A₇GA₃. This modification disrupts the ribosomal frameshift and promotes the expression of the sole LarC1C2 fusion protein, as confirmed by the purification of the resulting gene product (Fig. S1B). The *larA-E* expression plasmid harbouring a fused *larC* gene still showed Lar activity, while the *larA-E* expression plasmid deleted of *larC2* did not (Fig. S1A). This shows that the LarC1C2 gene product is sufficient to obtain Lar activity and that the

additional LarC1 gene product is not required. The additional presence of LarC1 may still be useful, for the storage of excess Ni for example, as shown by the decrease of Lar activity when the ribosomal frameshift is disrupted.

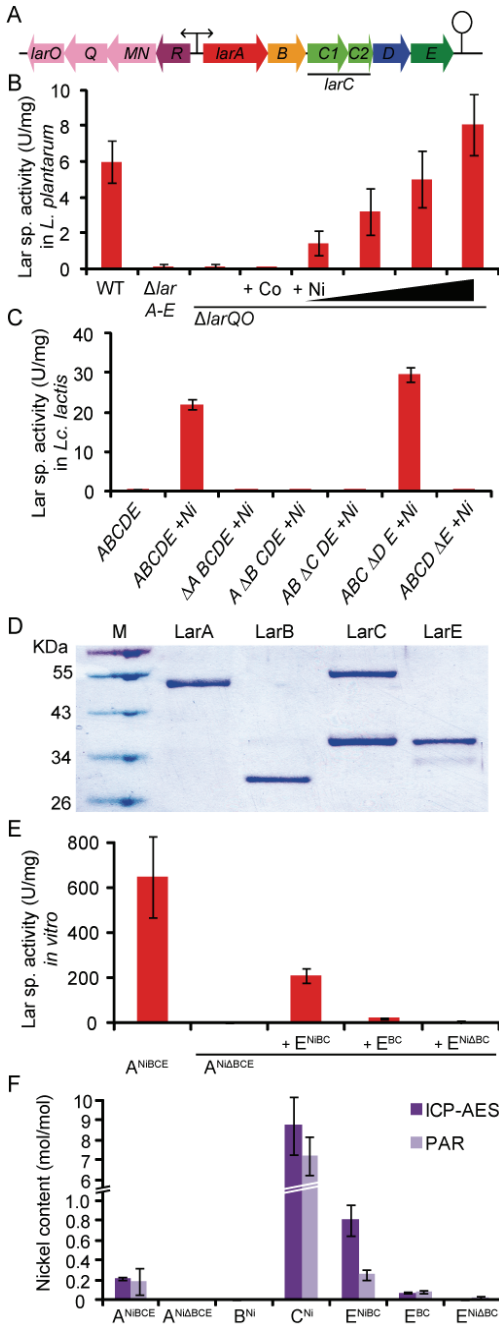


Fig. 1 Analysis of the *lar* gene cluster and its encoded Lar proteins.

A. *lar* locus of *L. plantarum* with the two operons *larR(MN)QO* and *larA-E*. **B.** Effect of *larA-E* and *lar(MN)QO* deletions in *L. plantarum* on Lar specific activity in crude extracts. Supplementation assays of the Δ *larQO* mutant with CoCl_2 (1 mM) and NiCl_2 (0.2, 0.4, 0.8 and 1.5 mM). **C.** Lar specific activity in crude extracts after the expression of *lar* genes in *Lc. lactis*: *larA-E* operon +/- NiCl_2 (1 mM), in frame deletions of individual genes (Δ) in the *larA-E* operon with NiCl_2 supplementation (1 mM). **D.** SDS-PAGE of purified LarA, LarB, LarC (LarC1 and full-length LarC), and LarE. **E.** Specific Lar activity of purified proteins and *in vitro* activation of apoLarA. A^{NiBCE} , LarA purified from a *Lc. lactis* strain expressing or not expressing (Δ) LarBCE and cultivated in the presence of Ni(II) ; $+\text{E}^{\text{NiBC}}$, assay performed in the presence of a 200-fold molar excess of LarE purified from a *Lc. lactis* strain expressing or not expressing (Δ) LarBC and cultivated in the presence of Ni(II) . **F.** Ni content of Lar proteins as measured by PAR assays and ICP-AES.

The error bars represent the 95% confidence interval (Student's *t* test). L-lactate was used as a substrate for all Lar activity measurements.

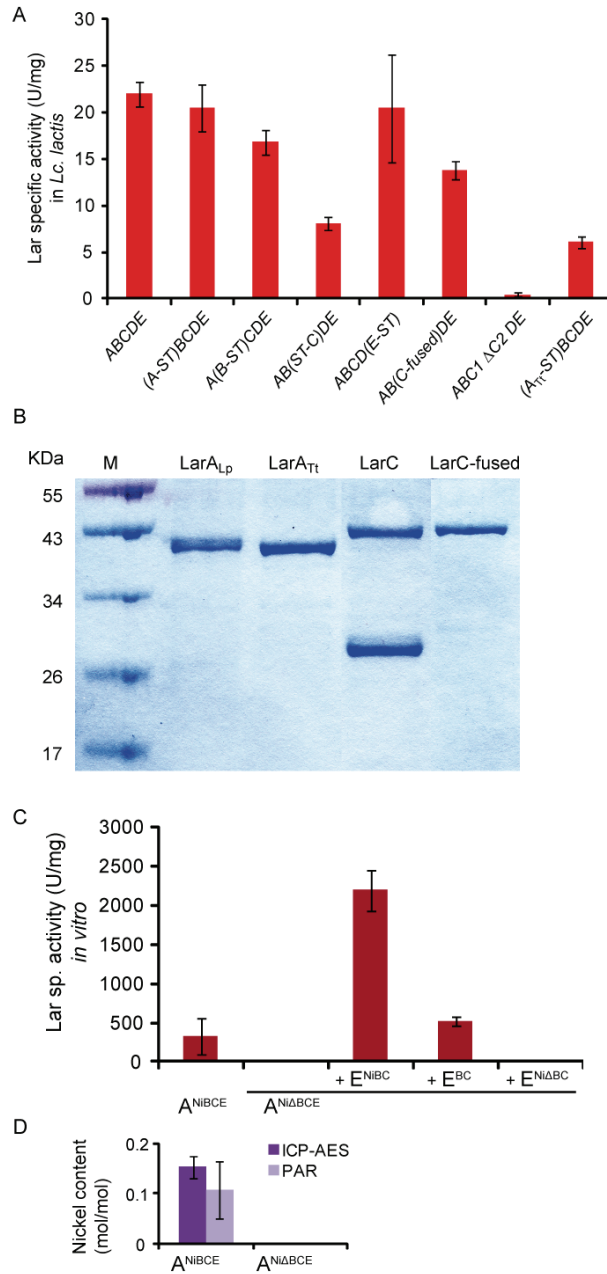


Fig. S1. StrepII-tag insertions in the *larA-E* operon, LarC modifications and LarA_{Tt} activity (legend next page).

A. Lactate racemase specific activity of *Lc. lactis* strains expressing the entire *larA-E* operon of *L. plantarum* in which one the Lar proteins has been fused to a StrepII-tag at either the N- (ST-X) or C-terminus (X-ST), harbouring a 1 bp insertion at the end of *larC1* (C-fused), with the in frame deletions of *larC2* (Δ C2) and expressing the artificial operon *larA_{Tt}BCDE_{Lp}* in which LarA_{Tt} has been fused to a StrepII-tag at the C-terminus (A_{Tt}-ST). NiCl₂ was added in all cases (1mM). **B.** SDS-PAGE of purified LarA_{Lp}, LarA_{Tt}, LarC (LarC1 and LarC1C2), and LarC-fused (only LarC1C2). **C.** (E) Specific Lar activity of purified proteins and *in vitro* activation of apoLarA_{Tt}. A^{NiBCE}, LarA_{Tt} purified from a *Lc. lactis* strain expressing LarBCE and cultivated in the presence of Ni(II); A^{NiABCE}, LarA_{Tt} purified from a *Lc. lactis* strain not

expressing LarBCE and cultivated in the presence of Ni(II); +E^{NiBC}, assay performed in the presence of a 350-fold molar excess of LarE purified from a *Lc. lactis* strain expressing or not expressing (Δ) LarBC and cultivated in the presence or absence of Ni(II); **D.** Ni content of LarA_{Tt} protein as measured by PAR assays and ICP-AES. The error bars represent the 95% confidence interval (Student's *t* test).

Lactobacillus plantarum WCFS1

```
cgagccgtat tattcgaaaa aaaaaactaa gtcagcaa at cgtaaccgg
gctcggcata ataagctttt ttttttgatt cagtcgttta gcaattggcc
>>.....larC1.....>>
  r a v l f e k k n -
                                >>.....larC2.....>>
                                k l s q q i v n r
```

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum DSM571

```
gtaggcacta tagatgtaaa aaaaaagtag aaaatccttac tgttcttgaa
catccgtgat atctacattt ttttttcac ttttagaatg acaagaactt
>>.....LarC1.....>>
  v g t i d v k k k -
                                >>.....larC2.....>>
                                k v e n l t v l e
```

Anaerococcus prevotii DSM 20548

```
atggagatag aaaatcctaa aaaaaaagcc taatcctagc agagactaac
tacctctatc ttttaggatt tttttttcgg attaggatcg tctctgattg
>>.....LarC1.....>>
  m e i e n p k k k a -
                                >>.....larC2.....>>
                                k s l i l a e t n
```

Cyanothece sp. ATCC 51142

```
ataggggaaa aagtgcacaga aaaaaaaaca gtaatgtcga tgtagttgcg
tatccccttt ttcactgtct ttttttttgt cattacagct acatcaacgc
>>.....larC1.....>>
  i g e k v t e k k t v m s m -
                                >>.....larC2.....>>
                                k n s n v d v v a
```

Halanaerobium hydrogeniformans

```
c ttaggcttt atcaggcaaa aaaaaaactg aaaaagaact tttaatatta
gaatccgaaa tagtccgttt tttttttgac tttttcttga aaattataat
>>.....LarC1.....>>
  l r l y q a k k k l k k n f -
                                >>.....larC2.....>>
                                k t e k e l l i l
```

Caldicellulosiruptor saccharolyticus DSM 8903

```
gtaagagcaa tcataggaaa aaaaaactaa acttgagtag caaatacttt
cattctcggt agtatccttt ttttttgatt tgaactcatc gtttatgaaa
>>.....larC1.....>>
  v r a i i g k k n -
                                >>.....LarC2.....>>
                                k l n l s s k y f
```

Fig. S2. LarC frameshifting region. The overlapping regions between *larC1* and *larC2* genes in selected *larC1C2* homologue genes are represented. The NCBI Gene IDs of sequences used are the following: 1061367, 9706584, 8398518, 6168781, 9969866, and 5088176. The proteins presumably encoded are represented in green below the gene sequences.

Of the four purified proteins, LarA was the only one capable of catalyzing lactate racemization. Importantly, co-expression of the other Lar proteins was required to obtain an active LarA, since the protein purified from a strain lacking *larBCE* showed no detectable activity (Fig. 1E). This suggests that LarB, LarC, and LarE act as accessory proteins for activation of the LarA apoprotein.

***In vitro* activation of LarA by a LarBC-activated form of LarE.** The ability of purified LarB, LarC, and LarE to activate apoLarA *in vitro* was evaluated in the presence of various cofactors known to activate nickel-dependent enzymes (Table S2). ApoLarA could be readily activated by adding purified LarE, but only if LarE was co-expressed with LarB and LarC and in the presence of Ni(II) (LarE^{NiBC}, Fig. 1E). No additional cofactor was required for activation (Table S2). Dose-response experiments performed on apoLarA with increasing amounts of LarE^{NiBC} indicated that a 150-fold molar excess of LarE^{NiBC} was required to obtain a fully active LarA, under the conditions of the *in vitro* assay (Fig. S3). These results demonstrate that LarE acts as a chaperone responsible for the activation of apoLarA, and suggest that LarB and LarC are involved in the activation of LarE prior to apoLarA activation.

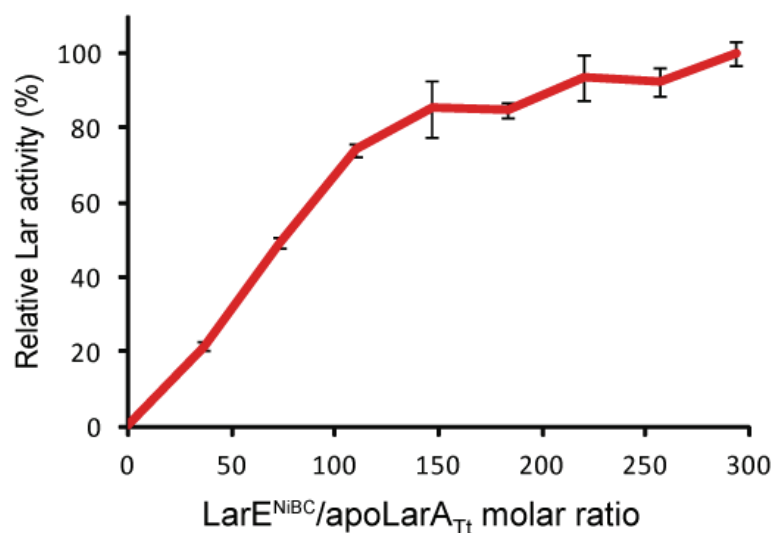


Fig. S3. apoLarA activation by LarE^{NiBC}

Relative Lar activity depending on the LarE^{NiBC}/apoLarA_{Tt} molar ratio. The Lar activity with the 300 molar ratio has been set to 100% relative Lar activity. The error bars represent the 95% confidence interval (Student's *t* test).

Table S2. *In vitro* activation of LarA apoprotein

Ex p	Proteins*				Cofactors [†]				Lar activ ity	Sta bili ty [§]
	apoLa rA _{Tt}	Lar B	Lar C	Lar E	ATP	GTP	NiCl ₂	other		
1	+	-	-	-	-	-	-	-	No	
2	-	+	+	+	-	-	-	-	No	
3	+	+	-	-	- & +	- & +	- & +	-	No	
4	+	-	+	-	- & +	- & +	- & +	-	No	
5	+	-	-	+	-	-	-	-	Yes	0
6	+	-	-	+	+	-	-	-	Yes	0
7	+	-	-	+	-	+	-	-	Yes	0
8	+	-	-	+	-	-	+	-	Yes	+
9	+	-	-	+	-	-	-	cysteine	Yes	+
10	+	-	-	+	-	-	-	SAM	Yes	+
11	+	+	-	+	-	-	-	-	Yes	0
12	+	-	+	+	-	-	-	-	Yes	+
13	+	+	+	+	-	-	-	-	Yes	+
14	+	+	+	+	-	-	+	-	Yes	+
15	+	+	+	+	+	-	+	-	Yes	+
16	+	+	+	+	-	+	+	-	Yes	+
17	+	+	+	+	- & +	- & +	+	KHCO ₃	Yes	0
18	+	+	+	+	-	-	- & +	SAM	Yes	+
19	+	+	+	+	- & +	- & +	+	CoA	Yes	+
20	+	+	+	+	-	-	+	NAD	Yes	+
21	+	+	+	+	- & +	- & +	+	Thi diP	Yes	+

*Purified chaperones LarB, LarC and LarE were added in 10-fold molar excess compared to apoLarA_{Tt}. LarC and LarB were purified from a *Lc. lactis* strain grown in the presence of NiCl₂ and expressing no other Lar protein. LarE was purified from a *Lc. lactis* strain cultivated in the presence of NiCl₂ and co-expressing LarB and LarC.

[†]NiCl₂ was added to the buffer at a concentration of 1 mM, other cofactors were added at a concentration of 5 mM. SAM, S-adenosyl methionine; CoA, coenzyme A; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; Thi diP, thiamine diphosphate.

[§] “0” means the stability is similar to LarA stability. “+” means the Lar activity is at least two times higher after 60 min, compared to control condition without cofactors.

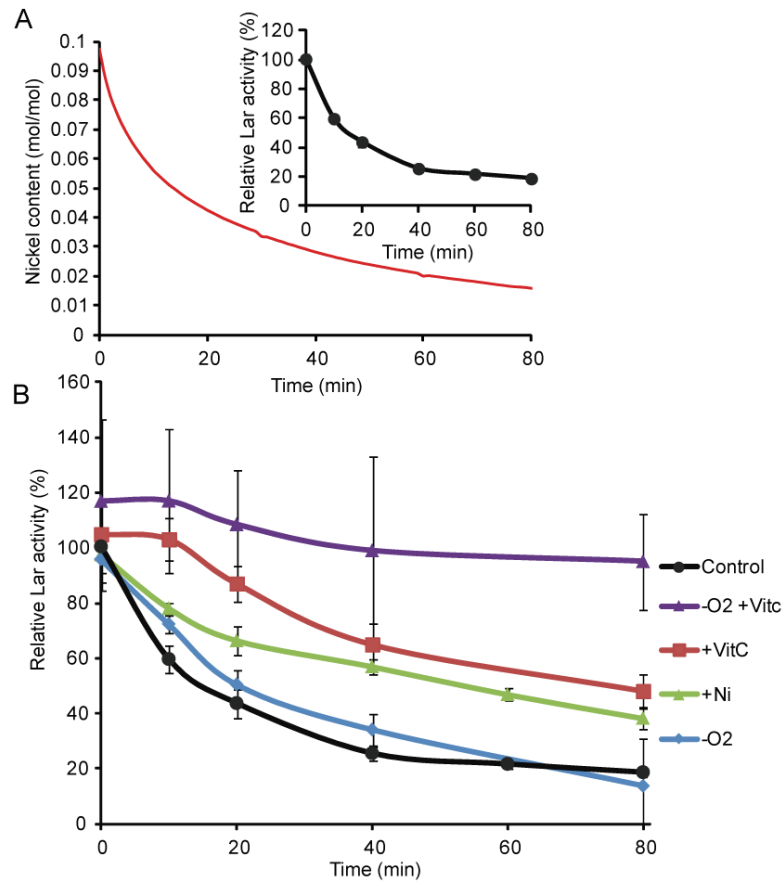


Fig. S4. Ni leakage and inactivation of LarA

A. Time-course of Ni leakage from purified LarA_{Lp} measured by time-dependent PAR assay. Inset the time course of LarA_{Lp} inactivation in MES buffer at pH 6.0. **B.** Time course of LarA_{Lp} inactivation in MES buffer at pH 6.0 (Control), supplemented with 10 mM NiCl₂ (+Ni), supplemented with 10 mM L-ascorbic acid (+VitC), in low O₂ environment (-O₂) or in low O₂ environment supplemented with 10 mM L-ascorbic acid (-O₂ + VitC). The control Lar activity at 0 min has been set to 100% relative Lar activity. The error bars represent the 95% confidence interval (Student's *t* test).

LarA, LarC, and LarE are nickel-containing proteins. *In vivo* and *in vitro* data demonstrate the central role of Ni in lactate racemase activity (Fig. 1B, C, and E). To gain further insight into which of the Lar proteins contain Ni, this metal was assayed in purified Lar proteins by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) and visible spectroscopy using a chromogenic chelator (4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR)) (Fig. 1F) (22). Except for LarB, Ni was detected in every Lar protein, albeit at different levels.

The catalytically active LarA – as purified from a *Lc. lactis* strain expressing LarBCE and cultivated in the presence of Ni(II) –, contained about 0.2 mol Ni per mol protein (Fig. 1F). Upon incubation at room temperature, free Ni became progressively available, which was correlated with a progressive loss of activity (Fig. S4A), indicating that it was leaking out of LarA. However, the rate of inactivation of LarA could be significantly reduced in the presence of the anti-oxidant L-ascorbic acid in a partially anaerobic environment, and to a lesser extent, in the presence of Ni(II) (Fig. S4B). Altogether, these observations confirm the previously reported sensitivity of lactate racemase to oxidants (5) and further highlight Ni leakage as an additional inactivation mechanism. Purified LarC displayed the highest Ni content among all Lar proteins with 7 to 10 mol Ni per mol protein, considering that purified LarC is a mixture of LarC1 and LarC in a ratio of about 1.5:1 (Fig. 1D). This observation is consistent with the strong over-representation of His residues in LarC1 (8.0% vs. 1.7% in average *L. plantarum* proteins (23)) and the presence of a His-rich region. As for LarE, 0.8 mol of Ni per mol were found when the protein was expressed in the presence of Ni and LarBC. The amount of Ni decreased to 0.08 mol per mol when no Ni(II) was present in the culture medium during LarE expression, and went further down to undetectable levels when Ni(II) was present but LarBC were not co-expressed. Altogether, these results are consistent with a model of lactate racemase activation in which Ni is transferred from LarC to LarE, and then to LarA.

Enzymatic properties of LarA. The kinetic parameters of lactate racemase were determined for purified LarA (Table 1). LarA displayed a catalytic efficiency around $10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, which is 10-fold lower than the mandelate racemase (42) (Table 1 and Table S3). The optimal temperature of LarA is 40°C and the optimal pH is pH 5.8. (Fig. S5B and C). Since the intracellular pH of *L. plantarum* can be as low as 4.6 (43), this is not surprising.

Although the measured turnover number (k_{cat}) was higher in the direction from L- to D-lactate, the apparent affinity for D-lactate also was higher (lower K_m), resulting in a similar catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) in both directions (Table 1, Fig. S5A), consistent with the thermodynamics of a racemization reaction. Albeit in the millimolar range, the K_m values determined for LarA are still significantly lower than the cytoplasmic lactate concentration in *L. plantarum* (>200 mM; (24)), and in the range of previously determined values for the lactate racemase of *L. sakei* (9). Given

the partial Ni loading of purified LarA, its rate constants are most probably under-estimated by at least 5-fold.

Table 1. Kinetic parameters of LarA from *L. plantarum* (LarA_{Lp}).

Kinetic parameters					
L → D-Lac			D → L-Lac		
k_{cat} (s ⁻¹)	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (s ⁻¹ .mM ⁻¹)
3750 ± 430	46 ± 20	87 ± 41	1060 ± 100	11 ± 4	96 ± 45

Competitive and non-competitive inhibitors				
K_{i} (μM)				K_{i}' (μM)
Oxaloacetate	Oxalate pH6	Oxalate pH5	Sulfite*	Sulfite*
18.5 ± 7.3	7.2 ± 1.3	2.7 ± 0.8	1.1 ± 0.3	8.3 ± 3.4

Data are average of triplicates ± 95% confidence interval (Student's *t* test). Curves and equations used to calculate these parameters are described in *Materials and Methods*.

* Sulfite behaves as a mixed inhibitor (Fig. S6).

Table S3. Kinetic parameters of LarA from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (LarA_{Tt}).

Kinetic parameters						
Protein	L → D-Lac			D → L-Lac		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (s ⁻¹ .mM ⁻¹)
LarA _{Tt}	790 ± 60	8 ± 3	96 ± 45	441 ± 35	3 ± 2	145 ± 69

Data are average of triplicates ± 95% confidence interval (Student's *t* test). Curves and equations used to calculate these parameters are described in *Materials and Methods*.

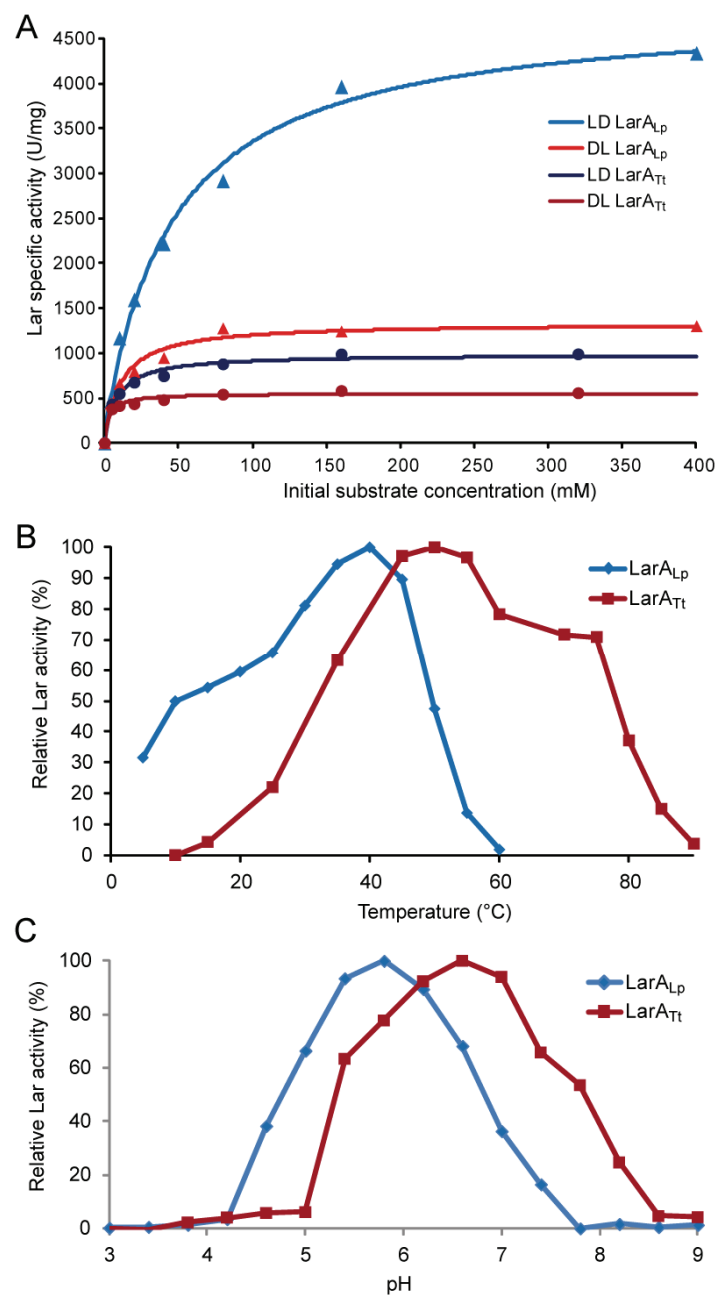


Fig. S5. LarA_{Lp} and LarA_{Tt} kinetic parameters.

A. Michaelis-Menten curves of the lactate racemase activity of LarA_{Lp} and LarA_{Tt} in both directions, from D- to L-lactate (DL) and from L- to D-lactate (LD). Symbols and lines represent experimental results and fitted curves, respectively. **B.** Temperature profiles of LarA_{Lp} and LarA_{Tt}. **C.** pH profiles of LarA_{Lp} and LarA_{Tt}. The Lar activity at the pH or temperature optimum has been set to 100% relative Lar activity. Symbols represent the average of 4 experimental measurements.

A series of potential activators or inhibitors have been tested on LarA_{Lp} (Table S4). Maleate acid and L-ascorbate (vitamine C) were the only compounds which showed a slight beneficial effect on the Lar activity. Some compounds showed neither beneficial nor detrimental effect on the Lar activity: EDTA, NADH and ethylene glycol. Some compounds showed a negligible detrimental effect on the Lar activity ($IC_{50} > 10\text{mM}$): dithiothreitol, β -mercaptoethanol and acrylate. Some compounds showed a slight detrimental effect on the Lar activity ($10\text{ mM} > IC_{50} > 1\text{ mM}$): methacrylate, pyruvate, malate and hydroxylamine. Other showed a marked detrimental effect on the Lar activity ($IC_{50} \approx 0.5\text{ mM}$): oxamate, dihydroxyfumarate and oxaloacetate. Finally, oxalate and sulfite were the compounds showing the strongest detrimental effect on the Lar activity ($IC_{50} < 0.005\text{ mM}$) (Table S4). The 3 compounds showing the strongest detrimental effect on the Lar activity: oxaloacetate, oxalate and sulfite, were analysed in more details (Fig. S6).

Oxalate and sulfite stabilized the activity of purified LarA during incubation at room temperature (Fig. S7), demonstrating the reversible nature of their inhibition. Sulfite behaved as a mixed inhibitor with a K_i (competitive) of $1.1\text{ }\mu\text{M}$ and a K_i (non-competitive) of $8.3\text{ }\mu\text{M}$ (Table 1 and Fig. S6). Oxalate behaved as competitive inhibitors with a K_i value of $7.2\text{ }\mu\text{M}$. At lower pH (pH 5) where LarA still presents 70% of its maximal activity (Fig. S5C), the K_i of oxalate was 3-fold lower than at pH 6, suggesting that the hydrogenooxalate anion is a better inhibitor than the oxalate dianion (Table 1, Fig. S6). This observation suggests a transition state featuring an hydroxyl group on an α -carbon with a sp^2 character.

Table S4. Compounds inactivating or activating LarA_{Lp} activity

Compound	concentration (mM)	Relative Lar activity (%)	IC50
		100 $\pm$ 7.3	
L-Ascorbate	1 mM	106 $\pm$ 3.9	
	10 mM	125 $\pm$ 28	
Maleate	10 mM	117.3 $\pm$ 5.8	
EDTA	10 mM	108 $\pm$ 14	
NADH	1 mM	96.9 $\pm$ 7.3	
Ethylene Glycol	10 mM	98.5 $\pm$ 2.1	

Compound	concentration (mM)	Relative Lar activity (%)	IC50
β-Mercaptoethanol	10 mM	81.7 ± 8.6	> 10 mM
Acrylate	10 mM	85 ± 13	> 10 mM
Methacrylate	1 mM	90.2	≈ 10 mM
	10 mM	52.9	
Pyruvate	1 mM	63 ± 15	≈ 5 mM
	10 mM	35.3 ± 7.3	
Malate	1 mM	88.6	≈ 5 mM
	10 mM	17.8	
Hydroxylamine	0.2 mM	73.4 ± 6.6	≈ 1 mM
	1 mM	51 ± 19	
	5 mM	12.1 ± 1.8	
Oxamate	0.1 mM	77.5 ± 9.6	≈ 0.5 mM
	1 mM	36 ± 13	
	10 mM	4.8 ± 2.1	
Dihydroxyfumarate	0.1 mM	78.2	≈ 0.5 mM
	1 mM	11.9	
Oxaloacetate	0.1 mM	76 ± 10	≈ 0.5 mM
	1 mM	11.2 ± 6.0	
	10 mM	3.0 ± 0.5	
Oxalate	0.001 mM	86 ± 42	≈ 0.01 mM
	0.01 mM	59.2 ± 26	
	0.1 mM	9.4 ± 6	
	1 mM	3.3 ± 3.4	
Sulfite	0.001 mM	50.9	≈ 0.001 mM
	0.01 mM	18.7	
	0.1 mM	4.7	

[§]The error bars represent the 95% confidence interval (Student's *t* test). The Lar activity with no added compound has been set to 100% relative Lar activity.

^{*}The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) has been estimated, based on the relative Lar activity results.

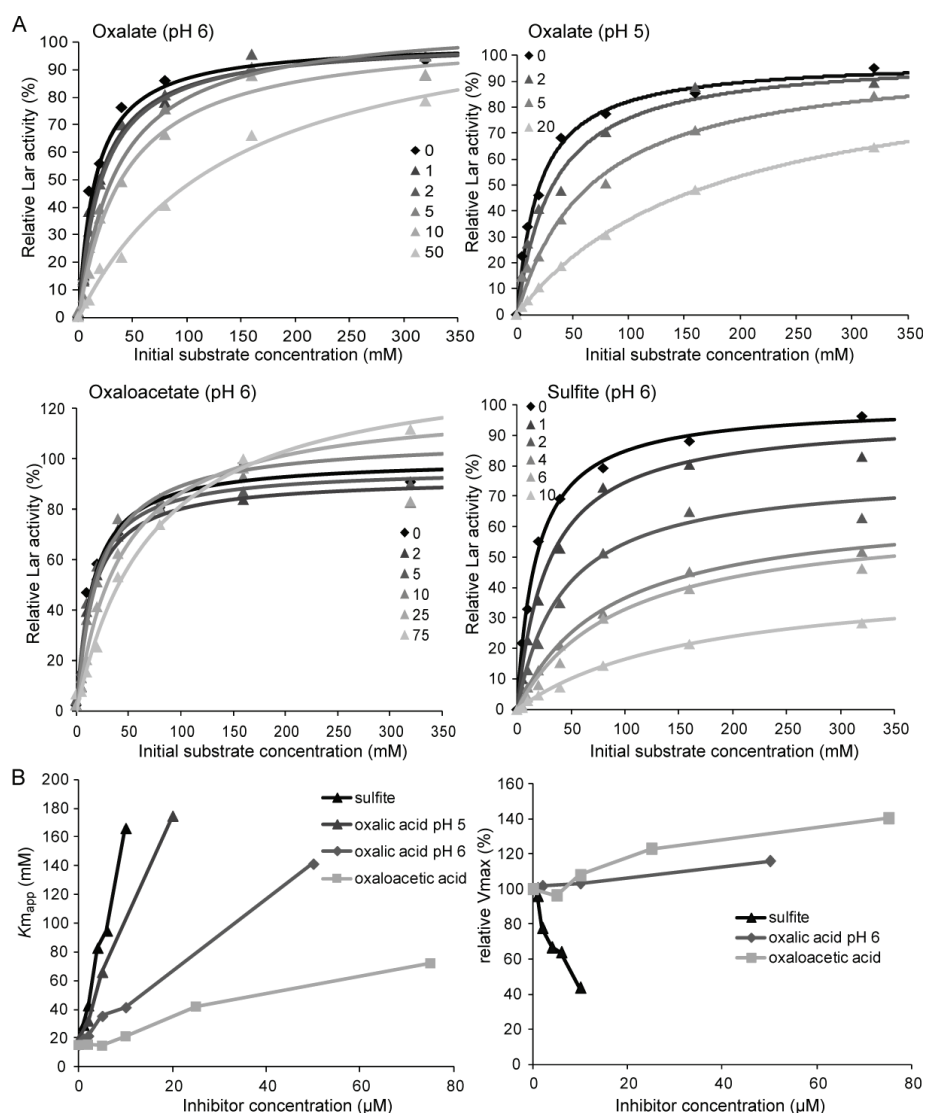


Fig. S6. LarALp inhibition.

A. Michaelis-Menten curves of LarALp inhibition by oxalate at pH 6 and pH 5, oxaloacetate and sulfite at pH 6. Symbols represent the average of 3 experimental measurements; lines represent fitted curves as calculated by non-linear least squares regression using the equation $V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$. Inhibitor concentrations are in μM . The V_{max} of the condition without inhibitor has been set to 100% relative Lar activity.

B. The relation between the apparent K_m and inhibitor concentration shows the competitive behavior of the inhibitors. The relation between relative V_{max} and inhibitor concentration shows the non-competitive behavior of sulfite inhibition.

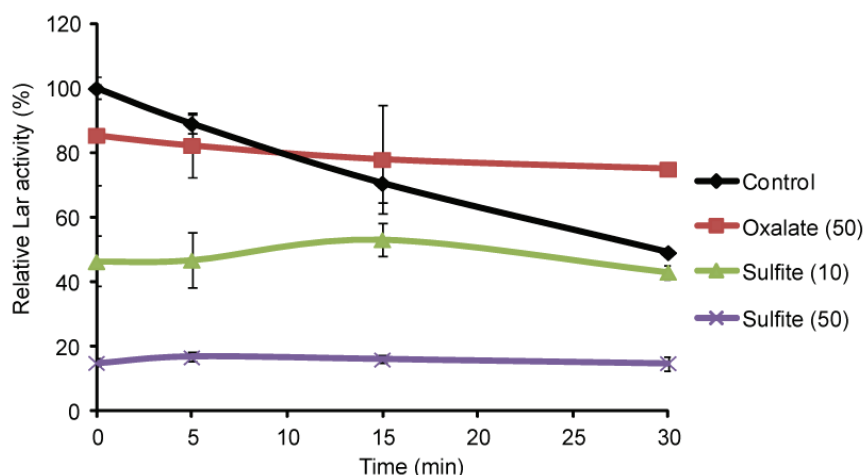


Fig. S7. Time-dependency of oxalate and sulphite inhibition

Time course of Lar_{A_{Lp}} inactivation in MES buffer at pH 6.0 with 1 mM L-ascorbic acid (Control), supplemented with 50 μ M of oxalic acid (oxalate (50)), 10 μ M or 50 μ M of sulfite (sulfite (10) or (50)). Sample was diluted 5-fold before Lar activity was measured. The control Lar activity at 0 min has been set to 100% relative Lar activity. The error bars represent the 95% confidence interval (Student's *t* test).

Structure of LarA. In order to get insight into the catalytic mechanism of the lactate racemase, the crystal structure of LarA was determined. For crystallographic needs, we used a LarA homolog from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, a thermophilic clostridium. *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 genome contains two *larA* paralogues and all three genes encoding the Lar maturases. The closest LarA paralogue from *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 (LarA_{Tt}) shares 53% identity and 72% similarity with LarA of *L. plantarum* (LarA_{Lp}). A *Lc. lactis* strains with the artificial operon *larA_{Tt}BCDE_{Lp}*, expressing LarA_{Tt} with LarBCE from *L. plantarum* showed Lar activity (Fig. S1A), demonstrating not only that LarA_{Tt} is a maturase-activated lactate racemase, but also that the maturation can be fulfilled by heterologous accessory proteins. Purification of tagged LarA_{Tt} could readily be achieved from the strain expressing the entire operon (Fig. S1B). Purification of LarA_{Tt} from a strain expressing the LarBCE from *L. plantarum* showed Lar activity, while purification of LarA_{Tt} from a strain lacking *larBCE* showed no detectable activity (Fig. S1C), as observed for LarA_{Lp}. ApoLarA_{Tt} could be readily activated by adding purified LarE, but only if LarE was co-expressed with LarB and LarC and in the presence of Ni(II) (Fig. S1C), as was observed previously for apoLarA_{Lp}. Purification of LarA_{Tt} from a strain expressing the LarBCE from *L. plantarum* contained Ni, while purification of LarA_{Tt} from

a strain lacking *larBCE* contained no Ni (Fig. S1D). The optimal temperature of LarA_{Tt} is 50 C and the optimal pH is pH 6.6. (Fig. S5B and C). Since the specific Lar activity of apoLarA_{Tt}, when activated by LarE^{NiBC}, was higher than the specific Lar activity of apoLarA_{Lp} (Fig. 1E and Fig. S1C), apoLarA_{Tt} was used as substrate for the subsequent *in vitro* activation experiments. LarA_{Tt} was also used for the crystallographic study since no LarA_{Lp} crystals could be obtained.

LarA crystals were obtained after 2 months of crystallization (Fig. S8A). The structure was solved by multi-wavelength anomalous dispersion and the structure was refined to 1.8   (Table S5). Unfortunately – but not unexpectedly given the spontaneous Ni leakage from the enzyme (Fig S3A) –, no Ni was present in the crystals. LarA crystallized as a dimer with both monomers showing nearly identical structures (Fig. 2A, Fig. S8B-C). LarA contains 18  -strands and 16  -helices arranged in an original fold composed of two domains of similar size, connected by two hinges (Fig. 2A). Both domains are made of 3 layers of secondary structures:  + / / +  (10  -strands and 6  -helices) and  + / /  (8  -strands and 10  -helices) for domains A and B, respectively (Fig. 2A). The first hinge (aa 30 to 36) is too disordered to be observed in the crystal structure. The second hinge (aa 270 to 271) is located between  11 and  12.

Comparison between 10 LarA homologues from remote species indicates that 16 residues (3 His, 9 Gly, 2 Lys, 1 Asp, and 1 Arg) are fully conserved. These residues are located at the interface between the two domains, most of them belonging to domain B (Fig. 2B and Fig. S9). In the LarA crystal, a molecule of ethylene glycol was found in the inter-domain space of one monomer, its two hydroxyl groups establishing hydrogen bonds with two conserved residues (K184 and H200, Fig. S8C). Although it is not possible to distinguish between hydrogen bond donors and acceptors, the O-C-C-O atom connectivity of ethylene glycol is also found in lactate, suggesting that the molecule occupies the substrate binding site. Altogether, these observations suggest that the interface between the two domains constitutes the catalytic site.

Although the crystals were obtained in the absence of substrate (lactate) or inhibitor, sulfate and ethylene glycol were present during crystallization, and appear to form hydrogen bonds with conserved, presumably catalytic residues. The first monomer contains one sulfate and one ethylene glycol, ethylene glycol being replaced with a second sulfate in the second monomer.

The ethylene glycol molecule in the first monomer and the non-cognate sulfate in the second monomer form hydrogen bonds with conserved residues of the enzyme: K184 and H200 in the first case, and R75, H108, and K298 in the second case (Fig. S8C).

Since ethylene glycol is not an inhibitors of the lactate racemase (Table S4), its presence is probably not physiologically relevant. Despite this, its positioning in the catalytic site may be indicative of the binding of lactate. Indeed, the two hydroxyl group from ethylene glycol may mimic the hydroxyl group and the carboxylate group of lactate. One can also assume that sulfate, which is negatively charged, may mimic the carboxylate group of lactate in the presumed catalytic site.

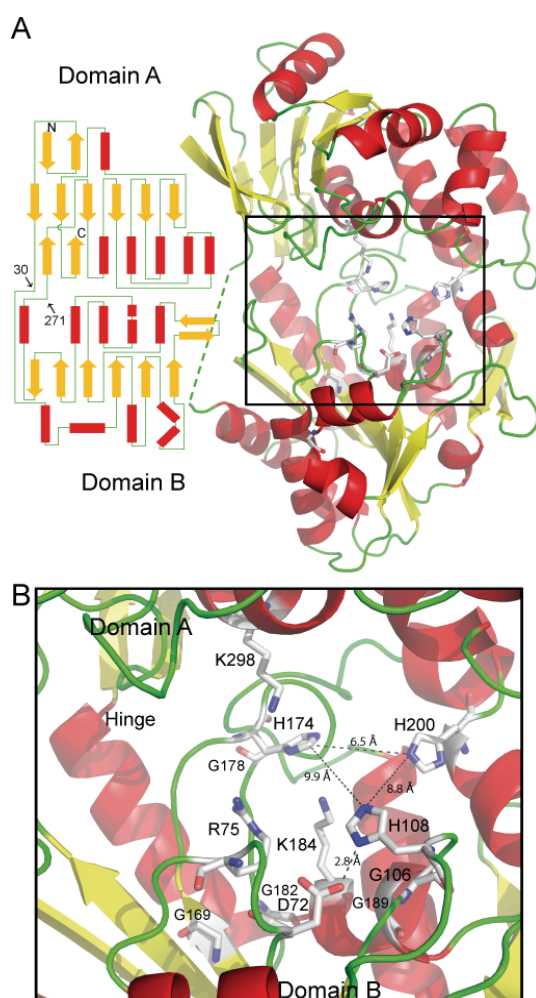


Fig. 2 3D structure of LarA.
A. 3D structure of a monomer of LarA. α -Helices, β -sheets and loops are in red, yellow, and green, respectively. Conserved residues are shown in stick representation with C in white, N in blue, O in red, S in yellow. The disordered region (aa 30 to 36) connecting domains A and B is shown as a dotted line. The presumed location of the catalytic site is boxed. Inset: topology of the lactate racemase fold.
B. Enlargement of the proposed catalytic site containing conserved residues from the first monomer.

Table S5. Data collection and refinement statistics of LarA_{TL}.

	Native	Hg peak	Hg infl	Hg rem
Wavelength (Å)	0.979711	1.009365	1.010126	1.007259
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
Unit-cell a(Å)	78.41	78.26	78.34	78.39
b(Å)	223.25	229.33	229.67	229.92
c(Å)	46.14	46.6	46.65	46.69
Resolution range (Å)				
Overall (ov)	45.2-1.8	46.2-2.0	46.3-2.0	46.4-2.0
Highest shell (hs)	2.0-1.8	2.1-2.0	2.1-2.0	2.1-2.0
Number of reflections				
Total	338708	374681	370622	369713
Unique	73824	106683	105491	106288
Friedel pairs	merged	not merged	not merged	not merged
Completeness (%) (ov/hs)	96.7/90.8	95.2/81.5	96.4/89.4	95.0/83.7
Rmerge (ov/hs)	0.059/0.331	0.077/0.285	0.074/0.298	0.077/0.436
<I/σ(I)> (ov/hs)	16.1/4.3	11.2/3.8	11.4/3.8	10.6/2.7
Refinement				
	R-factor (ov/hs)	0.182/0.225		
	Rfree (ov/hs)	0.229/0.283		
RMS deviation from ideality				
	Bonds (Å)	0.02		
	Angles (°)	1.73		
Number of water molecules	588			
Mean B values (Å ²)				
	Protein chain A	20.7		
	Protein chain B	25.9		
	Water	32		

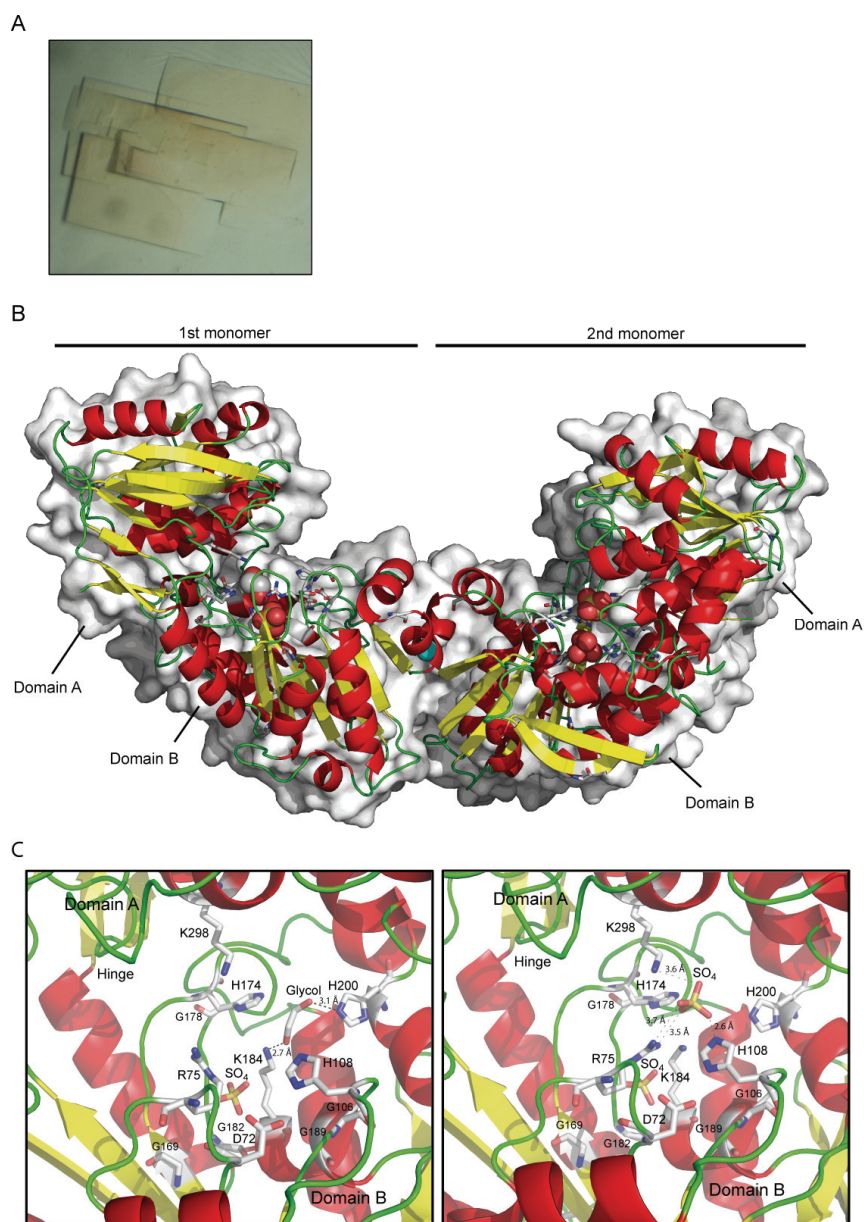


Fig. S8. LarA_{Ti} structure.

A. Crystals of LarA_{Ti} obtained after 2 months of crystallization. **B.** 3D dimeric structure of LarA_{Ti}. α -helices are in red, β -sheets in yellow, and loops in green. Conserved residues are shown in stick representation and ethylene glycol, sulfate and Mg(II) are in sphere representation with C in white, N in blue, O in red, Mg in cyan and S in yellow. Surface representation is shown at the background. The black frame represents the region which is zoomed on in panel C. **C.** the catalytic site of the first (left) and the second (right) monomer, with the sulfates and the ethylene glycol. Color code as in panel B.



Fig. S9. Alignement of LarA homologues (previous page).

The sequences used were the following: YP_003852255.1, hypothetical protein Tthe_1662 (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571)(LarA_{Tt}); YP_004888174.1, lactate racemization operon protein LarA (*Lactobacillus plantarum* WCFS1)(LarA_{Lp}); NP_763929.1, hypothetical protein SE0374 (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228); YP_002460858.1, hypothetical protein Dhaf_4417 (*Desulfitobacterium hafniense* DCB-2); YP_003541891.1, hypothetical protein Mmah_0722 (*Methanohalophilus mahii* DSM 5219); YP_003994025.1, hypothetical protein Hals_0182 (*Halanaerobium hydrogeniformans*); YP_004765152.1, hypothetical protein MELS_0101 (*Megasphaera elsdenii* DSM 20460); YP_003304333.1, hypothetical protein Sdel_1277 (*Sulfurospirillum deleyianum* DSM 6946); YP_004195403.1, hypothetical protein Despr_1964 (*Desulfobulbus propionicus* DSM 2032); YP_001276389.1, hypothetical protein RoseRS_2056 (*Roseiflexus* sp. RS-1). The secondary structure of LarA_{Tt} is shown above the alignment (α -helices and β -sheets in red and yellow, respectively). The region invisible in the structure of LarA_{Tt} is shown with a dotted line. The beginning and the end of the two domains of LarA_{Tt} are represented with arrows. Black background, fully conserved residues. Dark grey background, one of the following 'strong' groups is fully conserved at this position: STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW. Light grey background, one of the following 'weaker' groups is fully conserved at this position: CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, FVLIM, HFY. These are all the positively scoring groups that occur in the Gonnet Pam250 matrix. The strong and weak groups are defined as strong score > 0.5 and weak score $\leq$ 0.5 respectively.

XANES and EXAFS. Structural insights into Ni coordination were obtained by XANES and EXAFS studies (*SI Results*). The two LarA homologues show similar pre-edge XANES features which consist of a 1s→3d transition at 8332.5 eV and a 1s→4p transition at 8337.2 eV. These are consistent with either a four coordinate square planar nickel center or a five coordinate square pyramidal site (44). However the well defined shape of the 1s→3d transition would favor a five coordinate geometry over the four coordinate one, as five coordinate nickel centers tend to have more intense 1s→3d transitions than four coordinate nickel centers (Fig. S10A).

The Fourier transformed spectra (FT) of LarA_{Tt} (Fig. S10B and C) is dominated by an intense feature at 1.7   with a smaller peak at 1.2   suggesting the presence of a split first scattering shell. The goodness of fit (R_{factor}) from single scattering fits (Table S6) improves significantly with splitting of the first scattering shell and addition of contributions from sulfur scattering atoms. These preliminary fits point to a five coordinated nickel center dominated by N/O scatterers complemented by a single S/Cl scatterer. Due to the similarity in their size and phase nitrogen/oxygen and sulfur/chloride scattering atoms cannot be differentiated by EXAFS. Furthermore, fits with multiple sulfur contributions result in shortened Ni-N bonds (~1.82  ) and Ni-S bonds (~2.17  ). The Fourier transformed spectra also shows density between 2.5   to 4.0   of r-space, consistent with multiple scattering ligands, generally attributed to the presence of histidines in biological samples. Although the EXAFS data forms a complicated fitting picture, generally fits consisting of multiple (2 to 3) histidines (H) are favored and needed to account for the density. Physically meaningful fits were only achieved when the histidine scattering shells were split. The fits converged on three models, two five coordinate fits N1H2H1S1 and 2H1H1S1 and a six coordinate N2H2H1S1 fit, which were statistically similar (Table S6 and Dataset S2 on CD-ROM), but the XANES analysis supports the five coordinate fit. The fits can be further refined, by replacing the N/O scattering atoms with a glycerol (G) molecule, present in the buffer, binding in a bi-dentate fashion (Table S6).

Table S6. EXAFS-determined nickel-ligand bond distances for LarA_{Tt}.

N	R	R (Å)	σ^2 (x10 ³ Å ²)	%R	χ^2_v
N1H2H1S1					
2	N _{His}	2.03(2)	1.2(9)	10.96	11.9
1	N _{His}	1.85(2)	1.2(9)		
1	N/O	2.03(2)	1.2(9)		
1	S	2.23(2)	1.2(9)		
N2H1H1S1					
1	N _{His}	2.03(2)	1(1)	10.3	11.1
1	N _{His}	1.84(2)	1(1)		
2	N/O	2.03(2)	1(1)		
1	S	2.23(2)	1(1)		
N2H2H1S1					
2	N _{His}	2.06(2)	2.7(6)	10.82	11.7
1	N _{His}	1.86(2)	2.7(6)		
2	N/O	2.06(2)	2.7(6)		
1	S	2.22(3)	2.7(6)		
GH1H1S1					
1	N _{His}	2.04(2)	1.7(6)	9.36	10.1
1	N _{His}	1.87(3)	1.7(6)		
2	N/O	2.04(2)	1.7(6)		
1	S	2.22(2)	1.7(6)		
GH2H1S1					
2	N _{His}	2.06(2)	2.9(6)	8.72	9.45
1	N _{His}	1.87(3)	2.9(6)		
2	N/O	2.06(2)	2.9(6)		
1	S	2.21(2)	2.9(6)		

The angle of rotation α for the histidines is 0°.

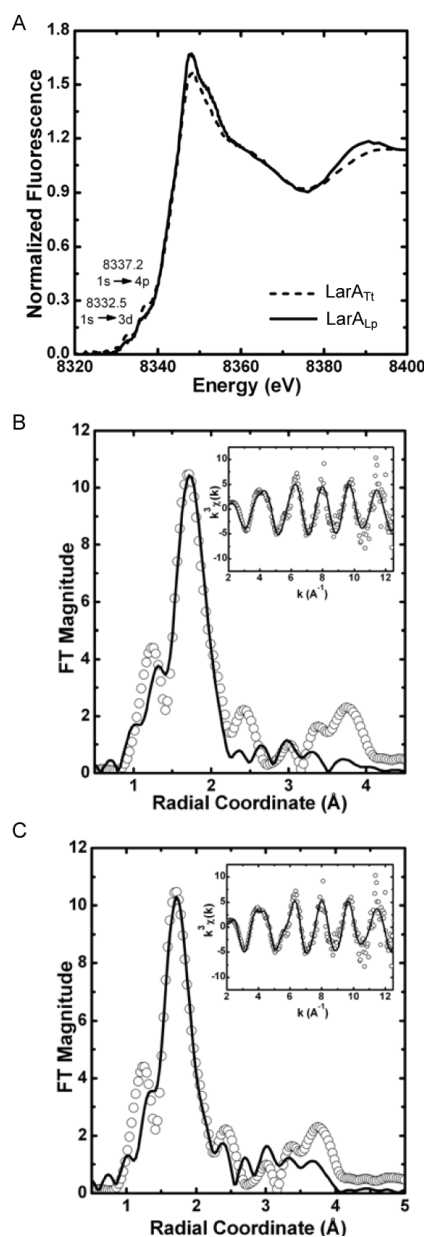


Fig. S10. XANES and EXAFS spectra.

A. Ni K-edge XANES spectra of LarA_{Tl} and LarA_{Lp} showing a four square planar or five square pyramidal coordination geometry for nickel binding; 10 mM Tris buffer, pH 7.5, 20% glycerol. **B.** Ni K-edge EXAFS spectra of LarA_{Tl} and fit for N2H1H1S1. Fourier transformed EXAFS spectra (no phase correction, FT window = 2-12.5 Å⁻¹). Inset: k^3 -weighted unfiltered EXAFS spectra; data (circles), best fit (line). **C.** Ni K-edge EXAFS spectra of LarA_{Tl} and fit for GH2H1S1. Fourier transformed EXAFS spectra (no phase correction, FT window = 2-12.5 Å⁻¹). Inset: k^3 -weighted unfiltered EXAFS spectra; data (circles), best fit (line).

Comparisons of LarA fold with other structures. When comparing the overall structure with all known folds using the VAST algorithm (25), no significant similarity with any known structure could be identified (Dataset S3 on CD-ROM). Nevertheless, each individual domain of LarA showed some similarities with known structures. Domain A was found to be similar to the small domain of trimethylamine dehydrogenase (TMD), whose function is unknown (26), although domain A of LarA contains three additional β -strands and four additional α -helices, compared to TMD (Fig. S11A). Similarly, the fold of domain B globally resembles that of *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent methyltransferases (27), but contains two additional β -strands and three additional α -helices (Fig. S11B). Moreover, the SAM binding site is neither conserved in the LarA primary sequence (Fig. S9) nor in its 3D structure (Fig. S11B). The additional secondary structures are not mere insertions; the topologies of the domains are also different. An additional β -strand extends the core β -sheet of domain A, compared to the small domain of TMD, and the sixth β -strand of domain B corresponds to the seventh β -strand of the core β -sheet of SAM-dependent methyltransferases (Fig. S11C). Taken together, these data indicate that the overall lactate racemase fold is a novel multidomain fold of the α/β class.

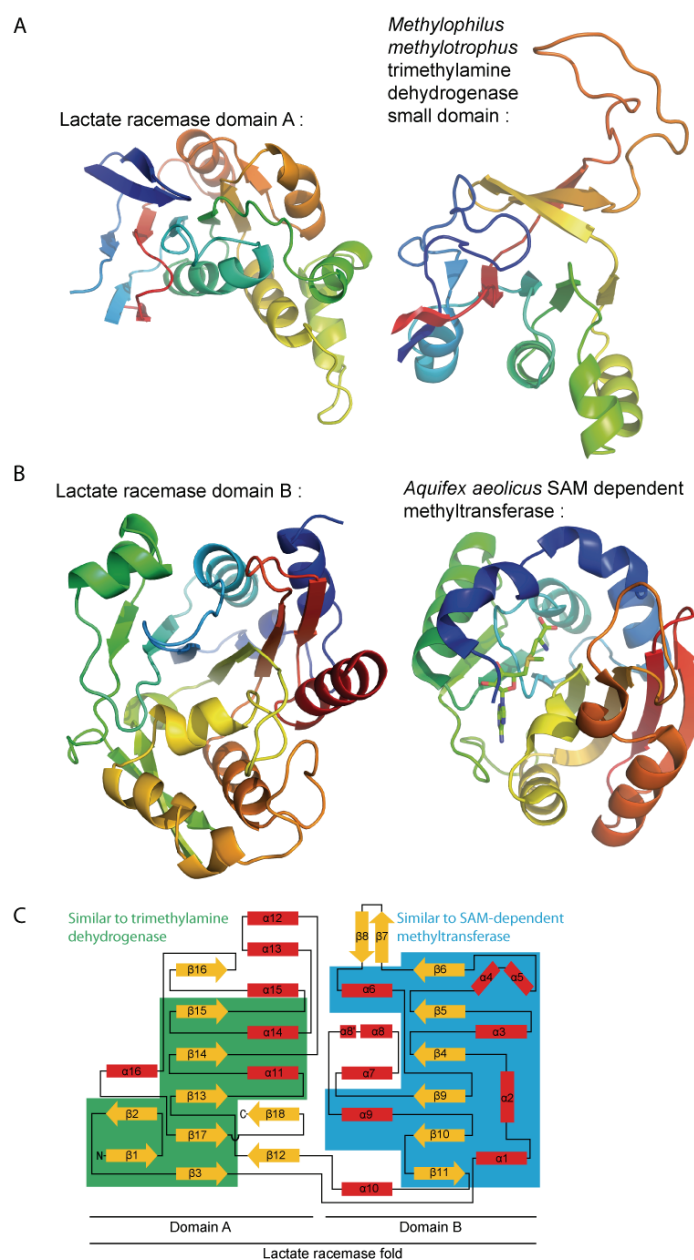


Fig. S11. Comparisons of the lactate racemase 3D structure with other structures.

A. comparison of LarA domain A with the small domain of trimethylamine dehydrogenase (PDB code: 1DJN). **B.** comparison of LarA domain B with a SAM-dependent methyltransferase (PDB code: 3DH0). The SAM molecule is drawn in stick representation with C in green, N in blue, O in red and S in yellow. The N-termini are in blue and the C-termini in red. **C.** Overlap of similar structures with LarA structure. α -helices are in red, β -sheets in yellow and loops in black.

LarA and its maturases are widespread among bacteria and archaea.

Blastp searches were performed against all complete microbial genomes of the NCBI database (1,087 bacterial and archaeal genomes) using the different Lar proteins of *L. plantarum* WCFS1 as query sequences. This search revealed the presence of at least one homologue of *larA*, *larB*, *larC*, *larD*, and *larE*, in 111, 260, 263, 9, and 259 species, respectively (Fig. 3A). The *larA* gene appears to be present in most bacterial classes and in archaea. The largest number of *larA* homologues were found in clostridia (26 out of 78 species) and in δ - proteobacteria (19 out of 39 species), some species bearing up to 4 *larA* paralogues (Table S7 and Dataset S4 on CD-ROM). This suggests that lactate racemization may not only be useful to lactic acid producers such as lactic acid bacteria, but also to a wide variety of species with different metabolisms, including acetogenic, sulfate reducing, metal reducing, fumarate reducing and butyrate producing bacteria (Dataset S4 on CD-ROM). These bacterial taxons are indeed documented to utilize lactate as a carbon and/or electron source (28-31).

Ninety-two percent of the genomes bearing a *larA* homologue (102 out of 111 genomes), also contained the genes for the Lar maturases (*larBCE*), further reinforcing the necessity of these proteins for LarA activation (Fig. 3A). Strikingly, the maturase-encoding genes were also found in 153 species with no *larA* homologues (Fig. 3A). To get a better insight into the relationship between these genes, their clustering within each genome was examined (Fig. 3B). The presence of a complete cluster including *larABCDE* seems to be restricted to only 6 species, all of them belonging to the lactobacillaceae family (Dataset S4 on CD-ROM). Twelve species harbor a *larABCE* cluster, but the most recurrent cluster only includes *larBCE*, which appears in 69 species, among which only 23 species also possess a *larA* homologue (Fig. 3B). Such putative operonic structures suggest that these genes likely participate in a common function.

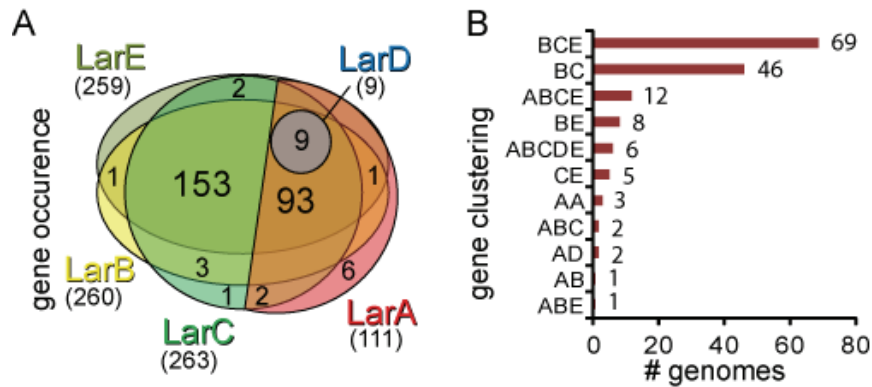


Fig. 3 *In silico* analysis of *lar* genes.

A. Distribution of the *lar* genes in 1087 sequenced bacterial and archaeal genomes. The Venn diagram illustrates the occurrence and overlap of predicted *larA* (red), *larB* (yellow), *larC* (green), *larD* (blue) and *larE* genes (olive green). **B.** Gene clustering of predicted *larA* (A), *larB* (B), *larC* (C), *larD* (D) and *larE* (E) genes in 1087 bacterial and archaeal genomes. The numbers indicate the total number of clusters of each type.

Table S7. Number of *larA-E* genes by class/sub-class

Class or subclass	Species	LarA	LarB	LarC	LarD	LarE
Crenarchaeota	27	0	1	1	0	1
Euryarchaeota	68	12	51	51	0	50
Actinobacteria	119	11	20	19	0	19
Bacteroidetes/Chlorobi	63	0	0	0	0	0
Cyanobacteria	28	1	27	27	0	27
Chlamydiae	10	0	0	0	0	0
Bacilli	50	3	9	9	0	8
Clostridia	78	26	59	60	3	60
Lactobacilli	51	6	7	7	6	7
other firmicutes	6	4	5	5	0	5
Mollicutes	29	0	0	0	0	0
α -Proteobacteria	122	1	3	3	0	3
β -Proteobacteria	79	0	0	0	0	0
δ -Proteobacteria	39	19	37	37	0	37
ϵ -Proteobacteria	22	4	4	4	0	4
γ -Proteobacteria	177	0	0	0	0	0
Spirochaetes	30	4	4	6	0	4
other bacteria	89	20	33	34	0	34
TOTAL	1087	111	260	263	9	259

Discussion

This report is the first molecular characterization of the lactate racemase, a novel chaperone-activated Ni-dependent enzyme. This enzyme exhibits several original features in terms of cofactor requirement, structure, and activation mechanism.

The requirement for Ni is a novelty amongst racemases. The extreme plasticity in Ni coordination and/or redox chemistry (32) may explain its use for the catalysis of lactate racemization. In the 1970s, pioneering enzymological studies on partially purified lactate racemase demonstrated a hydride transfer mechanism and the presence of an α -carbonyl intermediate (19, 33). The presence of Ni hydride intermediates in the catalytic site of several Ni-dependent oxygen-sensitive enzymes (34-36) is coherent with a role of hydride acceptor for Ni. A hypothetical catalytic mechanism for lactate racemase, involving hydride transfer on Ni, is shown in Fig. 4B. A catalytic base would act on the hydroxyl group of lactate for facilitating hydride abstraction. The best candidates for such a role are K184 and H200, given their implication in ethylene glycol binding (Fig. S8C).

EXAFS analysis suggests that histidines are involved in Ni coordination, but the distances between the conserved histidine residues, as observed in the crystal structure, exclude Ni binding (Fig. 2B). However, LarA might exist as an open and a closed conformation, depending on the presence of the substrate and cofactor(s). In the closed conformation, the loops could bring the conserved histidines closer together. Accordingly, His174 and His 108 belong to loops with conserved Gly residues, possibly allowing structural flexibility (Fig. 2B).

The overall fold of LarA is novel, what supports the fact that the putative LarA catalytic site shows no similarity to that of any previously characterized Ni-dependent enzyme. This originality is further emphasized by the activation mechanism of LarA, which occurs in at least two steps: activation of LarE by LarB and LarC followed by activation of LarA by activated LarE (Fig. 4A). The 150 fold excess of LarE which was necessary to fully activate active LarA apoprotein suggests that only a small fraction of LarE protein was ready for the activation, despite the high Ni content of

LarE. This means that additional maturation steps may be required, beside Ni loading of LarE.

The primary sequence of LarE shows similarities with ATP- and GTP-utilizing enzymes of the PP-loop superfamily (10). Since neither ATP nor GTP have a positive effect on LarA activation by activated LarE *in vitro* (Table S2), NTP hydrolysis by LarE is likely required for the activation of LarE itself, rather than for the activation of LarA. The high Ni content of purified LarC, together with the over-representation of His residues in its sequence, is consistent with a role as a Ni carrier, which would transfer Ni to LarE. Although LarB is absolutely required for LarE activation, its exact role and positioning in the activation cascade remains unknown. In other maturase-dependent Ni enzymes, the activation mechanism involves the intervention of several accessory proteins on the apoprotein (37), but the overall activation mechanism proposed for lactate racemase (Fig. 4A) requires the interaction of only one maturase with the apoprotein. This is reminiscent of the activation mechanism described for [FeFe]-hydrogenases, which also involves one maturation protein (HydF), able to activate the apoprotein when purified in presence of the other two maturation proteins (38). The occurrence of the genes encoding the LarBCE maturation machinery in many bacterial and archaeal genomes devoid of a *larA* counterpart, also suggests that this machinery might have been recruited for the activation of other Ni-dependent enzymes or for the synthesis of a Ni-containing compound.

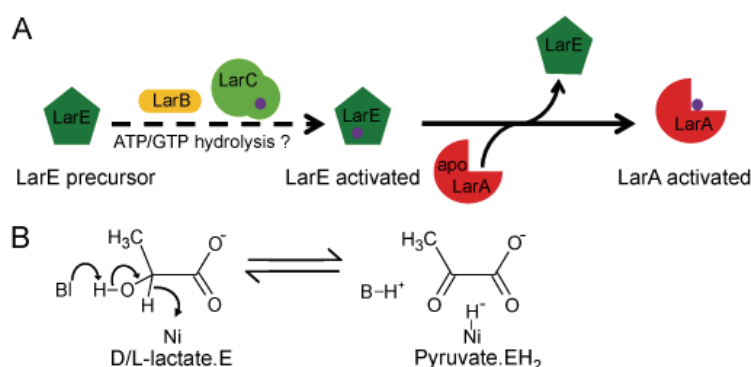


Fig. 4 apoLarA activation and catalytical mechanism.

A. Proposed activation cascade of apoLarA. First step(s): apoLarE is activated by LarB and Ni-loaded-LarC. ATP or GTP hydrolysis by LarE might be involved. Last step: apoLarA activation by activated LarE. The purple ball represents Ni. **B.** Hypothetical lactate racemization mechanism involving hydride transfer. B is a catalytic base from the enzyme.

Finally, racemization may not only be useful to lactic acid producers such as lactic acid bacteria but also to a wide variety of species with different metabolisms, reinforcing the physiological importance of lactate racemization.

Material and methods

Materials and reagents. MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) broth was purchased from Becton, Dickinson and Company, NJ USA. M17 broth was purchased from Merck, Germany. Nisin A, Chloramphenicol, erythromycin, Proteinase K, glucose oxidase, catalase, D-glucose, MES, MOPS, Tris, HCl, NaOH, L-lactate sodium salt, D-lactate sodium salt, oxalic acid, oxaloacetic acid, pyruvate sodium salt, maleic acid, malic acid, acrylic acid, dihydroxyfumaric acid, methacrylic acid, oxamic acid, citric acid, hydroxylamine, sulfite, dithiothreitol, EDTA, ethylene glycol, β -mercaptoethanol, triton X-100, L-ascorbic acid, NiCl₂, CoCl₂, MgCl₂, ATP, GTP, NAD, NADH, Coenzyme A, S-adenosyl methionine, thiamine diphosphate and Coomassie Brilliant Blue R were purchased from Sigma-Aldrich, Belgium. PCR amplifications were performed with the Phusion high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). The primers used in this study were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). The restriction enzyme used in this study were purchased from New England Biolabs (France). Bradford protein assay solution and 40% Acrylamide:Bis-acrylamide 19:1 solution were purchased from Bio-Rad, Norway. The absorbance was read with a Varioskan Flash (ThermoScientific)

Bacterial media and growth conditions. All plasmid constructions were performed in *Escherichia coli* DH10B for pUC18Ery derivatives and in *Lc. lactis* NZ3900 for pNZ8048 derivatives. *L. plantarum* was grown in MRS broth at 28°C without shaking. *Lc. lactis* was grown in M17 broth supplemented with 0.5 % glucose at 28°C at 120 rpm. When appropriate, chloramphenicol and erythromycin were added to the media at 10 μ g/mL and NiCl₂ at 1 mM concentration. For induction of Lar activity in *L. plantarum*, L-lactate sodium salt was added at a concentration of 200 mM during the mid log phase (OD_{600} = 0.6-0.7) and the cells were collected 4 hours later. For the induction of genes under control of the *nisA* expression signals, Nisin A was added during the early log phase (OD_{600} = 0.2-0.3) at a concentration of 1 mg/L and the cells were collected 4 hours later.

DNA techniques and transformation. General molecular biology techniques were performed according to the instructions given by Sambrook et al (45). Electrotransformation of *E. coli*, *L. plantarum* and *Lc. Lactis* were performed as described by Dower et al. (46), Lambert et al. (47) and McCall and Fierke (48), respectively. The primers used in this study are listed in supplemental Table S8 (on CD-ROM).

Microarray-based identification of genes specifically regulated by L-lactate. *L. plantarum* TF101 (ΔdhL) (49) was grown in MRS medium at 28°C to an OD₆₀₀ of 0.75. The culture was then divided into three sub-cultures. Pure L-lactate (200 mM final concentration) was added to one of the sub-cultures. An equimolar mixture of D- and L-lactate (100 mM final concentration for each isomer) was added to a second sub-culture. The third subculture was not treated. The three sub-cultures were further incubated at 28°C for 1h30, before harvesting by centrifugation (5,000 x g, 10 minutes). Cell pellets were stored at -20°C until RNA extraction. RNA isolation, cDNA synthesis and labeling were performed as previously described (50). Hybridization was performed on custom designed *L. plantarum* WCFS1 11K Agilent oligo microarrays (GEO accession no. GPL4318), according to the conditions described by Goffin et al. (50). These microarrays contained an average of three probes per gene. The hybridization scheme contained the following cDNA comparisons: (a) untreated culture vs. L-lactate-treated culture and (b) untreated culture vs. DL-lactate-treated culture. Scanning, data extraction, background correction and normalization were performed as previously reported (50). The normalized transcriptome data have been deposited in the GEO database (accession no. GSE43518). First, significantly regulated probes were selected based on a fold change (Cy5/Cy3 intensities) higher than 4.0 or lower than 0.25. Genes for which more than 50% of the probes were not significantly regulated, were considered as not regulated. For the remaining genes, the fold change of gene expression was calculated as the average of the fold change between significantly regulated probes.

Construction of the $\Delta larOQ$ mutant. The *larQO* deletion vector pGIR001 was constructed in two steps. Initially, a 1.62-kb fragment located upstream of *larO* was amplified by PCR with primers LP096A1 and LP099B3, digested with XbaI and KpnI, and cloned into similarly digested pUC18Ery. Subsequently, a 1.22-kb fragment comprising a fragment of *larQ* and *lar(MN)* was amplified by PCR with primers LP0102A3 and LP0101B1,

digested with SpeI and XbaI, and inserted in the XbaI site of the plasmid obtained in the first step. The correct orientation of the insert was assessed by PCR with the primers LP096A1 and LP0101B1. This plasmid, pGIR001, harbors an in-frame fusion between the 5' end of *larO* and a middle fragment of *larQ*. Since cloning of a DNA fragment containing *larR* seemed to be toxic to *E. coli*, the complete deletion of the *lar(MN)QO* operon could not be achieved. The pGIR001 suicide vector was used to delete *larQO* through a two-steps homologous recombination process (47). Deletion was carried out in *L. plantarum* NCIMB8826 (wild type), generating strain LR0001. The $\Delta larQO$ genotype was confirmed by PCR with primers LP096UP-3 and LP0105B1, located upstream and downstream of the recombination regions, respectively.

Construction of *Lactococcus lactis* expression plasmids. Plasmid pGIR100 was constructed by cloning of a DNA fragment comprising the whole *larABCDE* operon from *L. plantarum* NCIMB8826, which was amplified by PCR with primers StrepBZ_A2 and StrepB_B2, digested with PciI and SacI, and then ligated in the pNZ8048 plasmid digested with NcoI and SacI. The resulting plasmid was transformed in *Lc.lactis*.

Plasmids bearing deleted versions of the *larA-E* operon for expression in *Lc.lactis* were all derived from pGIR100: pGIR200 ($\Delta larA$), pGIR300 ($\Delta larB$), pGIR500 ($\Delta larC$), pGIR600 ($\Delta larD$) and pGIR700 ($\Delta larE$). For each construction, pGIR100 was first methylated with Dam methylase and S-adenosyl methionine (New England Biolabs). PCR amplification was performed in order to obtain a fragment comprising the whole pGIR100 plasmid, deleted of the gene of interest, using primers LarZ-X_A and LarZ-X_B (X stands for the gene to be deleted), digested with ClaI and self-ligated, generating an in-frame deletion of the selected gene. The ligation mixture was digested with DpnI before transformation in *Lc.lactis* in order to digest the original pGIR100 plasmid used as template. The plasmid sequences were confirmed by sequencing with primers UP_PNZ8048' and 632SEQA4 to 632SEQA14.

Construction of plasmids for expression of StrepII-tagged Lar proteins in *Lactococcus lactis*. Plasmids for expression of selected StrepII-tagged Lar proteins together with expression of all other Lar proteins were all derived from pGIR100 (containing the entire *larA-E* operon): pGIR112 (LarA-Strep-tag), pGIR122 (LarB-Strep-tag), pGIR131 (Strep-tag-LarC) and pGIR172 (LarE-Strep-tag). A fragment comprising the whole pGIR100 plasmid was

amplified by PCR using primer pairs LarStrep_A/LarStrep_B for pGIR112, BT_A/BT_B for pGIR122, TC_A/TC_B for pGIR131, and LarE_TA/LarE_TB for pGIR172. In every case, one of the two primers contained the sequence encoding a StrepII tag either in the upstream or the downstream primer (Table S8 on CD-ROM). Amplified DNA fragments were digested with NheI and self-ligated, generating a 30-bp in-frame insertion of a fragment containing the StrepII-tag at the desired position (either 5' or 3' of the targeted gene). The sequence of the expression cassettes was verified by sequencing with primers UP_PNZ8048' and 632SEQA4 to 632SEQA14.

Plasmid pGIR012 (LarA-Strep-tag alone) was obtained by PCR amplification of pGIR112 with primers LarE_TA and LarStrep_B, NheI digestion, self-ligation, and transformation in *Lc.lactis*. Plasmid pGIR022 (LarB-Strep-tag alone) was obtained by PCR amplification of pGIR122 with primers LarB_A and LarBT_B, digestion with NcoI and HindIII, insertion in a similarly digested pNZ8048 by ligation, and transformation in *Lc.lactis*. Plasmid pGIR031 (Strep-tag-LarC alone) was obtained by PCR amplification of pGIR131 with primers PciITag_A and LarC_B, digestion with PciI and HindIII, insertion in a NcoI and HindIII digested pNZ8048 by ligation, and transformation in *Lc.lactis*. Plasmid pGIR072 (LarE-Strep-tag alone) was obtained by PCR amplification of pGIR172 with primers LarE_A and StrepP_B, NcoI digestion, self-ligation, and transformation in *Lc.lactis*. Plasmid pGIR182 (LarA_{Tt}-Strep-tag in the presence of *L. plantarum* chaperones) was obtained by cloning a fragment containing *larA_{Tt}* amplified by PCR from genomic DNA of *T. thermosaccharolyticum* with primers LarA_Th_A and LarA_Th_B and digested by NcoI and NheI. This fragment was ligated with a fragment of pGIR112 amplified by PCR with primers LarStrep_A and LarA_Th_C and digested by PciI and NheI. The ligation mixture was then restricted by BamHI to eliminate plasmid pGIR112 and transformed in *Lc. lactis*. Plasmid pGIR082 (LarA_{Tt}-Strep-tag alone) was obtained by PCR amplification of pGIR182 with primers LarA_Th_A and LarA_Th_B2, digestion with NcoI and KpnI, and insertion in a similarly digested pNZ8048 by ligation. In all cases, the sequence of the expression cassettes was verified by sequencing.

Construction of plasmids for the modification of LarC protein in *Lactococcus lactis*. The intermediate plasmid pGEM_larABCDE was constructed by subcloning of a DNA fragment comprising the whole

larABCDE operon from *L. plantarum* NCIMB8826, which was amplified by PCR with primers StrepBZ_A2 and StrepB_B2 and ligated into the pGEM®-T Easy (Promega) as described (51).

The intermediate plasmids pGEM_larABC1ΔC2DE and pGEM_larABC-fusedDE were derived from the intermediate plasmid pGEM_larABCDE (containing the entire *larA-E* operon). PCR amplification were performed in order to obtain a fragment comprising the whole pGEM_LarABCDE plasmid, deleted of *larC2*, and a fragment comprising the whole pGEM_LarABCDE plasmid, with a 1 bp insertion at the end of *larC1*, using primers LarZ-C2b_A and LarZ-C2b_B and primers pG_LarCC_A and LarCC_B, respectively. The PCR fragments were digested with BstB1 and self-ligated. The ligation mixtures were digested with DpnI before transformation in *E. coli* DH10B in order to digest the original pGEM_larABCDE plasmid used as template. Plasmid pGIR400 (Δ*larC2*) and pGIR150 (LarC-fused) were constructed by cloning of a DNA fragment comprising the whole *larABC1ΔC2DE* operon or *larABC-fusedDE* operon, which was obtained by digestion of pGEM_larABC1ΔC2DE or pGEM_larABC-fusedDE with PciI and SacI, and ligated in the pNZ8048 plasmid digested with NcoI and SacI. The resulting plasmids were transformed in *Lc.lactis*.

Plasmid pGIR151 (Strep-tag-LarC-fused) was derived from plasmid pGIR150 (LarC-fused) as described for plasmid pGIR131 (Strep-tag-LarC). Plasmid pGIR051 (Strep-tag-LarC-fused alone) was derived from plasmid pGIR151 (Strep-tag-LarC-fused) as described for plasmid pGIR031 (Strep-tag-LarC alone). The plasmid sequences were confirmed by sequencing with primers UP_PNZ8048' and 632SEQA4 to 632SEQA14.

Preparation of crude extracts. Cells from a 50 ml culture of *Lc. lactis* or *L. plantarum* were collected by centrifugation at 5,000 x g for 10 min and washed twice with 25 ml of 60 mM Tris-Maleate buffer at pH 6.0 (TM buffer). Cells were resuspended in 0.5 ml TM buffer and transferred to a 2 ml microtube containing 0.5 ml of a suspension of 0.17-0.18 mm glass beads (Sartorius Mechatronics, Belgium) in TM buffer. Lysis was performed by running the microtubes 2 times 1 min at 6.5 m/s in a FastPrep-24 (MP, Belgium). Microtubes were cooled 5 min on ice between the runs. After lysis, the soluble fraction (referred to as the crude extract) was collected by centrifugation at 13,000 x g for 15 min (4°C). When larger volumes of

culture were used, cells were resuspended and lysed in 50 ml Falcon tubes (BD, NJ USA) using the same protocol.

Strep-Tactin affinity chromatography. Affinity chromatography was performed with Gravity flow Strep-Tactin® Superflow® high capacity column of 1 ml or 5 ml (39) with the following adaptations. For 1 ml columns purification, 1 L of *Lc. lactis* culture was washed and cells were lysed as described above in buffer W (100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7.5) instead of TM buffer. The column, equilibrated with 2 ml buffer W, was loaded with up to 10 ml crude extract, washed 6 times with 1 ml buffer W, and eluted 10 times with 0.5 ml buffer E (buffer W + 2.5 mM desthiobiotine). The following adaptations were made for the Lar proteins: LarA, 60 mM Tris-Maleate at pH 6 was used as lysis buffer and the crude extract was equilibrated at pH 7.5 (using 500 mM Tris at pH 10) before loading; LarB, triton X-100 (0.1% v/v) was added to all buffers; LarE, 300 mM NaCl instead of 150 mM was used in all buffers. For purifications with 5 ml columns, all volumes were increased 5-fold.

Size exclusion chromatography. In order to purify the Lar proteins to homogeneity (for crystallization purposes only), a second step of purification was performed using size exclusion chromatography. A Hiload 26/60 superdex 200 prep grade resin (Amersham Pharmacia Biotech) was used with 50 mM MES at pH 6.0 and 150 mM NaCl as an elution buffer (300 mM NaCl for LarE). Before protein loading, the sample was concentrated using a Centricon Plus-70 centrifugal (30 kDa cut-off) filter unit (Merckx Millipore, Germany). After collection of the fractions containing the target protein, as determined by absorbance at 280 nm, samples were concentrated again using an Amicon Ultra-4 (10 kDa cut-off) centrifugal filter (Merckx Millipore, Germany).

Storage of the Lar proteins. The purified Lar proteins were conserved at -80°C in buffer E supplemented with glycerol to 20% of the final volume. The Lar activity of LarA was stable for several weeks in this condition.

ICP_AES nickel dosage. In order to mineralize the sample, 0.5 mL of H₂O₂ and 0.5 mL of HNO₃ (Merckx Millipore, Germany) were added to 1 mL of protein sample, which was heated to dryness on a heating plate. The residues were solubilized with 0.5 mL of HNO₃ and diluted to 10 mL with H₂O. The elements were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy on an ICAP 6500 (Thermo Scientific).

PAR nickel dosage. Colorimetric Ni assays were performed with 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR), whose absorbance at 496 nm increases in presence of Ni(II) (22). The protein sample was denaturated 10 min at 90°C prior to incubation at room temperature with 100 μ M 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) in 100 mM Tris-HCl buffer at pH 7.5 during 2 minutes. The absorbance was read from 300 nm to 600 nm by steps of 2 nm, to confirm the visible spectrum corresponded with the expected spectrum (22). For Ni quantification, the absorbance at 496 was used.

Lactate racemase activity. Lactate racemase activity was assayed by incubating cell extracts or purified proteins at the appropriate dilution with 20 mM D- or L-lactate in 60 mM MES buffer pH 6 at 35°C during 10 min. A dilution factor of 10 and 50 was used for *L. plantarum* and *Lc. Lactis* cell extracts, respectively. The buffer was supplemented with inhibitors and other compounds, when required. For Michael-Menten kinetics measurements, the substrate concentration ranged from 5 to 320 (or 400) mM. For the lactate racemase of *T. thermosaccharolyticum*, the incubation temperature was increased to 50°C. The reaction was then stopped by incubating the reaction mixture for 10 min at 90°C. The lactate conversion was measured using the D-lactic acid/L-lactic acid UV test (R-Biopharm, Germany). The protocol was adapted to 100 μ l reaction volumes in 96-well half-area microplates (Greiner, Alphen a/d Rijn, the Netherlands). The oxidation of L- or D-lactate by L-Ldh or D-Ldh was detected by the formation of NADH, whose absorbance was read at 340 nm. 1 Unit of lactate racemase (Lar) activity is defined as 1 μ mol of lactate converted in 1 min.

ApoLarA activation by LarE^{NiBC}. The effect of other Lar proteins and cofactors on apoLarA_{Tt} *in vitro* activation by LarE^{NiBC} was assessed by incubating 2 pmol of apoLarA_{Tt} at room temperature in a 50 μ L solution of 60 mM MES buffer pH 6 supplemented with 20 pmol LarB, larC or LarE and other compounds, when required. Lar activity was measured by sampling 10 μ l of the solution at 0, 30, 60 and 120 minutes, incubating it with 20 mM L-lactate at 35°C during 10 minutes and measuring the L-lactate to D-lactate conversion.

For assessing the activation potential of LarE, 0.8 pmol of apoLarA_{Tt} and 1,4 pmol of apoLarA_{Lp} was mixed with 280 pmol of LarE (LarE^{NiBC}, LarE^{BC} or LarE^{Ni Δ BC}). The lactate racemase activity was measured by incubating the resulting mix with 20 mM L-lactate at 35°C during 10 minutes and measuring the L-lactate to D-lactate conversion.

In order to evaluate the stoichiometry of the reaction, 0.4 pmol of apoLarA_{Tt} was mixed with 15, 30, 45, 60, 85, 100, 115 and 120 pmol of LarE^{NiBC}. The lactate racemase activity was measured by incubating the resulting mix with 20 mM L-lactate at 35°C during 10 minutes and measuring the L-lactate to D-lactate conversion.

pH and temperature profiles. For the measurement of the pH profile, purified LarA_{Lp} and LarA_{Tt} were incubated in different buffers. 60 mM HCl-citrate buffer was used at pH 2.6, 3.0, 3.4, 3.8, 4.2, 4.6, 5.0 and 5.4, 60 mM MES buffer was used at pH 5.4, 5.8, 6.2 and 6.6, MOPS buffer was used at pH 6.6, 7.0, 7.4 and 7.8 and Tris-HCl buffer was used at pH 7.8, 8.2, 8.6 and 9. The lactate racemase activity was measured by measuring the L-lactate to D-lactate conversion.

For the measurement of the temperature profile, purified LarA_{Lp} and LarA_{Tt} were incubated with 20 mM L-lactate in 60 mM MES buffer pH 6 at the given temperature during 10 min. The reaction was stopped by incubating the reaction mixture for 10 min at 90°C. The lactate racemase activity was measured by measuring the L-lactate to D-lactate conversion.

PAR time-dependent assay. 1.5 nmol of LarA_{Lp} was incubated at room temperature with 100 µM 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) in 100 mM Tris-HCl buffer at pH 7.5. The absorbance at 496 nm was monitored every minute during 80 minutes. The Ni content of LarA_{Lp} was considered to be 0 after 1000 min.

Lar activity time-dependent assay. 25 pmol of purified LarA_{Lp} was incubated at room temperature in a 100 µl solution containing 60 mM MES buffer pH supplemented with NiCl₂, L-ascorbic acid, oxalic acid or sulfite. The partially anaerobic environment was generated and maintained with the glucose oxidase and catalase system (52): 25 pmol of purified LarA_{Lp} was incubated at room temperature in a 100 µl solution containing 60 mM MES buffer pH 6, 20 mM D-glucose, 0.5 units of glucose oxidase and 700 units of catalase. The contents were mixed and 50 µl of mineral oil was immediately added to form a thin layer on top of the aqueous solution, which helps to deter atmospheric O₂ from entering the assay solution. Lar activity was measured by incubating 10 µl samples with 20 mM L-lactate at 35°C during 10 minutes (dilution factor 5) and measuring the L-lactate to D-lactate conversion.

Total protein quantification and SDS-PAGE. Routine protein content was measured with the Bradford assay (53). Since the Bradford assay is highly variable from a protein to another (54) the NanoOrange protein quantification kit (Invitrogen) was used for a lower protein-to-protein variability (55). The conversion from g/L to mol/L was calculated with the theoretical molecular weight of the proteins, assuming there were 100% pure (Fig. 1D). The weight ratio of LarC1/LarC1C2 was estimated to be 1.5/1 (Fig. 1D), what gave a molecular ratio of 2.4/1. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) was performed with 10% acrylamide gels as described (56). The proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R and the protein mass ladder used was the PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, France).

Calculation of kinetic parameters. The $V_{\max}$ and K_m were calculated by non-linear regression using the Michaelis-Menten equation ($V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$). Purified LarA_{Lp} and LarA_{Tt} with the highest specific activity were used for the estimation of the k_{cat} . The k_{cat} was estimated as follows: $k_{\text{cat}} = V_{\max}$ (U/min/mg) * MW (g/mol) / 60 (sec/min) / 1000. The K_i of competitive inhibitors and the K_i of non-competitive inhibitors were calculated by non-linear regression using the equations $V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m(1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]}$ and $V_0 = \frac{\frac{V_{\max}}{(1 + \frac{[I]}{K_i})}[S]}{K_m + [S]}$, respectively.

Crystallization, data collection and processing. For initial screening experiments, a LarA_{Tt} solution at a concentration of 16 mg/ml 0.5 mM MES at pH 6.0 and 1.5 mM NaCl was submitted to the high-throughput crystallization facility at EMBL Hamburg (57) using the sitting drop vapour diffusion setup. After optimization of the best results, two different crystal forms were obtained in hanging drop experiments. The first form was obtained at 18°C from a reservoir containing 22% polyethyleneglycol monomethylether 5000, 0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M sodium malonate pH 7.0 and 0.02% (w/v) sodium azide. The hanging drop was formed by mixing 2 µl of the protein solution with 2 µl of the reservoir solution. These crystals that appeared after a few days were trigonal, of the space group P3₁21 or P3₂21, with $a = 227 \text{ \AA}$ and $c = 48 \text{ \AA}$, but they diffracted very poorly (about 4 Å resolution) with very diffuse spots and they could not be used for crystal structure analysis. A second crystal form was obtained in very similar conditions: the only difference was the

replacement of sodium malonate with 3% (v/v) ethylene glycol in the reservoir solution (Fig. S8.4). These crystals appeared after about two months, they belong to the orthorhombic system and diffracted to much higher resolution (see Table S5 for details) and were used for crystal structure analysis.

All data were collected at ESRF on beamline BM30A. A native data set was collected after soaking a crystal for a few seconds in a solution similar to the mother liquor but containing 20 % (v/v) ethylene glycol as a cryoprotectant and flash cooled at 100K. A mercury derivative was obtained by soaking a crystal for 48 hours in the same solution containing also 1 mM HgCH₃Cl and was used for MAD data collection at three wavelengths. This mercury derivative was not isomorphous with the native data. All the data sets were processed and scaled using the XDS program package (58).

The structure was solved by the MAD method applied to the mercury derivative using the Auto-Rickshaw procedure (59). A substructure containing 4 heavy atoms was successfully solved by SHELXD (60). The initial phases and molecular model were obtained from SHELXE (61) and they were further improved in the Auto-Rickshaw pipeline using PHASER (62), MLPHARE, PIRATE, REFMAC5 (63) from the CCP4 suite (64), RESOLVE (65) and ARP_wARP (66). A total of 226 residues in three fragments were finally docked in the sequence. Surprisingly, all these residues belonged to the same protein chain. This model was used for molecular replacement in the native data set and PHASER (62) succeeded to locate two copies in the asymmetric unit. Many cycles of model building in ARP_wARP (66) allowed to build large parts of the two chains. The model was manually completed using COOT (67) and refined with REFMAC5 (63). Electron density did not appear for residues 30-36 and for about ten residues in the C-terminal part of the two chains. The final model contains 588 water molecules, 5 sulfate ions, 1 ethylene glycol molecule and 1 supposed Mg²⁺ ion located on the non crystallographic two-fold axis linking the two protein chains.

EXAFS and XANES analysis

Sample preparation. Protein samples were isolated from *Lc. lactis*. LarA_{Tt} (4.5 mM, 0.1 mol Ni per mol protein) and LarA_{Lp} (1.2 mM, 0.17 mol Ni per mol protein) were prepared in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 20% glycerol buffers

for XAS. Samples were kept at -80°C and transported at liquid nitrogen temperatures until run.

Data collection. X-ray absorption data collection was carried out at SSRL (Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, 3 GeV ring) beam line 7-3 equipped with a 13-element Ge detector array with a Si(220) $\phi=00$ double crystal monochromator, and a liquid helium cryostat for the sample chamber.

Söller slits were used to reduce scattering and a 3 μm Z-1 element filter was placed between the sample and the detector. Internal energy calibration was performed by collecting spectra simultaneously in transition mode on a nickel metal foil.

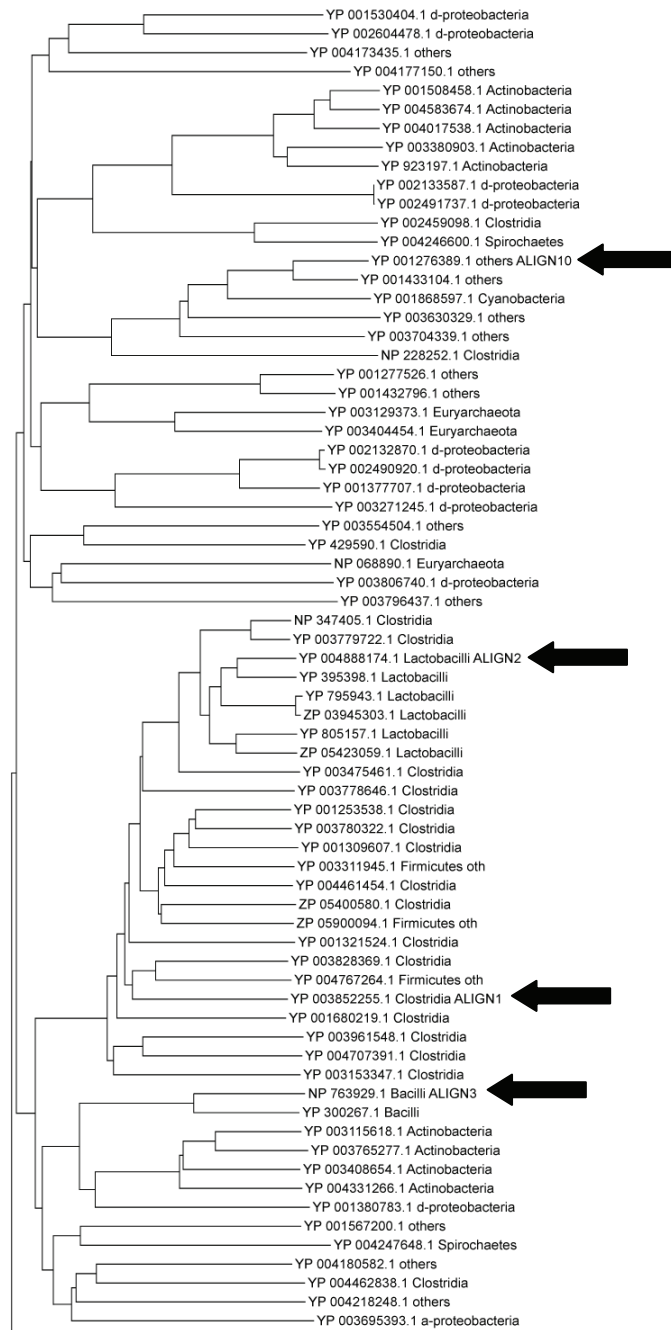
Data analysis. Data averaging and energy calibration was performed using SixPack (68). The first inflection points from the XANES spectral regions were set to 8331.6 eV for nickel foil. The AUTOBK algorithm available in the Athena software package was employed for data reduction and normalization (69). A linear pre-edge function followed by a quadratic polynomial for the post-edge was used for background subtraction followed by normalization of the edge-jump to 1. EXAFS data was extracted using an Rbkg of 1, and a spline from $k = 1$ to $14 \text{ \AA}^{-1}$ with no clamps. The k^3 -weighted data was fit in R-space over the $k = 2 - 12.5 \text{ \AA}^{-1}$ region with E_0 for nickel set to 8340 eV. All data sets were processed using a Kaiser-Bessel window with a $dk = 2$ (window sill). Artemis employing the FEFF6 and IFEFFIT algorithms was used to generate and fit scattering paths to data (69-71). Single scatter and multiple scatter fits were performed as described below. Average values and bond lengths obtained from crystallographic data were used to construct initial fitting models for multiple scatter analysis (72). The paths from a particular multiple scattering model were generally afforded two degrees of freedom and were fit in terms of the distance from the first ligand atom-metal bond and a ligand specific sigma square component of the Debye-Waller factor. Similar fitting approaches were previously described (73-75). To assess the goodness of fit from different fitting models, the goodness of fit (R_{factor}), χ^2 , and reduced χ^2 (χ_v^2) were minimized. Increasing the number of adjustable parameters is generally expected to improve the R-factor; however χ_v^2 may go through a minimum then increase indicating the model is over-fitting the data.

Genome analysis of Lar protein content and clustering. To identify conserved residues in LarA proteins, 148 LarA homologues were aligned

with clustalX2 (40) and a phylogenetic tree was constructed using the Neighbour-Joining method (Fig. S12) (41). Out of these, 10 homologues selected to represent the diversity of LarA proteins were aligned with clustalX2 (40) (Fig. S9).

To study the distribution and clustering of Lar proteins among bacterial and archaeal genomes, Blastp searches were performed using *L. plantarum* Lar protein sequences of strain WCFS1 (a single colony isolate of NCIMB8826) as queries against all complete microbial genomes of the NCBI database (release 187). Blastp searches were performed using default parameters with a cut-off E-value of 10^{-5} in order to select only those sequences most similar to Lar-encoding genes. For *larA* homologues, sequences that were 90% shorter or 130% longer than the LarA_{Lp} sequence were discarded. When several genomes of the same species were available, the genome containing the highest content in *lar* genes was retained. Gene clusters were assessed by considering all *lar* genes as belonging to the same cluster when there was maximum one gene between them on the chromosome, based on the gene identification numbers. The case of *larD* was ambiguous, since we found over 500 homologues, only 9 of which found in a gene cluster with at least one other *lar* gene. Since these homologues are probably irrelevant in the frame of our study due to the high similarity level of members of the aquaglyceroporin family, we considered only those 9 homologs present in *lar* operons as true *larD*. Another particular feature was the fact that some *larC* genes possess a programmed ribosomal frameshifting (PRF) site (21). This led to the misleading annotation of some *larC* homologs as pseudogenes, which were overlooked by the Blastp program. Some of them were found manually by looking at the flanking regions of *lar* genes, but others may still remain undetected.

In Dataset S4 (on CD-ROM), species are grouped by class or order and for each species, the number of *lar* genes and their clustering are provided. In Dataset S5 (on CD-ROM), species are listed together with the NCBI accession number of each of their *lar* genes.



Résultats : la lactate racémase

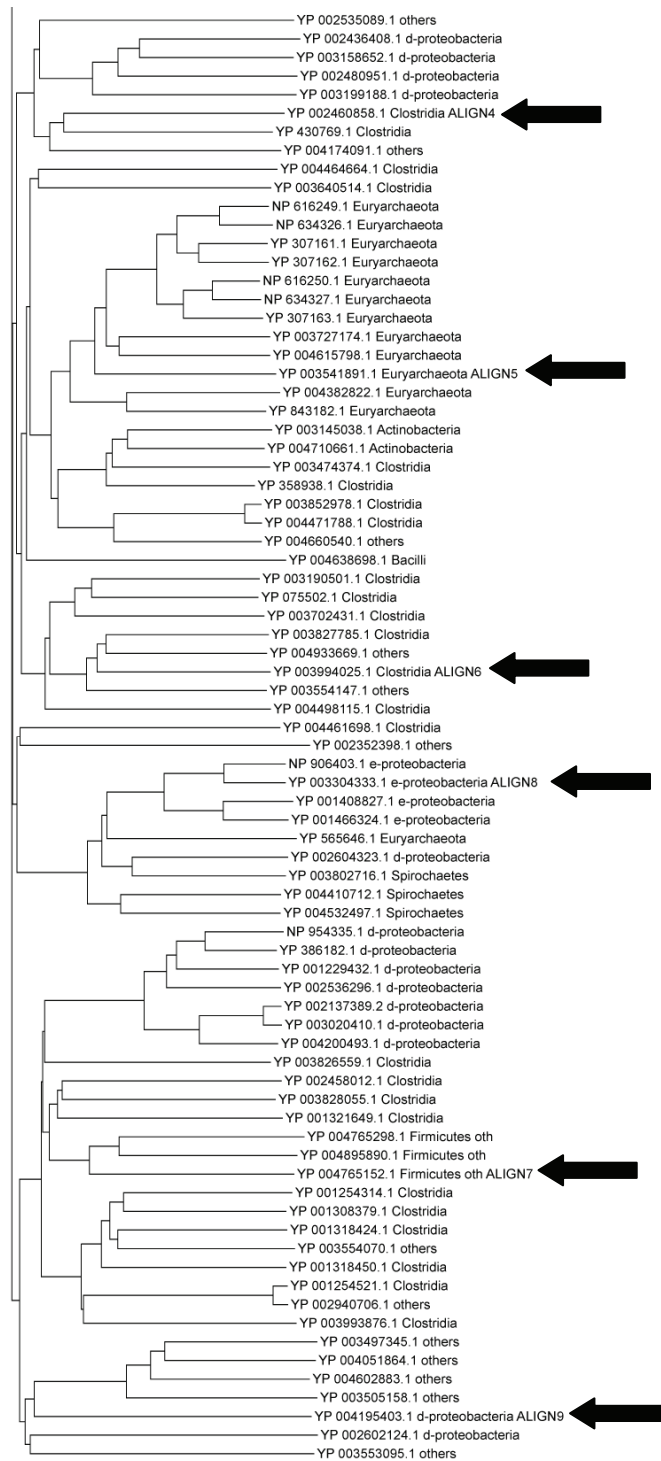


Fig. S12. Phylogenetic tree of 148 *larA* homologues (previous two pages).

Phylogenetic tree of 148 *LarA* homologs identified in 1,087 complete genomes of the NCBI database (release 187). Labels represent the protein accession number and the class (sub-class) of species to which they belong. An additional label, “ALIGNX” (with X, a number from 1 to 10), is added for the 10 homologues selected (black arrows) for the alignment shown at Fig. S9.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank H. Degand, A. Iserentant, F. Lucaccioni, M. Gabriel, G. Muccioli and C. Le Duff for their skillful technical assistance. We thank I. Markó and R. Crichton for fruitful discussions. We thank J. Delcour for initiating this research project. This work was supported by grants from the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS), the Interuniversity Attraction Poles Programme–Belgian Science Policy, the “Communauté française de Belgique–Actions de Recherches Concertées”, and the “UCL-Fonds Speciaux de Recherche”. B.D. and P.H. are respectively Research Fellow and Research Associate at FNRS.

REFERENCES

1. Garvie EI (1980) Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiological reviews* 44(1):106-139.
2. Schlegel H & Jannasch H (2006) Prokaryotes and Their Habitats. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer New York), pp 137-184.
3. Thauer RK, Jungermann K, & Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews* 41(1):100-180.
4. Tatum EL, Peterson WH, & Fred EB (1936) Enzymic racemization of optically active lactic acid. *The Biochemical journal* 30(10):1892-1897.
5. Stetter KO & Kandler O (1973) [Formation of DL-lactic acid by lactobacilli and characterization of a lactic acid racemase from several streptobacteria (author's transl)]. *Archiv fur Mikrobiologie* 94(3):221-247.
6. Oren A & Gurevich P (1995) Diversity of lactate metabolism in halophilic archaea. *Canadian journal of microbiology* 41(3):302-307.
7. Hino T & Kuroda S (1993) Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(1):255-259.

8. Gilmour M, Flint HJ, & Mitchell WJ (1994) Multiple lactate dehydrogenase activities of the rumen bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Microbiology* 140:2077-2084.
9. Hiyama T, Fukui S, & Kitahara K (1968) Purification and properties of lactate racemase from *Lactobacillus sake*. *J Biochem* 64(1):99-107.
10. Goffin P, *et al.* (2005) Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of bacteriology* 187(19):6750-6761.
11. Goffin P, *et al.* (2010) Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. *Mol. Syst. Biol.* 6:413.
12. Dennis D, Reichlin M, & Kaplan NO (1965) Lactic acid racemization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 119(3):868-876.
13. Deghorain M, *et al.* (2007) Selectivity for D-lactate incorporation into the peptidoglycan precursors of *Lactobacillus plantarum*: role of Aad, a VanX-like D-alanyl-D-alanine dipeptidase. *Journal of bacteriology* 189(11):4332-4337.
14. Tanner ME (2002) Understanding nature's strategies for enzyme-catalyzed racemization and epimerization. *Accounts of chemical research* 35(4):237-246.
15. St Maurice M & Bearne SL (2000) Reaction intermediate analogues for mandelate racemase: interaction between Asn 197 and the alpha-hydroxyl of the substrate promotes catalysis. *Biochemistry* 39(44):13324-13335.
16. Gerlt JA, Kozarich JW, Kenyon GL, & Gassman PG (1991) Electrophilic catalysis can explain the unexpected acidity of carbon acids in enzyme-catalyzed reactions. *Journal of the American Chemical Society* 113(25):9667-9669.
17. Katagiri H, Sugimori T, & Imai K (1961) On the Metabolism of Organic Acids by *Clostridium acetobutylicum*. Part III. Purification and Properties of Racemase. *Agric. Biol. Chem.* 25(4):281-289.
18. Dennis D & Kaplan NO (1963) Lactic Acid Racemization in *Clostridium Butylicum*. *Biochemische Zeitschrift* 338:485-495.
19. Cantwell A & Dennis D (1974) Lactate racemase. Direct evidence for an alpha-carbonyl intermediate. *Biochemistry (Mosc.)* 13(2):287-291.
20. Rodionov DA, Hebbeln P, Gelfand MS, & Eitinger T (2006) Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *Journal of bacteriology* 188(1):317-327.
21. Giedroc DP & Cornish PV (2009) Frameshifting RNA pseudoknots: structure and mechanism. *Virus research* 139(2):193-208.

22. McCall KA & Fierke CA (2000) Colorimetric and fluorimetric assays to quantitate micromolar concentrations of transition metals. *Analytical biochemistry* 284(2):307-315.
23. Teusink B, *et al.* (2006) Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. *J. Biol. Chem.* 281(52):40041-40048.
24. Tseng CP, Tsau JL, & Montville TJ (1991) Bioenergetic consequences of catabolic shifts by *Lactobacillus plantarum* in response to shifts in environmental oxygen and pH in chemostat cultures. *Journal of bacteriology* 173(14):4411-4416.
25. Gibrat JF, Madej T, & Bryant SH (1996) Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6(3):377-385.
26. Lim LW, *et al.* (1986) Three-dimensional structure of the iron-sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase at 2.4-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 261(32):15140-15146.
27. Lee JH, *et al.* (2010) Characterization and structure of DhplI, a phosphonate O-methyltransferase involved in dehydrophos biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(41):17557-17562.
28. Drake H, Küsel K, & Matthies C (2006) Acetogenic Prokaryotes. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer New York), pp 354-420.
29. Rabus R, Hansen T, & Widdel F (2007) Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer, New York), pp 659-768.
30. Call DF & Logan BE (2011) Lactate oxidation coupled to iron or electrode reduction by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(24):8791-8794.
31. Duncan SH, Louis P, & Flint HJ (2004) Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10):5810-5817.
32. Ragsdale SW (2009) Nickel-based Enzyme Systems. *J. Biol. Chem.* 284(28):18571-18575.
33. Shapiro SS & Dennis D (1965) Lactic Acid Racemization in *Clostridium butylicum*. Evidence for a Direct Internal Hydride Shift*. *Biochemistry (Mosc.)* 4(11):2283-2288.
34. Barton BE & Rauchfuss TB (2010) Hydride-containing models for the active site of the nickel-iron hydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* 132(42):14877-14885.
35. Amara P, Mouesca JM, Volbeda A, & Fontecilla-Camps JC (2011) Carbon monoxide dehydrogenase reaction mechanism: a likely case of abnormal CO₂ insertion to a Ni-H(-) bond. *Inorg. Chem.* 50(5):1868-1878.

36. Harmer J, *et al.* (2008) A nickel hydride complex in the active site of methyl-coenzyme m reductase: implications for the catalytic cycle. *J. Am. Chem. Soc.* 130(33):10907-10920.
37. Li Y & Zamble DB (2009) Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. *Chem. Rev.* 109(10):4617-4643.
38. McGlynn SE, *et al.* (2008) HydF as a scaffold protein in [FeFe] hydrogenase H-cluster biosynthesis. *FEBS Lett.* 582(15):2183-2187.
39. Schmidt TG & Skerra A (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* 2(6):1528-1535.
40. Larkin MA, *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-2948.
41. Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4(4):406-425.
42. Narmandakh A & Bearne SL (2010) Purification of recombinant mandelate racemase: improved catalytic activity. *Protein Expr. Purif.* 69(1):39-46.
43. McDonald LC, Fleming HP, & Hassan HM (1990) Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(7):2120-2124.
44. Colpas GJ, *et al.* (1991) X-ray spectroscopic studies of nickel complexes, with application to the structure of nickel sites in hydrogenases. *Inorg. Chem.* 30(5):920-928.
45. J S, E F, & T M (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. *New York, NY, USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press.*
46. Dower WJ, Miller JF, & Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* 16(13):6127-6145.
47. Lambert JM, Bongers RS, & Kleerebezem M (2007) Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology* 73(4):1126-1135.
48. Holo H & Nes IF (1989) High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(12):3119-3123.
49. Ferain T, *et al.* (1996) Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178(18):5431-5437.
50. Goffin P, *et al.* (2010) Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. *Molecular systems biology* 6:413.

51. Trower M & Elgar G (1994) PCR Cloning Using T-Vectors. *Protocols for Gene Analysis*, Methods in Molecular Biology, ed Harwood A (Humana Press), Vol 31, pp 19-33.
52. Rajagopalan PT & Pei D (1998) Oxygen-mediated inactivation of peptide deformylase. *J. Biol. Chem.* 273(35):22305-22310.
53. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
54. Noble JE & Bailey MJA (2009) Chapter 8 Quantitation of Protein. *Methods Enzymol.*, eds Richard RB & Murray PD (Academic Press), Vol Volume 463, pp 73-95.
55. Jones LJ, Haugland RP, & Singer VL (2003) Development and characterization of the NanoOrange protein quantitation assay: a fluorescence-based assay of proteins in solution. *Biotechniques* 34(4):850-854, 856, 858 passim.
56. Shapiro AL, Vinuela E, & Maizel JV, Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28(5):815-820.
57. Mueller-Dieckmann J (2006) The open-access high-throughput crystallization facility at EMBL Hamburg. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 62:1446-1452.
58. Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* 26(6):795-800.
59. Panjikar S, Parthasarathy V, Lamzin VS, Weiss MS, & Tucker PA (2005) Auto-Rickshaw: an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 61:449-457.
60. Schneider TR & Sheldrick GM (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 58:1772-1779.
61. Sheldrick GM (2002) Macromolecular phasing with SHELXE. *Zeitschrift Fur Kristallographie* 217(12):644-650.
62. McCoy AJ, *et al.* (2007) Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* 40:658-674.
63. Murshudov GN, Vagin AA, & Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 53:240-255.
64. Collaborative Computational Project N (1994) The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 50(5):760-763.

65. Terwilliger T (2004) SOLVE and RESOLVE: automated structure solution, density modification, and model building. *Journal of Synchrotron Radiation* 11:49-52.
66. Morris RJ, Perrakis A, & Lamzin VS (2003) ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps. *Macromolecular Crystallography, Pt D* 374:229-244.
67. Emsley P & Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 60:2126-2132.
68. Webb SM (2005) SIXpack: a graphical user interface for XAS analysis using IFEFFIT. *Physica Scripta* 2005(T115):1011.
69. Ravel B & Newville M (2005) ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of synchrotron radiation* 12(Pt 4):537-541.
70. Newville M (2001) EXAFS analysis using FEFF and FEFFIT. *Journal of synchrotron radiation* 8(Pt 2):96-100.
71. Zabinsky SI, Rehr JJ, Ankudinov A, Albers RC, & Eller MJ (1995) Multiple-scattering calculations of x-ray-absorption spectra. *Physical review. B, Condensed matter* 52(4):2995-3009.
72. Engh RA & Huber R (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallographica Section A* 47(4):392-400.
73. Blackburn NJ, Hasnain SS, Pettingill TM, & Strange RW (1991) Copper K-extended x-ray absorption fine structure studies of oxidized and reduced dopamine beta-hydroxylase. Confirmation of a sulfur ligand to copper(I) in the reduced enzyme. *J. Biol. Chem.* 266(34):23120-23127.
74. Ferreira GC, Franco R, Mangravita A, & George GN (2002) Unraveling the substrate-metal binding site of ferrochelatase: an X-ray absorption spectroscopic study. *Biochemistry (Mosc.)* 41(15):4809-4818.
75. Martin-Diaconescu V, Bellucci M, Musiani F, Ciurli S, & Maroney MJ (2012) Unraveling the *Helicobacter pylori* UreG zinc binding site using X-ray absorption spectroscopy (XAS) and structural modeling. *J. Biol. Inorg. Chem.* 17(3):353-361.
76. de Ruyter PG, Kuipers OP, & de Vos WM (1996) Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and environmental microbiology* 62(10):3662-3667.
77. van Kranenburg R, Marugg JD, van S, II, Willem NJ, & de Vos WM (1997) Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular microbiology* 24(2):387-397.

78. Kuipers OP, de Ruyter PGGA, Kleerebezem M, & de Vos WM (1998) Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64(1):15-21.

III.2. Deuxième partie : l'aquaglycéroporine LarD

L'aquaglycéroporine LarD a rapidement été mise de côté lors de l'étude précédente. En effet, elle n'est pas directement impliquée dans la racémisation du lactate. Pourtant, le gène *larD* se situe au sein de l'opéron *larA-E* chez *L. plantarum* et chez quelques autres espèces de bactéries lactiques qui possèdent un opéron *lar*.

La présence de *larD* au sein de ces opérons *lar* n'est probablement pas fortuite et résulte probablement de la nécessité d'exprimer ce gène en même temps que les gènes de la lactate racémase. Le rôle de LarD pourrait donc être lié à celui de la lactate racémase, d'une manière ou d'une autre. Les aquaglycéroporines sont des protéines de canal qui permettent le passage de petites molécules non chargées, telles le glycérol ou l'eau, à travers la membrane plasmique. LarD est donc vraisemblablement impliquée dans le transport d'une petite molécule utilisée comme cofacteur ou comme substrat par la lactate racémase. Le seul cofacteur de la lactate racémase dont nous ayons connaissance est le nickel, et le transport du nickel est déjà assuré par le transporteur Lar(MN)OQ du locus *lar*. L'hypothèse la plus probable est donc que LarD soit impliquée dans le transport d'un ou des deux substrats/produits de la lactate racémase, le L- et/ou le D-lactate. Vu que le lactate est chargé négativement, c'est probablement sous sa forme neutre, l'acide lactique, qu'il est transporté. Même si certaines aquaglycéroporines d'eucaryotes ont déjà été démontrées comme étant des transporteurs d'acide lactique, jamais ce transport n'a été montré chez une aquaglycéroporine procaryotique.

Au delà du rôle de LarD en particulier, le rôle des autres aquaglycéroporines de *L. plantarum* a été investigué également. *L. plantarum* possède en effet six gènes d'aquaglycéroporines dans son génome, ce qui est le plus grand nombre d'aquaglycéroporines rapporté chez une bactérie. Ceci indique que *L. plantarum* possède vraisemblablement une capacité de transport très diversifiée, ce qui est en accord avec la versatilité de cette espèce (268).

La capacité de transport des six aquaglycéroporines de *L. plantarum* a donc été étudiée en exprimant celles-ci dans des oocytes et en observant le gonflement des oocytes en présence de différents substrats potentiels. Ceci nous a permis de confirmer qu'une aquaglycéroporine très proche de LarD

était capable de transporter de l'acide lactique, ainsi que du glycérol et du dihydroxyacétone. Le fait qu'aucun transport n'a été montré pour LarD exprimée dans des oocytes ne signifie que pour autant que celle-ci est inactive chez *L. plantarum*. En accord avec ceci, la délétion de *larD* chez *L. plantarum* montre chez le mutant un défaut de transport de l'acide lactique.

Deux autres aquaglycéroporines de *L. plantarum* ont été identifiées comme transporteurs de glycérol et de dihydroxyacétone. Exprimées dans la levure, les transporteurs de glycérol et de dihydroxyacétone sont également capables de transporter du peroxyde d'hydrogène et les transporteurs d'acide lactique transportent du peroxyde d'hydrogène et de l'urée.

L'implication d'aquaglycéroporines dans le transport d'acide lactique est une nouveauté chez les bactéries. Le rôle de ce transport pourrait tant être lié à la racémisation de l'acide lactique qu'à l'excrétion de celui-ci hors de la cellule. Le fait que le double mutant des transporteurs d'acide lactique chez *L. plantarum* montre un défaut de croissance par rapport au sauvage et que ce phénotype soit d'autant plus marqué en présence de lactate extracellulaire indique que la deuxième hypothèse est la plus probable.

La spécificité des aquaglycéroporines envers leur substrat se marque souvent au niveau de leur filtre de sélectivité. Celui-ci permet le passage de certaines molécules en fonction de leur taille et de leur charge, ne laissant passer que les petites molécules non-chargées. Le filtre de sélectivité des transporteurs d'acide lactique ne semble pourtant pas différent des filtres de sélectivité des transporteurs de glycérol et de dihydroxyacétone. La sélectivité envers l'acide lactique pourrait donc seulement être due au diamètre du canal des transporteurs et n'impliquerait pas de reconnaissance particulière du substrat. Le fait que les transporteurs d'acide lactique sont également capables de transporter d'autres molécules de taille similaires, telles le glycérol, le dihydroxyacétone ou l'urée, est en accord avec cette hypothèse.

Article accepté avec modifications mineures au journal « Biochemical Journal ».

Contribution des auteurs de ce travail.

Benoît Desguin : analyse phylogénétique des aquaglycéroporines de bactéries lactiques. Délétion des transporteurs d'acide lactique chez *L. plantarum* et analyse des mutants. Ecriture de l'article.

Résultats : l'aquaglycéroporine LarD

Patrick Gerd Bienert : réalisation des expériences de transport dans les oocytes et dans la levure. Ecriture de l'article.

François Chaumont et Pascal Hols : superviseurs du travail.

Channel-mediated lactic acid transport: a novel function for aquaglyceroporins in bacteria

Gerd P. BIENERT ^{*†§}, Benoît DESGUIN^{*§}, François CHAUMONT^{*}, and Pascal HOLS^{*}

^{*}Institut des Sciences de la Vie, Université catholique de Louvain, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

[†]Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, 06466 Gatersleben, Germany

[§]Both authors contributed equally to this work

To whom correspondence should be addressed: Pascal Hols or François Chaumont, Institut des Sciences de la Vie, Université catholique de Louvain, 5 Place Croix du Sud, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium; P. H., Tel.: 32-10-478896, Fax: 32-10-473109, E-mail: Pascal.Hols@uclouvain.be; F. C., Tel.: 32-10-478485, Fax: 32-10-473872, E-mail: Francois.Chaumont@uclouvain.be.

Short (page heading) title: Aquaglyceroporins of *L. plantarum*

Keywords: aquaporin, bacterial aquaglyceroporin, GlpF, lactic acid transport, *Lactobacillus plantarum*

Abbreviations used: AQP, aquaporin; dak operon, dihydroxyacetone kinase operon; DNA, deoxyribonucleic acid; Dur, degradation of urea; Gla, glycerol-facilitator aquaporin; GLP, glycerol facilitators; GlpF, glycerol uptake facilitator; lar operon, lactate racemization operon; LctP, lactate permease protein; MIP, major intrinsic protein; MRS, de Man, Rogosa and Sharpe; NIP, Nodulin26-like intrinsic protein; OD, optical density; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; Pf, osmotic water permeability coefficient; PIP, plasma membrane intrinsic protein; SDS, sodium dodecyl sulfate; UV, ultraviolet; YFP, yellow fluorescent protein; YNB, yeast nitrogen base.

SYNOPSIS

Major intrinsic proteins (MIPs) are membrane proteins that channel water and/or uncharged solutes across membranes in all kingdoms of life. Considering the enormous amount of diverse bacteria on earth, functional information on bacterial MIPs is scarce. Here, six MIPs (*glpF1*–*glpF6*) were identified in the genome of the Gram-positive lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum*. Heterologous expression in *Xenopus laevis* oocytes revealed that GlpF2, GlpF3 and GlpF4 facilitate the membrane diffusion of water, dihydroxyacetone and glycerol. As several lactic acid bacteria possess GlpFs in their lactate racemization operons (GlpF1/F4 phylogenetic group), their ability to transport this organic acid was tested. Notably, GlpF1 and GlpF4 facilitated the diffusion of D- and L-lactic acid. *glpF1* and *glpF4* were deleted singly or in combination in *L. plantarum*. Both GlpFs were involved in cellular racemization of lactic acid and the double *glpF1 glpF4* mutant showed a growth delay in conditions of mild lactic acid stress. This provided further evidence that GlpFs contribute to the lactic acid metabolism of this species. This lactic acid transport capacity was shown to be conserved in the GlpF1/F4 group of *Lactobacillales*. In conclusion, we functionally analyzed the largest set of bacterial MIPs and demonstrated that lactic acid membrane permeability of bacteria could be regulated by aquaglyceroporins.

INTRODUCTION

Major Intrinsic Proteins (MIPs) facilitate the movement of water and nonionic solutes through the membranes and are required for osmoregulation, water conductance, gas and nutrient uptake and translocation, metalloid homeostasis and signal transduction in eubacteria, archaea, fungi, plants and animals. MIPs were classified into two phylogenetically functional subgroups: aquaporins (AQPs) which originally regroup water-specific channels but also include aquaporins shown to be permeable to other small non-polar solutes, and aquaglyceroporins or glycerol facilitators (GLPs) which are permeable to glycerol and urea as well as, for some of them, water and metalloids [1]. While the substrate specificity and roles of many plant and mammalian MIPs have been thoroughly studied [2], less is known about physiological functions of MIPs in microorganisms. Most of the bacterial AQP-type isoforms were identified in Gram-negative bacteria, whereas most GLP-type sequences were found in

Gram-positive ones. This asymmetry might be related to the different structure and diffusion properties of the membranes and cell walls in both bacterial groups [3].

The best studied microbial MIPs are GlpF and AqpZ isoforms from *Escherichia coli* (EcGlpF and EcAqpZ) [4, 5], GlpF from *Lactococcus lactis* (Gla) [6] and AqpX from *Brucella abortus* [7]. Phylogenetic analysis suggested that osmoregulation in eubacteria requires only one AQP and one GLP, or only one GLP transporting both water and glycerol [3]. Nevertheless, some bacteria do not possess any MIP-encoding gene in their genome [8].

Yet, some lactic acid bacteria possess more than two MIPs in their genomes, *Pediococcus pentosaceus* and *Lc. lactis* have four, and *Lactobacillus brevis* has three [9]. The existence of glycerol facilitators in these organisms may reflect their abilities to use glycerol or other substrates in the presence of a second carbon source, since they cannot utilize glycerol alone [9]. However, the large number of MIPs in lactic acid bacteria suggests other functions than water and glycerol transport. Interestingly, a few MIPs have been shown to transport lactic acid in human (AQP9), Arabidopsis (NIP2;1) and trematode (SmAQP) [10-12], suggesting that MIPs can fulfill a physiological role in facilitating diffusion of lactic acid across membranes.

Lactic acid, a monocarboxylic acid, and the lactate anion stay in chemical equilibrium at a pKa of 3.86. Even though the dissociated (ionized) lactate is the predominant species, the undissociated (uncharged) lactic acid is constantly present at physiological pH. Unlike the dissociated lactate, which requires proteinaceous transmembrane transport systems, the undissociated lactic acid is able to diffuse through lipid bilayers [13]. However, the high lactate concentrations measured in lactic acid bacteria such as *Lactobacillus plantarum* point out that some membranes are rather poorly permeable to lactic acid [14]. This implies that lactic acid transport may be regulated and that this regulation constitutes a major factor in determining cellular lactic acid/lactate concentration. Until now, no lactic acid channel has been functionally characterized in lactic acid bacteria. Lactic acid transport is often linked to energy production. The different energy producing systems include lactate-proton symport [15], malolactic fermentation [16, 17] and citrolactic fermentation [18]. For the two latter systems, a non-facilitated passive diffusion [19] or a protein-mediated transport of lactic acid/lactate is conceivable [20].

In this study, we cloned six MIPs of *L. plantarum*, analyzed their substrate specificity and characterized their function, with a particular focus on GlpF1 and GlpF4, which were shown to be lactic acid transporters. These are the first bacterial MIPs of which lactic acid transport was demonstrated.

MATERIAL AND METHODS

Strains, plasmids, and growth conditions

Strains and plasmids are listed in supplemental Table S1. Plasmids were constructed in *E. coli* TOP10. *L. plantarum* was grown in MRS broth (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI) at 28°C without shaking. When required, erythromycin (250 µg/ml for *E. coli*, 10 µg/ml for *L. plantarum*) or chloramphenicol (10 µg/ml for *E. coli* and *L. plantarum*) was added to the media. Solid agar plates were prepared by adding 2% (w/v) agar to the medium. The urea complementation assay and the H₂O₂ toxicity growth assays were carried out as previously described [21], [22]. For the urea complementation assay, the Δ_{dur3} mutant YNVW1 *S. cerevisiae* strain was transformed with the vector described above containing the respective aquaporin isoform. Transformants were selected on synthetic medium containing 2% agar, 2% glucose, pH 5.5, 0.17% yeast nitrogen base (YNB) without amino acids and ammonium (Difco), supplemented with 1 mM arginine. For the complementation assay, transformants were spotted on such synthetic medium supplemented with 1 mM arginine or different concentrations of urea as sole nitrogen source. For H₂O₂ toxicity growth and survival assays, the above-described yeast strain were grown on synthetic media containing and supplemented with different concentrations of H₂O₂. For the lactic acid complementation assay, the Δ_{jen1} *S. cerevisiae* mutant strain (Euroscarf: BY4741; Mata; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YKL217w::kanMX4) was transformed with pRS426-pTPIu containing the respective aquaporin isoform. Transformants were selected on synthetic medium containing 2% agar, 2% glucose, 0.17% yeast nitrogen base (YNB) without amino acids (Difco) and supplemented according to the auxotrophic requirements with histidine, methionine and leucine. For the complementation assay, transformants were spotted on such synthetic medium supplemented with glucose or different concentrations of D/L-lactate as a sole carbon source. After 5 to 11 days of incubation at 28°C, differences in growth and survival in the different assays were recorded. Two to three independent experiments with consistent results were carried out.

Growth rate measurement

L. plantarum cells were grown in 96-well sterile microplates with a transparent bottom (Greiner, Alphen a/d Rijn, the Netherlands) and the OD₆₀₀ was measured every 10 min with a Varioskan Flash multimode reader (Thermo Scientific).

Growth competition experiment

L. plantarum wild type and the double $\Delta glpF1 \Delta glpF4$ mutant were grown overnight in MRS medium. Cultures were inoculated with an equal volume of both strains at a final OD₆₀₀ of 0.002 in MRS without or with 200 mM L-lactate. Inoculation was performed every 12 h in order to keep the cells in exponential phase (OD₆₀₀ < 1.0). Cultures were plated every 24 h on MRS agar and 96 PCRs were performed on isolated colonies in order to discriminate between wild type and double mutant.

DNA techniques and transformation

General molecular biology techniques were performed according to the instructions given by Sambrook et al [23]. Electrocompetent *L. plantarum* cells were prepared as previously described [24]. PCR were performed with the Phusion high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) or PfuTurbo Cx Hotstart DNA polymerase (Stratagene) in 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). The primers used in this study were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium) or Eurofins MWG Operon (Germany) and are listed in supplemental Table S2 (on CD-ROM).

Construction of plasmids for transport assay

Primers (supplemental Table S2 on CD-ROM) matching the diverse *glpF* sequences were used to amplify by PCR the *glpF* ORFs from isolated genomic DNA of the respective bacterial strain. The PCR products were directionally sub-cloned using an uracil excision-based improved high-throughput USER cloning technique [25] into the USER-compatible *Xenopus* expression vectors pNB1u and pNB1YFPu (N-terminal fusion of YFP to the protein of interest) [26] or the yeast expression vector pRS426-pTPIu (supplemental Table S1).

Table S1. Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Characteristic(s) ^a	Source or reference
Strain		
<i>S. cerevisiae</i>		
YNVW1	$\Delta dur3$, $\Delta ura3$; mutant defective in urea uptake	[21]
<i>L. plantarum</i>		
WCFS1	wild type	NCIMB ^b
LR0003	WCFS1 $\Delta glpF1$	This study
LR0004	WCFS1 $\Delta glpF4$	This study
LR0005	WCFS1 $\Delta glpF1 \Delta glpF4$	This study
<i>E. coli</i>		
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80 lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74 nupG recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 \lambda^-$	Invitrogen
Plasmid		
pNB1u	oocyte expression vector of MIP homologs	[25]
pNB1YFPu	oocyte expression vector with the N-terminal fusion of YFP to the protein of interest	[25]
pRS426-pTPIu	yeast expression vector of MIP homologs	Laboratory collection
pNZ5319	Cm ^r Em ^r ; pNZ5318 derivative for multiple gene replacements in Gram-positive bacteria	[24]
pNZ5348	Em ^r ; pGID023 derivative containing <i>cre</i> under the control of the lp_1144 promoter	[24]
pGIR801	Cm ^r Em ^r ; pNZ5319 derivative containing homologous regions up- and downstream of <i>glpF1</i> (used for the construction of LR0003)	This study
pGIR802	Cm ^r Em ^r ; pNZ5319 derivative containing homologous regions up- and downstream of <i>glpF4</i> (used for the construction of LR0004)	This study

^a Em^r and Cm^r indicate resistance to erythromycin and chloramphenicol, respectively.

^b NCIMB, The National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Ltd., Aberdeen, Scotland.

Construction of deletion mutants

Construction of the deletion mutants of the *L. plantarum* MIP-encoding genes was performed as previously described [24]. This strategy was applied for the construction of strains LR0003 ($\Delta glpF1$) and LR0004 ($\Delta glpF4$). In order to obtain the double mutant strain LR0005 ($\Delta glpF1 \Delta glpF4$), strain

LR0004 (*ΔglpF4*) was used for the subsequent deletion of *glpF1* following the same procedures as described above (supplemental Table S1). Primers used to construct the deletion vectors and to validate the deletions events are listed in supplemental Table S2 (on CD-ROM).

***In vitro* RNA synthesis and oocyte transport assays**

Ready-to-use capped complementary RNAs encoding N-terminal YFP-tagged or non-tagged GlpFs were synthesized *in vitro* as described previously [27]. *Xenopus laevis* oocytes were isolated, defolliculated, and injected, and the osmotic water permeability coefficient (P_f) determined as described previously [27]. Localization of YFP fusion proteins was verified by confocal microscopy (LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Germany) on fixed oocytes as previously described [28]. YFP was excited at 514 nm and emitted fluorescence was detected between 530 and 570 nm. Glycerol, dihydroxyacetone and lactic acid permeability was measured in an iso-osmotic swelling assay as previously described [29] with the following adaptations. Prior to the experiment, oocytes were osmotically equilibrated in a standard Barth medium (200mOsm/l) for 15-25 min. Solute uptake was tested by measuring the swelling rate at room temperature by video microscopy upon incubation in an iso-osmotic modified Barth's solution (200 mOsm/l) in which NaCl was replaced with 160 mM glycerol, 80 mM 1,3 dihydroxyacetone-dimer (corresponding to about 160 mM dihydroxyacetone in solution) or 80 mM sodium D-, L-, or D/L-lactate (corresponding to about 58 μ M undissociated lactic acid at a pH of 7.0). The swelling rate of oocytes was then expressed as the change in oocyte volume ($d(V/V_0)/dt$), where V is the volume at a specific time and V_0 represents the initial oocyte volume at time 0, as described previously [29].

Direct lactic acid uptake experiments in oocytes were performed as followed. The oocyte incubation buffer consisted of a modified Barth's solution (NaCl was partly replaced by sodium lactate to adjust the osmolarity to 200 mOsm/l) containing [14 C]-labeled sodium lactate (12 μ Ci/ml) (Perkin Elmer). Oocyte incubations were done at room temperature for 0, 6 or 12 min, and oocytes were washed four times in 250 ml of ice-cold modified Barth's solution containing 80 mM of non-labeled sodium lactate. The oocytes were then lysed overnight with 1 ml of 10% (w/v) SDS, and the radioactivity counted after addition of 4 ml of Lumasafe scintillation liquid (Perkin Elmer) in a scintillation counter.

Cell suspensions for lactate racemization assays

L. plantarum cells were grown in MRS medium, the lactate racemase (Lar) activity was induced by addition of L-lactate sodium salt (Sigma-Aldrich, Belgium) at a final concentration of 200 mM during the mid log phase ($OD_{600} = 0.6-0.7$) and the cells were collected 4 hours later. Cells were washed twice with 60 mM MES buffer pH 6 (R buffer) and resuspended in 1 mL R buffer with 0.17-0.18 mm glass beads (Sartorius Mechatronics, Belgium). Lysis was performed by homogenizing the cells 2 times 1 min at 6.5 m/s in a FastPrep-24 (MP, Belgium). The cell extracts were collected by centrifugation at 13,000 x g for 15 min (4°C). Lar activity was assayed by incubating cell extracts with 20 mM D- or L-lactate in R buffer at 35°C during 10 min. The reaction was then stopped by incubating the reaction mixture for 10 min at 90°C. The conversion to L- or D-lactate was measured using the D-lactic acid/L-lactic acid UV test (R-Biopharm, Germany). The protocol was adapted to 100 µl reaction volumes in 96-well, half-area microplates (Greiner, Alphen a/d Rijn, the Netherlands). The amounts of total protein in the cell extracts were measured according to the method of Bradford [30], using the Bio-Rad Laboratories (Munich, Germany) protein assay. Lar specific activity is expressed as µmol of D- or L-lactate produced per min per mg of total protein.

The cell suspensions of Lar-induced *L. plantarum* were prepared as previously described [31], with 50 mM of D-, or L-lactate instead of glucose. The suspensions were incubated 1 h at 30°C and the L-, or D-lactate formation was measured as for the Lar specific activity. Lar cellular activity is expressed as mM of lactate produced per hour by cells at an OD_{600} of 1.0.

Gene context analysis and phylogenetic alignment

Genes surrounding *glpF* homologs of *L. plantarum* WCFS1 were retrieved from the NCBI database (release 189) and are listed in supplemental Table S3 (on CD-ROM). MIP protein sequences of all other *Lactobacillales* were retrieved from the NCBI database (release 189) and are listed in supplemental Table S4 (on CD-ROM). They were aligned using ClustalX2 [32] and the phylogenetic tree was constructed with the neighbor-joining method [33]. The tree was visualized using treeGraph2 [34].

RESULTS

***In silico* analysis and cloning of *L. plantarum* MIPs**

The available genomes of *L. plantarum* WCFS1, *L. plantarum* JDM1, and *L. plantarum* subsp. *plantarum* ST-III, were screened for MIP-encoding genes.

Six of them were identified in each of the three *L. plantarum* genomes by gene annotation and homology search. These genes are respectively annotated as *glpF1*, *glpF2*, *glpF3*, *glpF4*, *glpF5* and *glpF6*. The deduced protein sequences are 100% identical between the three different bacterial strains and their length ranged from 216 to 250 amino acids. Using gene specific primers based on genomic data, MIP-encoding ORFs were amplified by PCR from genomic DNA of *L. plantarum* WCFS1 and cloned. Sequencing results showed that the database sequences were in agreement with the cloned sequences. All six *L. plantarum* GlpF (LpGlpF) sequences display typical features of bacterial MIPs (Table S5 and Figure S1).

Table S5. Selectivity filter residues and NPA boxes of *L. plantarum*, *L. sakei* and *P. pentosaceus* MIPs.

Protein name	ar/R selectivity filter				NPA motifs	
	H2	H5	LE ₁	LE ₂	LoopB	LoopE
LpGlpF1	W	G	F	R	NPA	NLA
LpGlpF2	W	G	F	R	NPA	NPA
LpGlpF3	W	G	Y	R	NPA	NPA
LpGlpF4	W	G	F	R	NPA	NLA
LpGlpF5	Y	V	P	R	NPA	NPA
LpGlpF6	F	I	G	R	NPA	NPA
LsGlpF1	W	G	F	R	NPA	NLA
PpGlpF1	W	G	F	R	NPA	NQR

The ar/R filter is defined by one amino acid residue in helix 2 (H2), one in helix 5 (H5), and two in loop E (LE). The amino acid residue corresponding to the MIP-characterizing asparagine-proline-alanine (NPA) motifs in loop B and E are displayed. Amino acid alterations from the classical NPA motifs are shaded in grey. The ar/R region is the narrowest part of the pore and the electro-physicochemical properties of the four amino acids forming this selectivity filter are assumed to determine the pore selectivity of MIPs in general. This selectivity filter is composed of WGFR for EcGlpF. GlpF1 and GlpF2 homologs display the same amino acid residue combination as EcGlpF (this table and supplemental Fig. S1). GlpF3 homologs possess a WGYR ar/R selectivity filter, which is physicochemically very similar to WGFR. The ar/R filter of GlpF5 homologs is constituted by YVPR, which is rather unusual. GlpF6 homologs (this table and supplemental Fig. S1) have F(H/I)XR, with the X residue being a small uncharged residue (e.g. A, G, L or T), which is typical for the water-specific aquaporin family from several organisms [35].

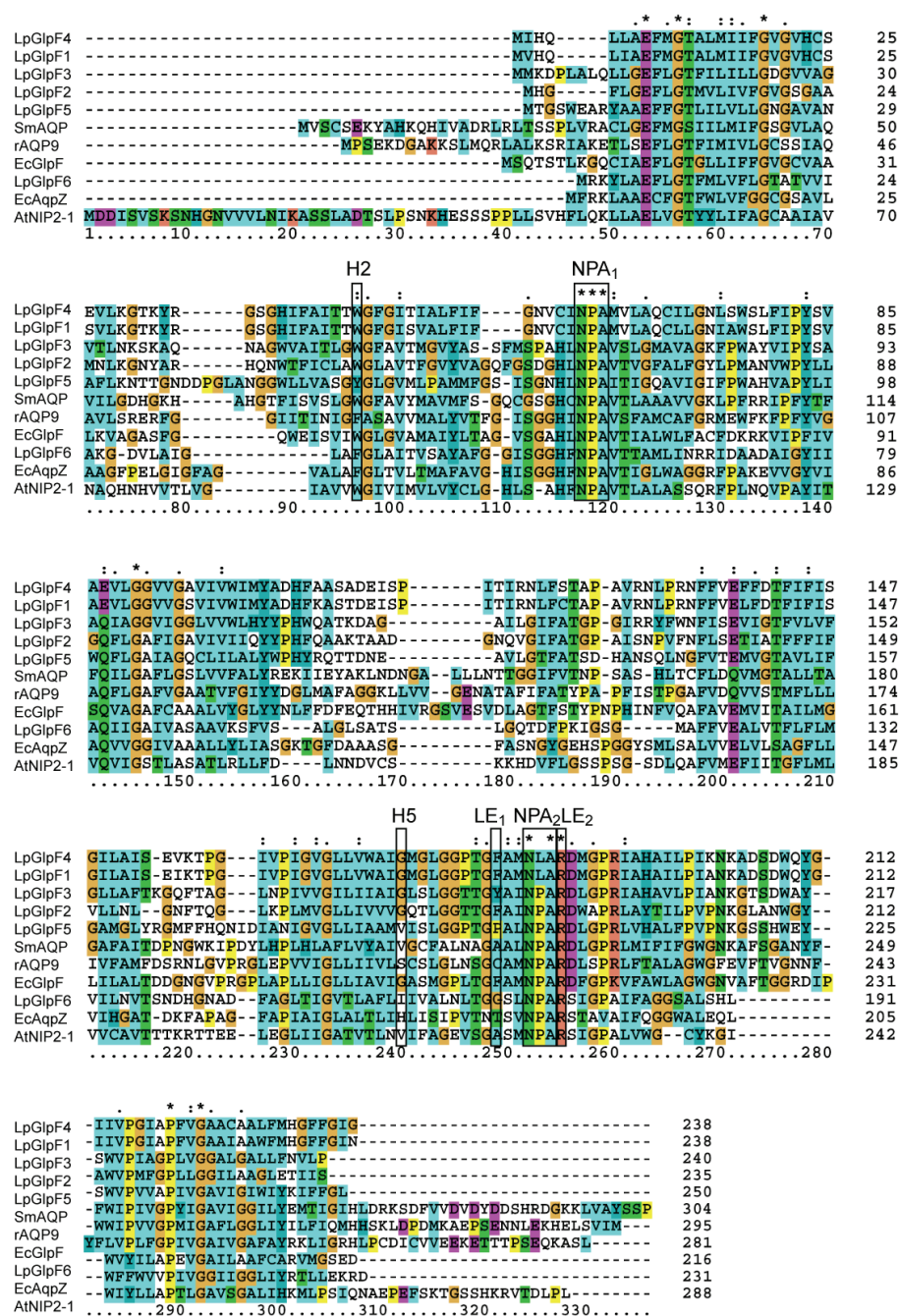


Figure S1. ClustalX2 alignment of the 6 MIPs from *L. plantarum* (LpGlpF1-6), *Schistosoma mansoni* AQP (SmAQP), *Rattus norvegicus* AQP9 (rAQP9), *E. coli* GlpF and AqpZ (EcGlpF and EcAqpZ), and *Arabidopsis thaliana* NIP2-1 (AtNIP2-1). Selectivity ar/R filter residues (H2, H5, LE₁, and LE₂) and NPA motifs (NPA₁ in loop B and NPA₂ in loop E) are boxed (see Table S5 for details).

Phylogenetic and genetic context analysis of *Lactobacillales* MIPs

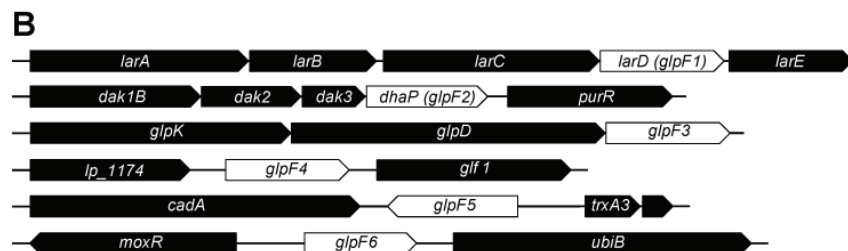
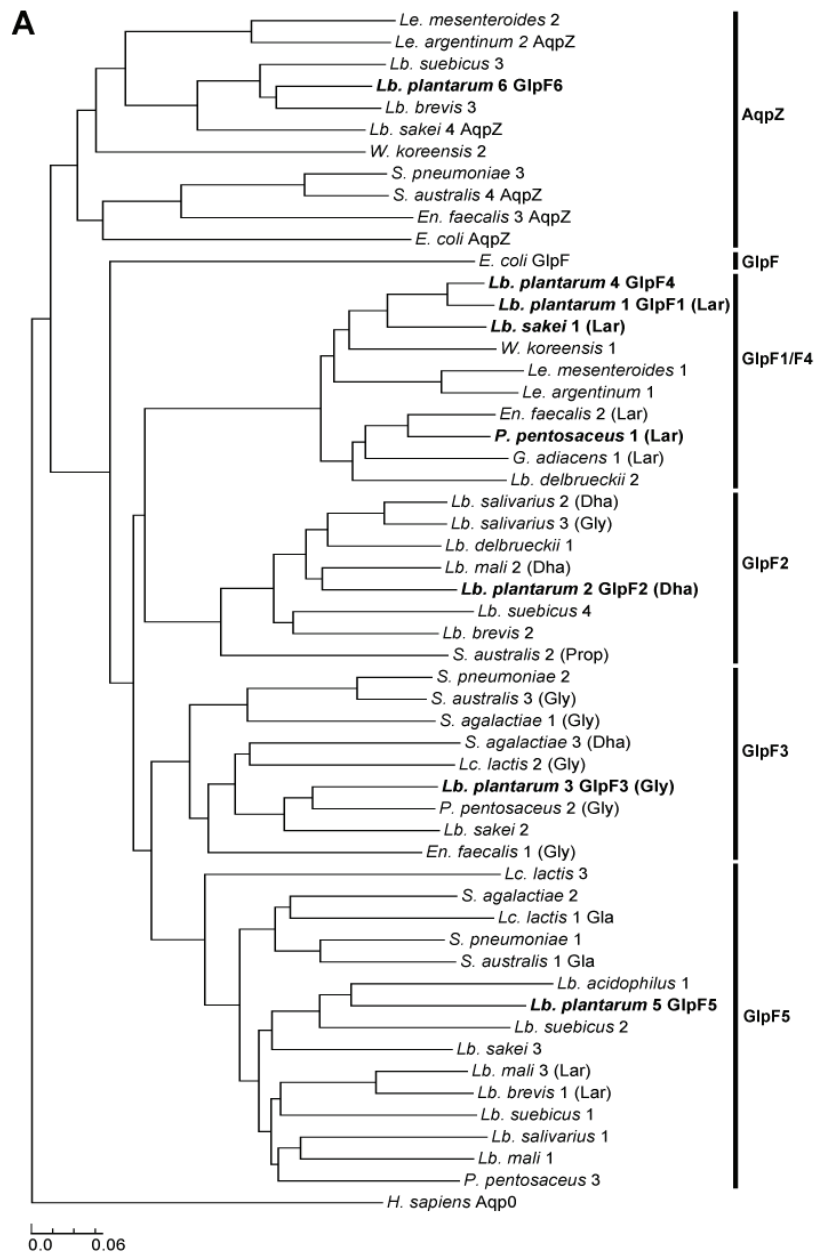
To further predict the role of *glpF* genes from *L. plantarum*, we blasted EcGlpF against *Lactobacillales* genomes. Homologs were retained from 17 species which account for the diversity within this order of Gram-positive bacteria. A total of 49 MIP-encoding genes were found in these species and their number in each species ranged from one to six (supplemental Table S4 on CD-ROM). The encoded proteins were aligned with ClustalX2, together with EcAqpZ, EcGlpF, and the human Aqp0 as outgroup [32]. A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method [33]. Five phylogenetic distinct groups were deduced from this alignment (Figure 1A). In order to infer a potential role to each of these groups and the six *glpF* genes from *L. plantarum*, we looked at their genetic context (Figure 1B). The first group (named AQPZ) is composed of *E. coli* AqpZ, LpGlpF6 and their homologs. No function could be attributed to this group based on their genetic context (supplemental Table S3 on CD-ROM). Due to their homology with EcAqpZ, we hypothesize that this group must be composed of water channels. LpGlpF1 and LpGlpF4 cluster together in the second group (named GlpF1/F4) as expected since their protein sequences are 92% identical. The *glpF1* gene of *L. plantarum* is part of the *lar* operon consisting of *larA*, *larB*, *larC*, *larD* (*glpF1*), and *larE* (Figure 1B). Apart from *glpF1*, all other genes of this operon were shown to be involved in the lactate racemization (Lar) activity of the bacterium [36]. The occurrence of *glpF1* in the *lar* operon indicates a direct role in lactic acid transport [36]. Four out of ten homologs from the GlpF1/F4 group were also found in lactate racemization operons (*lar* operons), suggesting that this group gathers together lactic acid channels or proteins being involved in a transport process contributing to the Lar activity. The third group (named GlpF2) is composed of LpGlpF2 homologs. The *glpF2* gene of *L. plantarum* and several LpGlpF2 homologs are part of an operon composed of *dak1B*, *dak2* and *dak3*, which is similar to the dihydroxyacetone kinase system of *Lc. lactis* [37] (Figure 1B). Since dihydroxyacetone is chemically very similar to glycerol, and other mammalian and protozoan GLPs have been demonstrated to transport this molecule [38], it is likely that LpGlpF2 is a dihydroxyacetone transporter. The fourth group (named GlpF3) is composed of LpGlpF3 homologs. Several of them (including *L. plantarum glpF3*) are assigned to operons composed of *glpK* and *glpD* genes, similar to those responsible for glycerol utilization of *E. coli* [39] (Figure 1B). Hence, we hypothesized that *glpF3* encodes a glycerol transporter. Two exceptions were found in the genetic context of *glpF2* and *glpF3* genes with a reverse

assignment of *L. salivarius* *glpF2* and *S. agalactiae* *glpF3* to glycerol and dihydroxyacetone metabolism, respectively. It seems that the dihydroxyacetone and glycerol channels are functionally very closely related and that the interconversion of one into the other may occur. The fifth group (named GlpF5) is composed of LpGlpF5 homologs and homologs to the aquaglyceroporin of *Lc. lactis*, Gla, which has been shown to transport both water and glycerol [6]. However, two members of this GlpF5 group were also found in *lar* operons, indicating a potential role in lactic acid transport (Figure 1A and supplemental Table S4 on CD-ROM). The *glpF4*, *glpF5*, and *glpF6* genes of *L. plantarum* are not part of any operon and their putative function cannot be deduced from their genetic context (Figure 1B and supplemental Table S3 on CD-ROM).

Figure 1. Phylogenetic analysis and phylogenetic context of *L. plantarum* GlpFs (next page).

A. Phylogenetic tree of 49 MIPs from 17 *Lactobacillales* species, GlpF and AqpZ from *E. coli*, and Aqp0 from *H. sapiens*. MIP number is given after the species name and refers to supplemental Table S4 (on CD-ROM). The relevant genetic context of MIP-encoding genes is given in parentheses; Lar, lactate racemization operon [36]; Dha, dihydroxyacetone utilization operon [37]; Gly, glycerol utilization operon [39]; and Prop, propanediol utilization operon [40]. GlpFs that were functionally investigated in this study are in bold. **B.** Genetic context of each of the six *glpF* genes from *L. plantarum* WCFS1. The *glpF1*-*glpF6* genes are in white, the other genes are in black. For details about gene annotation, see supplemental Table S3 on CD-ROM.

Résultats : l'aquaglycéroporine LarD



Water, glycerol and dihydroxyacetone permeability of *L. plantarum* GlpFs.

The water channel activity of *L. plantarum* GlpFs were determined by heterologous expression in *X. laevis* oocyte and swelling assays in a hypo-osmotic medium. Water-injected oocytes (negative control) or oocytes expressing the respective GlpF isoforms (LpGlpF1 to LpGlpF6) were subjected to a 1:2 diluted Barth buffer solution which resulted in an outward directed osmotic gradient of 100 mOsm. Water-injected oocytes had a low osmotic water permeability coefficient (P_f) due to limited transmembrane water movement whereas cells expressing the positive control rat AQP9 (rAQP9), a well-characterized mammalian GLP protein, had a high P_f [41] (Figure 2A). No significant P_f increase was detected for cells expressing LpGlpF1, LpGlpF5 and LpGlpF6. In contrast, the P_f values of oocytes expressing LpGlpF2, LpGlpF3 and LpGlpF4 were about 4-, 6-, and 7-fold higher, respectively, than those of water-injected oocytes (Figure 2A).

To determine whether the lack of P_f increase in oocytes expressing LpGlpF1, LpGlpF5 and LpGlpF6 was due to a problem of protein expression or trafficking, oocytes were injected with cRNA encoding the GlpFs fused to the yellow fluorescent protein (YFP-LpGlpF1 to YFP-LpGlpF6) and the localization of YFP-tagged proteins was analyzed using confocal microscopy. No specific fluorescent signal was detected in water-injected oocytes, whereas YFP-LpGlpF-expressing cells showed a signal at their periphery indicating a plasma membrane localization (supplemental Figure S2). In contrast to the positive control YFP-ZmPIP2;5, an additional strong internal YFP signal was detected for the *L. plantarum* GlpFs (supplemental Figure S2). These results suggested that all *L. plantarum* isoforms are expressed in oocytes and, at least, partially targeted to the plasma membrane.

The glycerol permeability of the LpGlpF isoforms was measured in an iso-osmotic swelling assay with a 160 mM glycerol inward-directed chemical gradient. In these conditions, glycerol enters the cells due to the chemical concentration difference, resulting in a secondary osmotic gradient and an influx of water. To observe cell swelling, the membrane permeability for water must be sufficiently high. This is the case if the channel of interest is also permeable to water or if the water-impermeable MIP is co-expressed with a water-permeable channel, but impermeable to the solute to be tested [29, 42]. Therefore, oocytes were injected with cRNA encoding the water-permeable LpGlpF2, LpGlpF3 and LpGlpF4 isoforms alone or co-injected with cRNA encoding LpGlpF1, LpGlpF5 or LpGlpF6 and ZmPIP2;5, which

is a water permeable and glycerol impermeable plant aquaporin [43]. Oocytes injected with water or expressing ZmPIP2;5 did not swell during the monitored time period (Figure 2B). In contrast, oocytes expressing LpGlpF2 and LpGlpF4 showed significant volume increases similar to the cells expressing the positive control rAQP9 (Figure 2B). LpGlpF3 expressing oocytes displayed an even higher swelling rate than the controls. Co-expression of LpGlpF1, LpGlpF5 or LpGlpF6 with ZmPIP2;5 did not result in any volume increase (Figure 2B). To verify that co-expression of ZmPIP2;5 with LpGlpFs did not modify its water permeability, the P_f of oocytes expressing ZmPIP2;5 alone or together with LpGlpF1, LpGlpF5 or LpGlpF6 was determined. Oocytes co-expressing the two channels had significant higher P_f than the water-injected ones, similarly to the oocytes expressing ZmPIP2;5 alone (supplemental Figure S3A), demonstrating that the water channel activity of ZmPIP2;5 was not impaired when co-expressed with GlpF proteins and that the lack of detected glycerol permeability was not due to a restrictive water permeability of the oocyte membrane.

The facilitated diffusion of dihydroxyacetone through LpGlpF isoforms was analyzed in an iso-osmotic swelling assay in presence of a 160 mM inward directed chemical gradient. As previously shown [38], rAQP9 is a highly efficient dihydroxyacetone channel. The volume of oocytes expressing LpGlpF2, LpGlpF3 and LpGlpF4 significantly increased after their transfer to the dihydroxyacetone-containing buffer (Figure 2C). Compared to the water-injected cells, the volume of oocytes expressing ZmPIP2;5 alone or co-expressing ZmPIP2;5 with LpGlpF1, LpGlpF5 or LpGlpF6 slightly increased. As this increase was small and also observed for ZmPIP2;5, it could result from an influx of water via the ZmPIP2;5 following the non-facilitated transmembrane diffusion of dihydroxyacetone. The water and dihydroxyacetone permeability measurements (supplemental Figure S3B and Figure 2C) which were performed on the same batches of oocytes, strongly suggest that the volume increase of oocytes expressing LpGlpF2, LpGlpF3 and LpGlpF4 was due to dihydroxyacetone permeability and not to their intrinsic water permeability. Indeed, these three channels possessed much lower P_f values than ZmPIP2;5 expressing oocytes while a much faster volume increase in dihydroxyacetone containing buffer was observed (Figure 2C and supplemental Figure S3B). Together, the swelling assays suggested that LpGlpF2, LpGlpF3 and LpGlpF4 are permeable to water, glycerol and dihydroxyacetone, while no transport could be shown for LpGlpF1, LpGlpF5 and LpGlpF6.

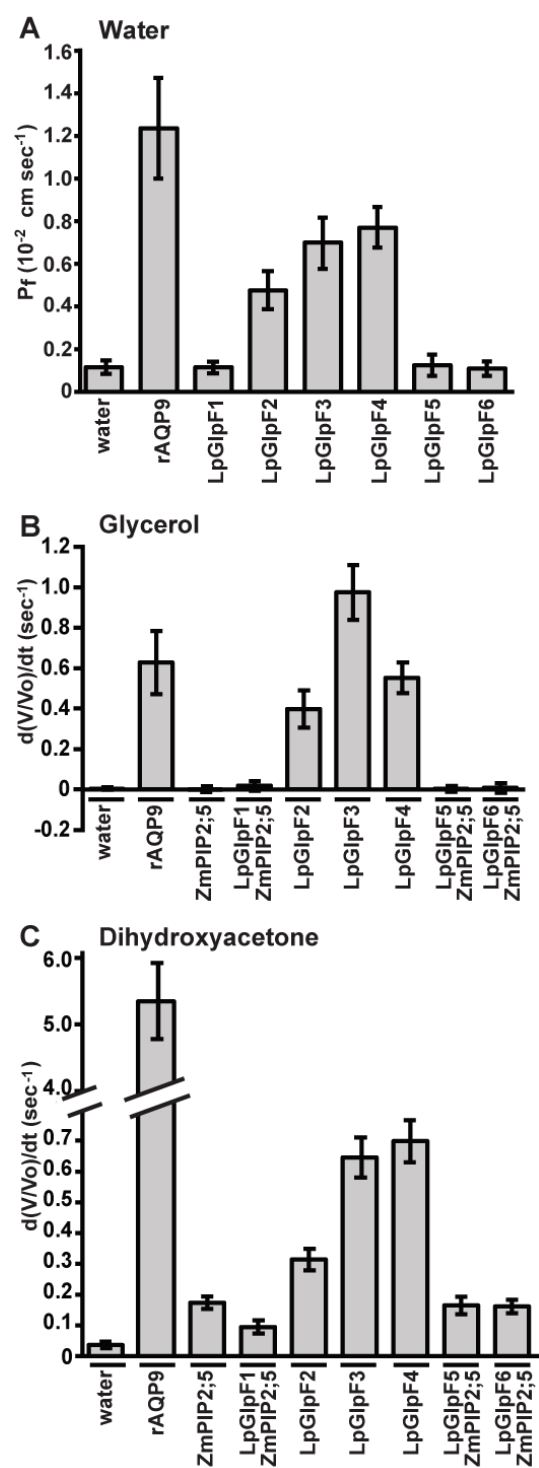


Figure 2. Water, glycerol, and dihydroxyacetone membrane permeability of *X. laevis* oocytes expressing *L. plantarum* glpFs (previous page).

A. Osmotic water permeability coefficients (P_f) for oocytes injected with water (negative control) or cRNA encoding rAQP9 (positive control) or the indicated LpGlpF isoforms. The swelling rates were determined upon immersion in twofold-diluted Barth buffer during 70 sec. **B.** Glycerol permeability of oocytes injected with water or cRNA encoding rAQP9 (positive control), ZmPIP2;5 (negative control), LpGlpF2, LpGlpF3 or LpGlpF4, or co-injected with cRNA encoding ZmPIP2;5 and LpGlpF1, LpGlpF5 or LpGlpF6. The initial swelling rates were determined upon immersion with iso-osmotic Barth solution containing 160 mM of glycerol during 170 sec. **C.** Dihydroxyacetone permeability of oocytes injected with water or cRNA encoding rAQP9 (positive control), ZmPIP2;5 (negative control), LpGlpF2, LpGlpF3 or LpGlpF4, or co-injected with cRNA encoding ZmPIP2;5 and LpGlpF1, LpGlpF5 or LpGlpF6. The initial swelling rates were determined as described in panel B with 160 mM of dihydroxyacetone during 70 sec (35 sec for rAQP9). In all experiments, 25 ng of cRNA for each MIP-encoding gene was used except for ZmPIP2;5 (2 ng). V and V_0 indicate the volume at a given time point and the initial volume, respectively. The data are expressed as the mean of measurements from 11 to 14 oocytes (one representative experiment), 8 to 11 oocytes (one representative experiment), 20 to 33 oocytes (two independent experiments) for water, glycerol, dihydroxyacetone transport assays, respectively. The error bars represent the 95% confidence intervals.

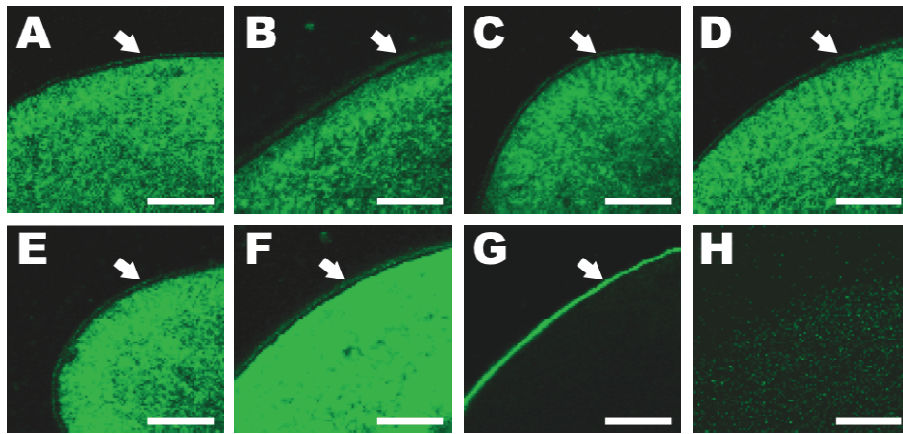


Figure S2. Confocal microscopy analysis of YFP-tagged GlpF proteins produced by *X. laevis* oocytes.

Oocyte were injected with 25 ng cRNA of YPF-LpGlpF1 (**A**), YPF-LpGlpF2 (**B**), YPF-LpGlpF3 (**C**), YPF-LpGlpF4 (**D**), YPF-LpGlpF5 (**E**), YPF-LpGlpF6 (**F**), 4 ng cRNA YPF-ZmPIP2;5 (**G**) or 50 nl water (**H**). Oocytes were fixed and observed 3 days after injection as previously described [28]. Arrows indicate the labelling of the oocyte membrane. Bars=100 μ m.

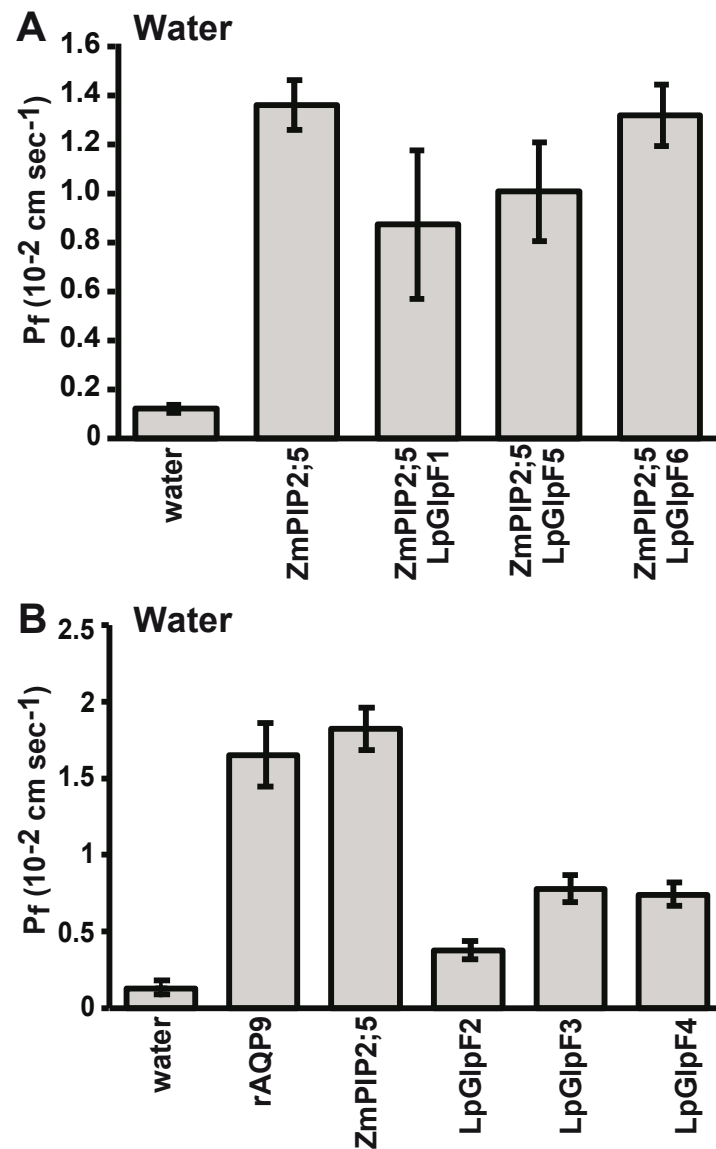


Figure S3. Water permeability of *X. laevis* oocytes expressing *L. plantarum* GlpFs. **A.** Osmotic water permeability coefficients (P_f) for oocytes injected with water (negative control), cRNA encoding ZmPIP2;5, or co-injected with cRNA encoding ZmPIP2;5 and LpGlpF1, ZmPIP2;5 and LpGlpF5, or ZmPIP2;5 and LpGlpF6. The data are expressed as the mean of measurements from 8 to 13 cells. **B.** P_f values of oocytes injected with water (negative control), or cRNA encoding rAQP9, ZmPIP2;5, LpGlpF2, LpGlpF3 or LpGlpF4. In these experiments, 25 ng of cRNA for each MIP-encoding gene was used except for ZmPIP2;5 (2 ng). The data are expressed as the mean of measurements from 6 to 9 cells. The error bars represent the 95% confidence intervals.

Urea and hydrogen peroxide permeability of *L. plantarum* GlpFs

L. plantarum GlpFs were tested for urea permeability in a complementation assay by heterologous expression in the yeast mutant strain YNVW1 ($\Delta dur3$). This strain is deficient for the yeast intrinsic urea transporter DUR3 and grows only on medium supplemented with high concentrations of urea as a sole nitrogen source or with an alternative nitrogen source (i.e. arginine) [44]. The expression of LpGlpF1 and LpGlpF4 rescued yeast growth on medium containing low concentrations of urea (1, 2 or 3 mM) similar to the expression of the positive control, the urea/H⁺ symporter AtDUR3 (Figure 3A). In contrast, none of the other GlpFs from *L. plantarum* were able to facilitate the uptake of urea into yeast cells. This complementation assay suggested that LpGlpF1 and LpGlpF4 facilitate urea diffusion.

Hydrogen peroxide permeability of LpGlpFs was investigated in the same yeast mutant used for the urea complementation assay. Yeast cells expressing LpGlpFs were exposed to different H₂O₂ concentrations in the growth medium and survival was monitored on plates. The expression of LpGlpF1, LpGlpF3 and LpGlpF4 resulted in a complete growth inhibition at 0.8 mM H₂O₂ while yeast cells carrying an empty vector (control) or expressing the urea/H⁺ symporter AtDUR3, LpGlpF5 or LpGlpF6 grew normally. LpGlpF2 showed an intermediate sensitivity towards H₂O₂ and displayed complete growth inhibition at 1.2 mM H₂O₂ (Figure 3B). This toxicity assay suggested that LpGlpF1, LpGlpF3, LpGlpF4 and, possibly, LpGlp2 are permeable to hydrogen peroxide.

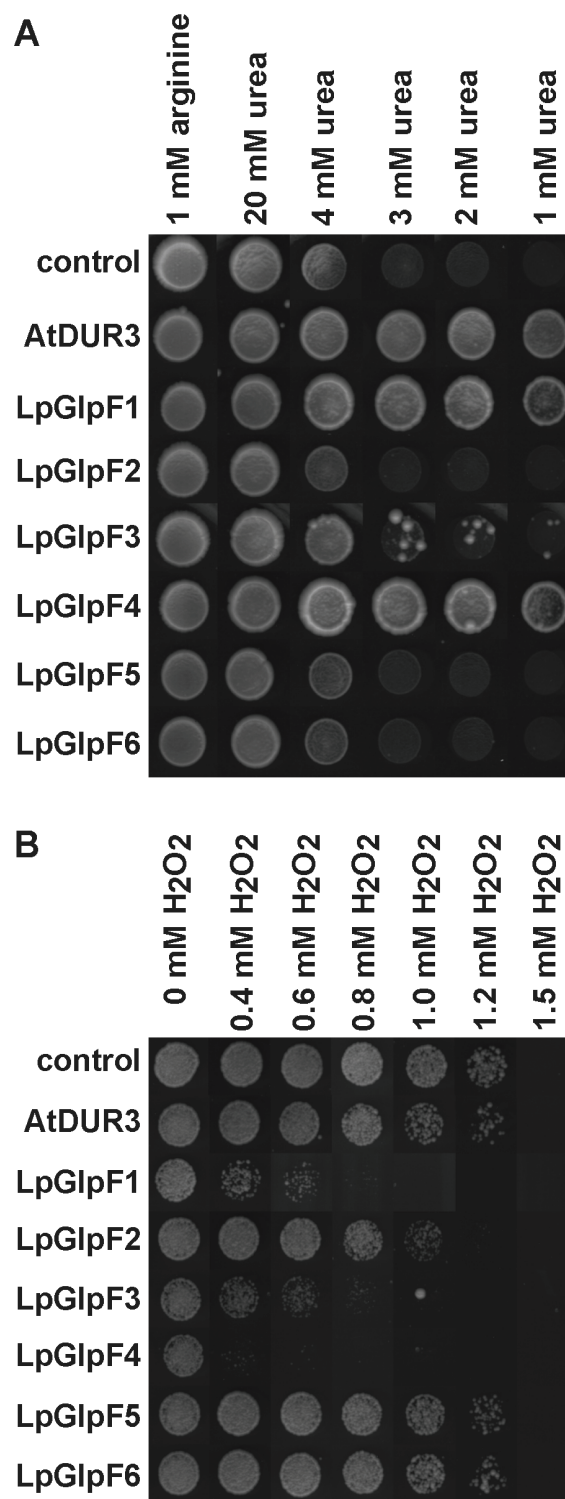


Figure 3. Urea and hydrogen peroxide transport assay in yeast expressing *L. plantarum glpFs* (previous page).

A. Urea transport complementation assay for LpGlpF isoforms. Cultures of YNVW1 ($\Delta dur3$) yeast mutant defective in urea uptake [21] transformed with the empty vector pRS426-pTPIu (negative control), pRS426-pTPIu containing the indicated LpGlpF isoform or AtDUR3 (positive control) were spotted at an OD₆₀₀ of 1, 0.01 and 0.0001 on medium containing various concentrations of urea or arginine as sole nitrogen source. Growth was recorded after 10 days at 28°C. Growth complementation capacity of the different transformants observed at the various spotted dilutions is representatively displayed from the yeast spotted at an OD₆₀₀ of 1. Control indicates the empty vector. **B.** Hydrogen peroxide sensitivity of yeast cells expressing *L. plantarum glpFs*. Cultures of $\Delta dur3$ yeast cells transformed with the empty vector pRS426-pTPIu (control) or pRS426-pTPIu carrying the indicated LpGlpF isoform or AtDUR3 were spotted at an OD₆₀₀ of 1, 0.01 and 0.0001 on medium containing the indicated concentrations of hydrogen peroxide. Growth was recorded after 6 days at 28°C. Growth behavior and survival rate of the different transformants observed at the various spotted dilutions is representatively displayed from the yeasts spotted at an OD₆₀₀ of 0.01. All yeast growth assays were repeated in at least two independent experiments with consistent results.

Lactic acid permeability of *L. plantarum* GlpFs

As *L. plantarum* (i) belongs to the lactic acid producing bacteria, (ii) LpGlpF1 is located in a lactic acid responsive operon and (iii) a few other MIPs facilitate lactic acid diffusion, the lactic acid channel activity of LpGlpFs was investigated in a complementation assay by heterologous expression in the yeast mutant strain ($\Delta jen1$). Disruption of Jen1p in yeast abolishes uptake of lactate into yeast cells [45]. A strain deficient for Jen1p does therefore not grow on medium with low amounts of lactic acid/lactate as a sole carbon source. Only the re-transformation with a transport protein able to transport lactic acid/lactate re-allows the growth of this mutant strain at low levels of lactic acid/lactate. The expression of LpGlpF1 and LpGlpF4 rescued yeast growth on medium containing low concentrations of D/L-lactate (0.1, 0.25 or 0.5%; w/v) (Figure 4A). In contrast, none of the other GlpFs from *L. plantarum* were able to grow under these conditions, while their growth on an alternative carbon source was identical. This complementation assay clearly suggested that LpGlpF1 and LpGlpF4 facilitate lactic acid diffusion.

To further investigate the lactic acid channel activity of LpGlpFs an oocyte iso-osmotic swelling assay, as described above, using a 80 mM sodium D/L-lactate inward-directed chemical gradient was performed. rAQP9 was used as a positive control as it facilitates lactic acid diffusion [46]. Neither the co-expression of LpGlpF1, LpGlpF5 or LpGlpF6 with ZmPIP2;5 nor the

expression of LpGlpF2 and LpGlpF3 alone led to an significant increase in the oocyte volume compared to the water- and *ZmPIP2;5* cRNA-injected cells (Figure 4B, supplemental Figure S4 and data not shown). In contrast, oocytes expressing LpGlpF4 and the positive control rAQP9 showed a 330- and 750-fold faster swelling rate, respectively, indicating that LpGlpF4 is a functional lactic acid channel (Figure 4B and supplemental Figure S4). To confirm these results in an independent experiment, we directly measured [^{14}C]lactic acid/lactate accumulation in oocytes expressing LpGlpF1, LpGlpF4, or rAQP9 as a positive control [46] after different incubation times in 12 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]sodium lactate (Figure 4C). Oocytes expressing LpGlpF4 or rAQP9 accumulated about two fold more lactic acid/lactate than water-injected control oocytes, when incubated for 6 or 12 min with 12 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]sodium lactate, confirming that LpGlpF4 is an efficient lactic acid transporter in the oocyte system. In contrast, expression of LpGlpF1 resulted in lactic acid/lactate uptake similar to the water-injected control oocytes. Taken together, both the iso-osmotic swelling assays and the direct uptake assays led to identical results.

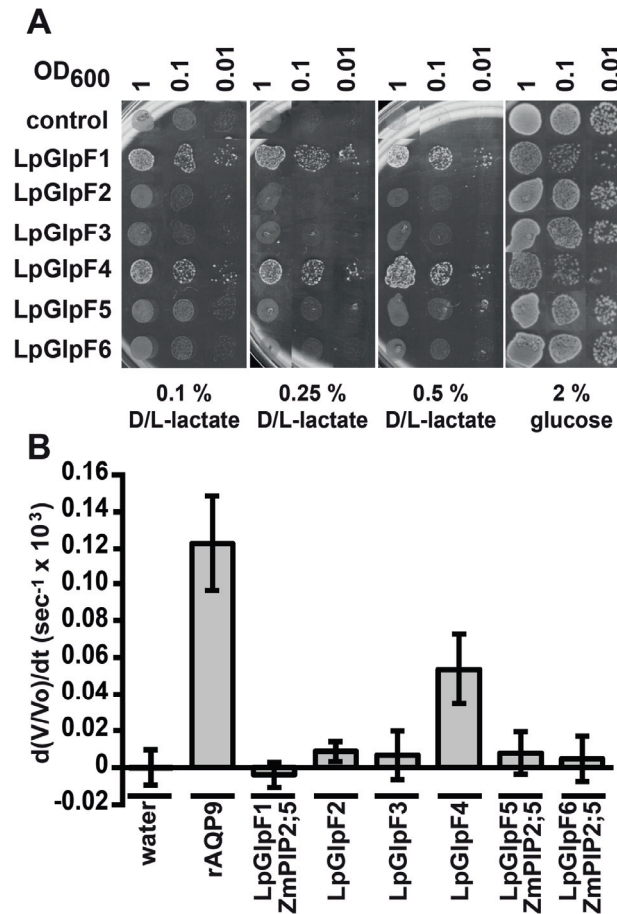


Figure 4. Lactic acid membrane permeability of *X. laevis* oocytes and *S. cerevisiae* cells expressing *L. plantarum glpFs*.

A. Lactic acid transport complementation assay for LpGlpF isoforms. Cultures of $\Delta jen1$ yeast mutants defective in their lactate uptake capacity [45] transformed with the empty vector pRS426-pTPIu (negative control) or pRS426-pTPIu containing the indicated LpGlpF isoforms were spotted at an OD₆₀₀ of 1, 0.1 and 0.01 on medium containing various concentrations of D/L-lactate as sole carbon source. Growth was recorded after 10 days at 28°C. **B.** D/L-lactic acid membrane permeability of oocytes injected with water (negative control) or cRNA encoding rAQP9 (positive control), LpGlpF2, LpGlpF3 or LpGlpF4, or co-injected with cRNA encoding ZmPIP2;5 and LpGlpF1, LpGlpF5 or LpGlpF6. The initial swelling rates were determined upon immersion with iso-osmotic Barth solution containing 80 mM of D/L-lactate during 350 sec. The data are expressed as the mean of measurements from 8 to 12 oocytes (one representative experiment).

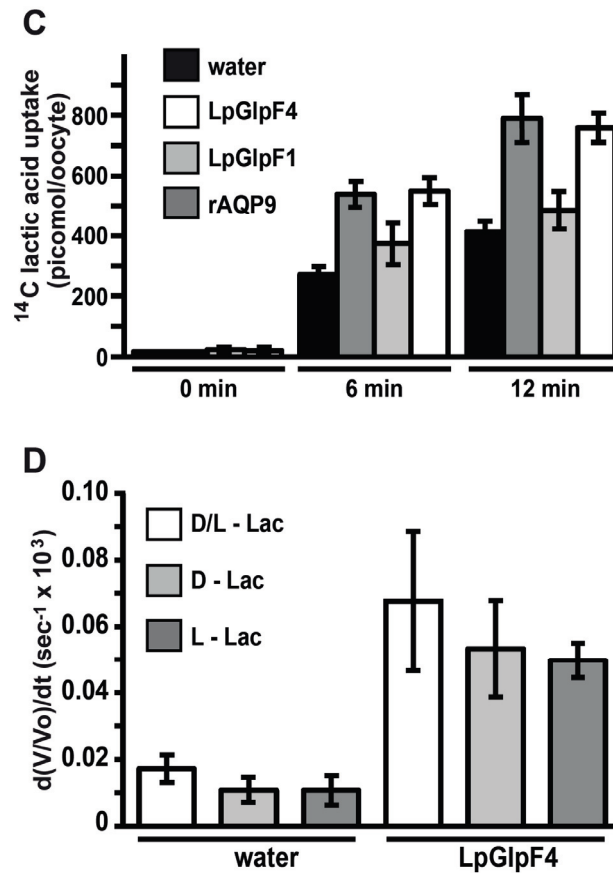


Figure 4. Lactic acid membrane permeability of *X. laevis* oocytes and *S. cerevisiae* cells expressing *L. plantarum glpFs*.

C. Lactic acid uptake into oocytes injected with water or cRNA encoding rAQP9, LpGlpF1 or LpGlpF4. Oocytes were incubated in modified Barth's medium supplemented with 12 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{14}C]-sodium lactate and lactate/lactic acid contents determined as described in the Experimental Procedures. The data are expressed as the means of measurements from 16 to 20 oocytes from one representative experiment. The experiment was repeated three times with similar results. The error bars represent the 95% confidence intervals. **D.** D- or L-lactic acid membrane permeability of oocytes injected with water (negative control) or cRNA coding for LpGlpF4. The initial swelling rates were determined as in panel A with DL-lactic acid (white bars), D-lactic acid (light grey bars) or L-lactic acid (dark grey bars) during 350 sec. The data are expressed as the mean of measurements from 4 (D-/L-lactic acid) or 10 to 12 (D- or L-lactic acid) oocytes. The error bars represent the 95% confidence intervals. V and V_0 indicate the volume at a given time point and the initial volume, respectively.

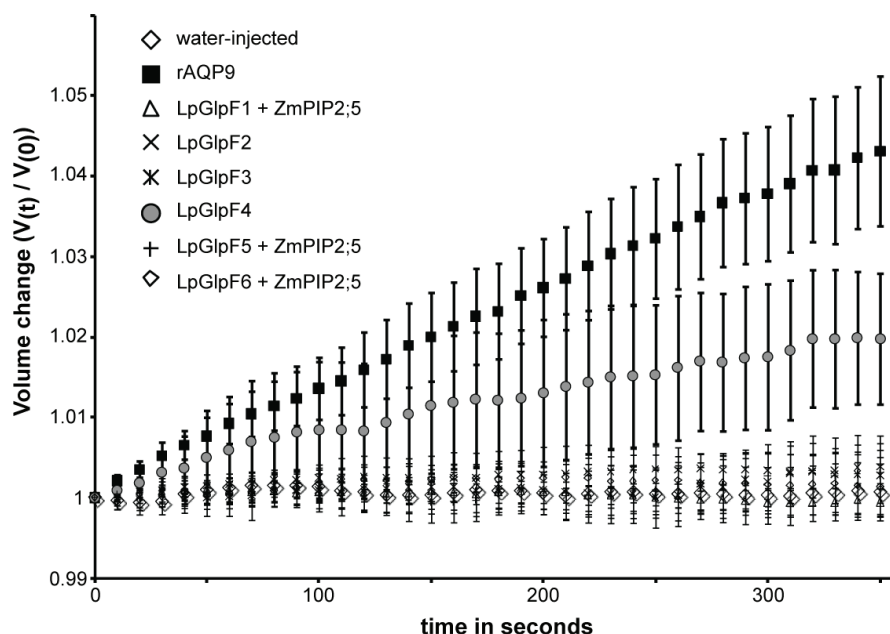


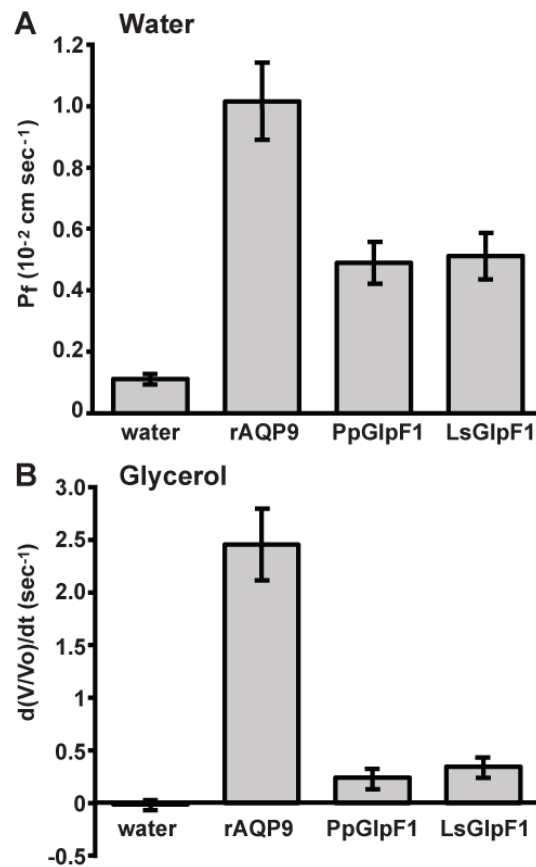
Figure S4. Lactic acid membrane permeability of *X. laevis* oocytes expressing *L. plantarum* glpFs. D/L-lactic acid membrane permeability of oocytes injected with water (negative control) or cRNA encoding rAQP9 (positive control), LpGlpF2, LpGlpF3 or LpGlpF4, or co-injected with cRNA encoding ZmPIP2;5 and LpGlpF1, LpGlpF5 or LpGlpF6. The initial swelling rates were measured upon immersion in an isotonic modified Barth solution containing 80 mM of D/L-lactate during 350 sec and where the osmolarity was adjusted to 200 mOsm/l with NaCl. $V(t)$ indicates the volume at a given time point, and $V(0)$ indicates the initial volume. The data are expressed as the mean of measurements from 8 to 12 oocytes (one representative experiment). The error bars represent the 95% confidence intervals.

Stereoselectivity of LpGlpF4 for lactic acid

E. coli GlpF shows a stereoselective transport capacity for substrates with different chain lengths and chiralities, which do influence the hydrophobic contacts between the transported solute and the channel residues [47]. Lactic acid has the two optical isomers (L and D), which are both synthesized and inter-converted in *L. plantarum* [36]. To test whether LpGlpF4 possess a stereoselectivity for one of the two optical isomers, its channel activity for L-lactic acid, D-lactic acid, and D/L racemic mixture were compared in the oocyte iso-osmotic swelling assay. As shown in Figure 4D, no difference in volume increase of LpGlpF4 expressing oocytes was detected, indicating that both D-and L-lactic acid isomers are similarly channeled by this protein.

Transport selectivity of GlpF1/F4 homologs from *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus sakei*

To investigate the transport selectivity of GLPs from other lactic acid bacteria belonging to the same phylogenetic GlpF1/F4 group as LpGlpF1 and LpGlpF4 and being located in a lactate racemization operon (supplemental Table S4 on CD-ROM), the *glpF1* orthologs of *P. pentosaceus* and *L. sakei* were cloned and the corresponding proteins tested for water, glycerol and lactic acid permeability by heterologous expression in oocytes as described above. As shown in Figure 5, expression of PpGlpF1 and LsGlpF1 induced a significant increase in the oocyte membrane permeability for the tested compounds, demonstrating that GlpF1 orthologs facilitate the diffusion of common solutes and that PpGlpF1 and LsGlpF1 are functional lactic acid channels.



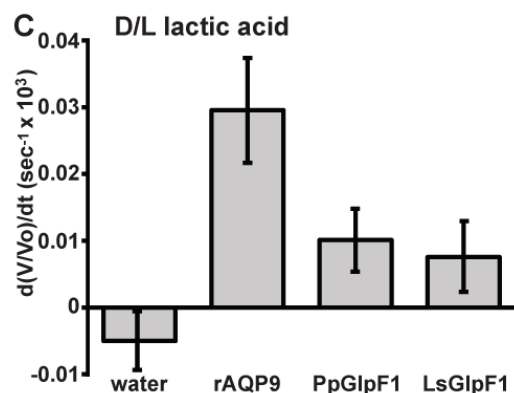


Figure 5. Transport characteristics of *X. laevis* oocytes expressing glpF1 orthologs from *P. pentosaceus* and *L. sakei*.

A. P_f values. **B.** Glycerol permeability. **C.** D/L-lactic acid permeability. Oocytes were injected with water (negative control) or cRNA encoding rAQP9 (positive control), PpGlpF1, LsGlpF1. Injected cRNA amounts and measurements of initial swelling rates are as reported in legends of figures 2 and 4. Mean values are shown and the error bars represent the 95% confidence intervals.

LpGlpF1 and LpGlpF4 transport lactic acid in *L. plantarum* WCFS1

To confirm the lactic acid channel activity of LpGlpF4 in bacterial cells and to exclude a potentially misfolding of LpGlpF1 in the heterologous oocyte system which could prevent its lactic acid channel activity, three marker-free deletion mutant strains ($\Delta glpF1$, $\Delta glpF4$, and $\Delta glpF1 \Delta glpF4$) were generated in *L. plantarum* WCFS1. These mutants were assayed for lactic acid transport by incubating non-growing cells with 50 mM D- or L-lactate and monitoring L- or D-lactate production. This cellular lactate racemization (Lar) activity was standardized to the specific Lar activity measured from cell extracts. Both single mutant strains showed a decrease in their cellular Lar activity compared to the wild type, indicating that their transmembrane lactic acid transport capacity was reduced. The double mutant strain showed an even greater decrease in its cellular Lar activity which corresponds to the additional effect of both simple inactivations (Figure 6A). When the pH of the medium fixed at 6.5 in the above experiments was reduced (pH 5.5) or increased (pH 7.5), the cellular Lar activity of the wild-type and mutant cells was similarly enhanced or reduced, respectively, showing that lactic acid was the transported molecule but not the lactate anion (illustrated for the wild type in Figure 6B). This is in agreement with the assumption that MIPs, with very few exceptions, only facilitate the transport of uncharged solutes. Altogether, these data clearly suggest that both GlpF1 and GlpF4 are transporting lactic acid in *L. plantarum* WCFS1.

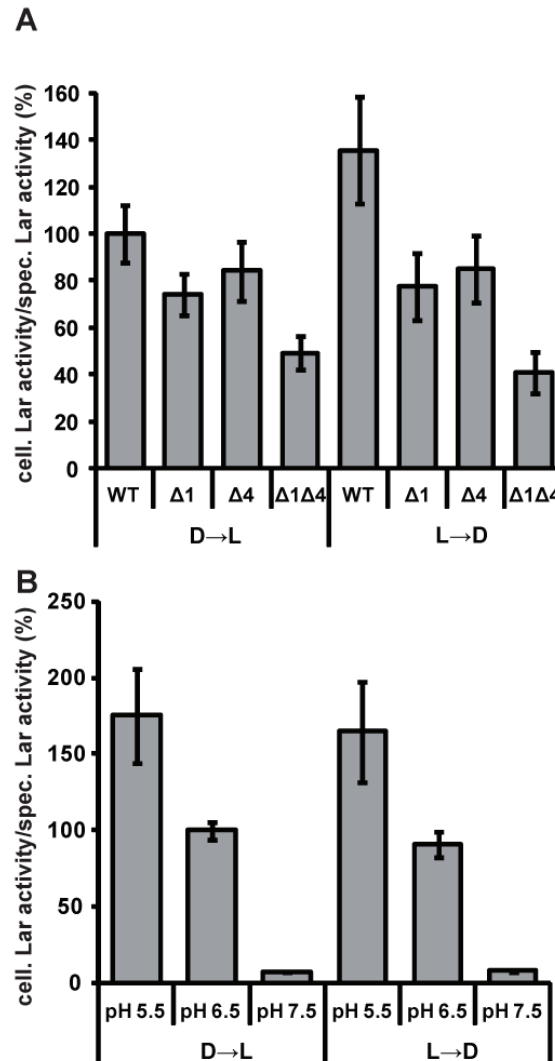


Figure 6. Lactic acid transport assay of *L. plantarum* cells deficient for GlpF1 and/or GlpF4.

A. Bidirectional lactic acid racemization (Lar) assays of cells suspensions of *L. plantarum* WCFS1 (WT), mutant $\Delta glpF1$ ($\Delta 1$), mutant $\Delta glpF4$ ($\Delta 4$), and double mutant $\Delta glpF1 \Delta glpF4$ ($\Delta 1\Delta 4$) at pH 6.5. Ratio between Lar cellular activity and Lar specific activity (%) are presented. The Lar cellular activity was measured from D- to L-lactate (D→L) and from L-to D-lactate (L→D). The ratio was set to 100% for D- to L-lactate conversion with *L. plantarum* WT cells. Mean values of 4 experiments are shown. **B.** Bidirectional Lar assays of cells suspensions of *L. plantarum* WCFS1 (WT) at pH 7.5, pH 6.5 and pH 5.5. The ratio was set to 100% for D- to L-lactate conversion at pH6.5. Mean values of 3 experiments are shown. The error bars represent the 95% confidence intervals.

Physiological importance of lactic acid transport

When *L. plantarum* wild type and the double mutant strain ($\Delta glpF1 \Delta glpF4$) were grown in MRS medium supplemented or not with 200 mM L-lactate, the double mutant showed a growth delay during the exponential growth phase (Figure 7A). This delay was even more marked when the medium was supplemented with 200 mM L-lactate, indicating that the double mutant had an increased sensitivity to mild lactic acid stress (Figure 7A). To determine whether the growth delay affects the fitness of the double mutant compared to the wild type, competition experiments by co-culture (1:1 ratio) were performed (Figure 7B). The strains were grown in MRS medium with or without 200 mM L-lactate and kept in exponential phase during three days. The wild type/mutant ratio was assessed by PCR on isolated colonies. Clearly, the wild type prevailed over the mutant after three days of exponential growth (> 90% of the global population). In mild lactic acid stress conditions, this domination was even more striking since no colony of the mutant strain (96 tested) could be detected after three days (Figure 7B). These data indicate that, despite a slight growth delay, the mutant shows a reduced fitness probably due to its reduced lactate transport capability. They also suggest that the double mutant is even less efficient to excrete its produced lactic acid under lactic acid stress resulting in an even lower fitness in this condition.

Interestingly, the mutant was able to grow at a higher optical density than the wild type (Figure 7A). Lactic acid is known to have an inhibitory effect on growing cells, especially at low pH [48]. Hence, this inhibitory effect would be mitigated in cells showing a limited lactic acid transport, giving the mutant a growth advantage at the end of the exponential phase, when medium acidification becomes inhibitory.

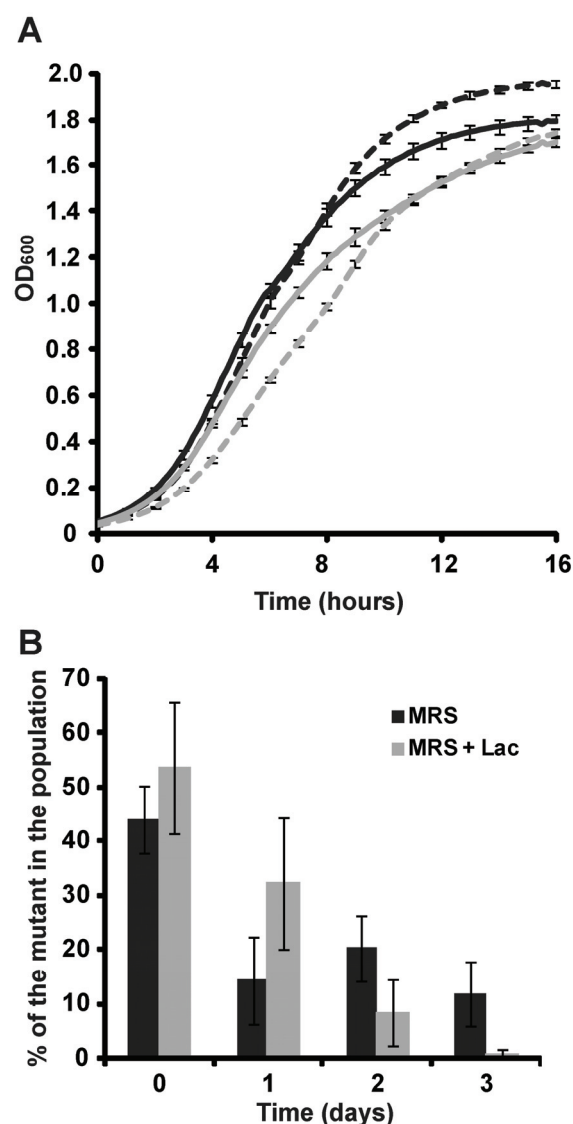


Figure 7. Growth and fitness of *L. plantarum* cells deficient for GlpF1 and GlpF4.

A. Growth curves of *L. plantarum* WCFS1 (WT, plain line) and its isogenic mutant $\Delta glpF1 \Delta glpF4$ (dotted line) in MRS medium (black) and MRS supplemented with 200 mM L-lactate (gray). Mean values of 16 individual cultures are shown. **B.** Competition experiment between WT and the double mutant (initial ratio 1:1) grown in MRS medium (black bars) and MRS supplemented with 200 mM L-lactate (gray bars). Percentage of the double mutant in the whole population was assessed by PCR on 96 individual colonies from 3 independent cultures (32 each). Measures were taken after inoculation (D0) and after 1, 2 and 3 days (D1, D2 and D3). The error bars represent the 95% confidence intervals.

DISCUSSION

MIPs represent a large family of channel proteins that are present in all kingdoms of life. While higher eukaryotes have a high number of MIP isoforms, microorganisms possess either only a few isoforms (e.g. two and four isoforms in *E. coli* and *S. cerevisiae*, respectively) or no MIP at all as it is the case for many bacteria [8]. This was explained by either the missing compartmentalization of membrane-surrounded subcellular organelles and/or the high surface-to-volume ratio, which makes, in theory, channel-mediated membrane diffusion optional. This study identified a number of MIP-encoding genes in the order of *Lactobacillales* which includes all lactic acid bacteria species. Interestingly, six of them are present in *L. plantarum*, a very adaptable and versatile species, which is found in a variety of environmental niches and demands a flexible set of transport selectivity according to growth conditions. This number of MIP-encoding genes was the highest one reported so far for any bacterial strain.

The phylogenetic analysis of 49 MIPs from diverse *Lactobacillales* species, including *L. plantarum*, identified five different MIP groups, each one containing at least one *L. plantarum* isoform, underlining the potential flexibility of this species in solute regulation. The analysis of the genetic context revealed that three MIP-encoding genes are positioned in operons involved in the metabolism of glycerol (LpGlpF3), dihydroxyacetone (LpGlpF2) and lactic acid (LpGlpF1). The transport assays performed in *Xenopus* oocytes, *S. cerevisiae* cells and/or with *L. plantarum* deletion mutants confirmed the substrate predictions based on the genetic context analysis. Although *L. plantarum* GlpFs are mixed-solute channels, LpGlpF2, LpGlpF3, and LpGlpF1 transport at least dihydroxyacetone, glycerol and lactic acid, respectively (see Table 1 for a summary). This study highlights the fact that the genetic context of MIP-encoding genes in bacterial genomes helps to identify their substrates and to elucidate their physiological function. No substrate could be identified for LpGlpF5 and LpGlpF6, even if the homology of LpGlpF6 with EcAqpZ suggested a water channel activity. The GlpF5 group appears more diverse and no clear transport specificity could be assigned to this group, since some members transport glycerol and water [6] and others are found in *lar* operons, suggesting an involvement in lactic acid transport. The absence of a transport activity for LpGlpF1, LpGlpF5 and LpGlpF6 when produced in oocytes is intriguing since they seem to be, at least partly, targeted to the plasma membrane as shown by the use of YFP-

tagged variants (supplemental Figure S2). A possible explanation might be a non-functionality in this heterologous host membrane, as it was reported for other microbial AQPs [49]. Whether this is due to a problem in protein conformation, selectivity or regulation remains to be determined.

To shed light into the mechanisms and structural requirements determining the substrate selectivity in bacterial MIPs we tested the permeability for urea and hydrogen peroxide in the yeast system with the aim to correlate solute specificity to certain compositions of the ar/R selectivity filter and the NPA motif. Similarly to water and glycerol, hydrogen peroxide and urea represent solutes being typically transported by either classic aquaporins or classic aquaglyceroporins, respectively. The best-characterized bacterial aquaglyceroporin EcGlpF is highly permeable to glycerol, but it is only very weakly permeable to urea[50]. Of the lactic acid permeable aqua(glycero)porins, rAQP9 is permeable to urea, while AtNIP2;1 is not [12]. For the tested bacterial aquaglyceroporins urea permeability were co-observed with lactic acid permeability (LpGlpF1 and LpGlpF4) but not with glycerol permeability (LpGlpF4 and LpGlpF3). These data suggest, that aquaglyceroporins which are permeable to urea are also permeable to lactic acid while in aquaporins (AtNIP2;1) such a correlation seems not to exist. These results support the notion that the size and chemical environment of the selectivity filter is important for the passage of urea, glycerol and lactic acid, but that there must be additional restriction sites for the passage of each substrate. A molecular dynamic simulation study by Hub and Groot [51] suggested that the pore environment just next to the NPA filter region (towards the intracellular side) represents a high energetic barrier for e.g. urea permeation. The investigation of the protein sequences of the respective isoforms (Figure S1) did not point towards a certain amino acid compositions being responsible to distinguish between these three solutes. Hydrogen peroxide sensitivity of yeasts expressing LpGlpF isoforms correlated closely with measured water permeability, as expected.

Even though LpGlpF1 appeared to be not functional in oocytes, it was shown to facilitate the passage of lactic acid, urea and hydrogen peroxide across membranes when being heterologously expressed in yeast and to contribute to lactic acid metabolism in *L. plantarum* (Table 1).

Table 1. Summary of substrate permeability of investigated GlpFs from *L. plantarum*, *L. sakei* and *P. pentosaceus*.

GlpF isoforms	Tested substrate and functional assay system					
	Water	Glycerol	Dihydroxy acetone	Lactic acid	Urea	Hydrogen peroxide
LpGlpF1	ND (O)	ND (O)	ND (O)	+ (Y, B)	+ (Y)	+ (Y)
LsGlpF1	+ (O)	+ (O)	NT	+ (O)	NT	NT
PpGlpF1	+ (O)	+ (O)	NT	+ (O)	NT	NT
LpGlpF2	+ (O)	+ (O)	+ (O)	ND (Y, O)	ND (Y)	+/- (Y)
LpGlpF3	+ (O)	+ (O)	+ (O)	ND (Y, O)	ND (Y)	+ (Y)
LpGlpF4	+ (O)	+ (O)	+ (O)	+ (Y, O, B)	+ (Y)	+ (Y)
LpGlpF5	ND (O)	ND (O)	ND (O)	ND (Y, O)	ND (Y)	ND (Y)
LpGlpF6	ND (O)	ND (O)	ND (O)	ND (Y, O)	ND (Y)	ND (Y)

+ indicates transport; +/- indicates possible transport; ND indicates that no transport was detected; NT indicates that the substrate was not tested. The type of assay used in the study is indicated in parentheses; O, uptake assay in oocytes; B, bacterial cell racemization assay; Y, yeast complementation or toxicity growth assays.

We also tried to identify key residues responsible for lactic acid permeability by comparing the sequences of previously described MIPs and the here-characterized bacterial aquaglyceroporins. Three highly conserved residues upstream of the first NPA motif, G64, A65 and H66, are known to interact with the substrate molecules inside the channel of EcGlpF [51]. These residues are much less conserved in the GlpF1-4 group homologues, apart from A65 which is replaced by V in all members of this group. G64 is replaced by G, N, D or E and H66 is replaced by C, S, F or Y in GlpF1-4 group homologues, indicating a minor importance of these residues for the lactic acid selectivity. The proline residue of the second NPA motif is also less conserved in the GlpF1-4 group homologues, being replaced by L or Q. However, such a replacement of proline by other hydrophobic (L, M, V) or polar uncharged (S, T, N, Q) amino acid residues are known from NPA motifs of MIPs from yeast, filamentous fungi, nematodes, frogs and urchins [52, 53]. LpGlpF2, LpGlpF3 and EcGlpF have similar substrate specificity, hence it is expected that their selectivity filter is identical. Conversely, GlpF1-4 homologues on the one hand and EcGlpF or GlpF2-group homologues on the other hand transport different molecules, implying that this difference will be reflected at the level of their ar/R selectivity filter forming residues. However, this is not the case (Figure S1). Therefore, the ar/R selectivity filter forming residues alone cannot be responsible for the

lactic acid selectivity. The residues composing the NPA motifs are also not responsible for the lactic acid permeability, as aquaporin isoforms permeable and non-permeable to lactic acid share either conserved NPA motifs or a variation thereof (Figure S1). It will be interesting to determine, which residues do account for the lactic acid transport of GlpF1-4 homologues. The residue just downstream of the first NPA motif, V71, is replaced by M in all GlpF1-4 homologues and in two GlpF5 homologues found in *lar* operons. This residue may be a hallmark of bacterial lactic acid transporters. However, in rAQP9, AtNIP2;1 and SmAQP this residue is a valine (V). Note worthy is the coincidence that the operon specification name of several *glpF1* homologues, which is “*larD*”, is identical to the abbreviation of important and consecutive amino acid residues around the second “NPA” motif: “LARD” (including the lysine and alanine of the second “NPA” motif, and the arginine of the ar/R selectivity filter as well as the proximate aspartic acid residue).

The existence of a *glpF* gene coding for an aquaglyceroporin transporting lactic acid in *lar* operons of lactic acid bacteria is of particular interest. To the best of our knowledge, no lactic acid channel had been functionally characterized in lactic acid bacteria. So, GlpF1 and GlpF4 isoforms represent the first proteineous system in addition to the intrinsic membrane permeability that contributes to lactic acid transport in these bacteria. In *Xenopus* oocytes, both lactic acid isomers were transported by LpGlpF4 demonstrating that these channels do not favor the transport of one isomer over the other. The deletion of both *glpF1* and *glpF4* in *L. plantarum* WCFS1 demonstrated the involvement of these channels in cellular racemization of lactic acid, justifying the presence of a lactic acid transporter in many *lar* operons from various *Lactobacillales* genomes. However, the positioning of GlpF1 homologs outside of *lar* operons, such as GlpF4 from *L. plantarum*, suggests a more general physiological role for these channels than only in lactic acid racemization. Indeed, the role of GlpF-mediated lactic acid transport seemed to be important during the exponential growth phase, as shown by the competition experiment between the wild type and the double mutant. Growth experiments also suggest that the uptake of lactic acid at the onset of the stationary phase via LpGlpF1 and LpGlpF4 are responsible for an increased sensitivity towards the extracellular undissociated form and provide further evidence that GlpFs function as lactic acid channels. Furthermore, our growth analyses at differing pH values with the different bacterial strains suggested that lactic acid but not the

lactate anion is the channeled molecule. The capacity of MIPs to conduct lactic acid seems to be a conserved and a common feature of GlpF1/F4-subgroup isoforms. This is supported by the fact that PpGlpF1 and LsGlpF1, which are positioned in *lar* operons, shared their substrate specificities with the homologs of *L. plantarum*. The transport capacity of GlpF isoforms belonging to the GlpF1/F4 group might represent the basis of the protein-mediated facilitated diffusion of the undissociated lactic acid molecule which was suggested, since a long time, based on translocation specificity and kinetic analyses in several *Lactobacillales* species [54, 55].

Whether aquaglyceroporins from *L. plantarum* are the only transporters responsible for the regulation of the transmembrane transport of lactic acid remains to be elucidated. The genome of *L. plantarum* encodes a potential lactate permease protein (lp_1814) belonging to the LctP family known as a lactate/H⁺ symporter. The homolog of *E. coli* is involved in the uptake of lactate into the bacteria [56]. A potential interplay between these two types of transporters as well as physiological conditions in which lactic acid transport is of crucial importance has to be elucidated in future studies.

AUTHOR CONTRIBUTION

Gerd Patrick Bienert and Benoît Desguin performed the experimental work.
Gerd Patrick Bienert, Benoit Desguin, François Chaumont and Pascal Hols designed the experiments, analyzed the data, and wrote the paper.

FUNDING

This work was supported by grants from the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS), the Interuniversity Attraction Poles Programme–Belgian Science Policy, and the “Communauté française de Belgique–Actions de Recherches Concertées”. GPB was supported by FNRS and by an Emmy Noether grant 1668/1-1 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft.. BD and PH are respectively Research Fellow and Research Associate at FNRS.

REFERENCES

- 1 Engel, A. and Stahlberg, H. (2002) Aquaglyceroporins: channel proteins with a conserved core, multiple functions, and variable surfaces. *Int. Rev. Cytol.* **215**, 75-104
- 2 Ishibashi, K. (2009) New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 251-262
- 3 Zardoya, R. (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol. Cell.* **97**, 397-414
- 4 Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J. I., Chrispeels, M. J. and Saier, M. H., Jr. (1994) Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 11869-11872
- 5 Calamita, G., Bishai, W. R., Preston, G. M., Guggino, W. B. and Agre, P. (1995) Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 29063-29066
- 6 Froger, A., Rolland, J. P., Bron, P., Lagree, V., Le Caherec, F., Deschamps, S., Hubert, J. F., Pellerin, I., Thomas, D. and Delamarche, C. (2001) Functional characterization of a microbial aquaglyceroporin. *Microbiology.* **147**, 1129-1135
- 7 Rodriguez, M. C., Froger, A., Rolland, J. P., Thomas, D., Aguero, J., Delamarche, C. and Garcia-Lobo, J. M. (2000) A functional water channel protein in the pathogenic bacterium *Brucella abortus*. *Microbiology.* **146 Pt 12**, 3251-3257
- 8 Tanghe, A., Van Dijck, P. and Thevelein, J. M. (2006) Why do microorganisms have aquaporins? *Trends Microbiol.* **14**, 78-85
- 9 Lorca, G. L., Barabote, R. D., Zlotopolski, V., Tran, C., Winnen, B., Hvorup, R. N., Stonestrom, A. J., Nguyen, E., Huang, L. W., Kim, D. S. and Saier, M. H., Jr. (2007) Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768**, 1342-1366
- 10 Faghiri, Z., Camargo, S. M., Huggel, K., Forster, I. C., Ndegwa, D., Verrey, F. and Skelly, P. J. (2010) The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ: the surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter. *PLoS ONE.* **5**, e10451
- 11 Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C. C. and Hediger, M. A. (1999) Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am. J. Physiol.* **277**, F685-696
- 12 Choi, W. G. and Roberts, D. M. (2007) *Arabidopsis* NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *J. Biol. Chem.* **282**, 24209-24218

- 13 Salema, M., Poolman, B., Lolkema, J. S., Dias, M. C. and Konings, W. N. (1994) Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. Eur. J. Biochem. **225**, 289-295
- 14 Tseng, C. P., Tsau, J. L. and Montville, T. J. (1991) Bioenergetic consequences of catabolic shifts by *Lactobacillus plantarum* in response to shifts in environmental oxygen and pH in chemostat cultures. J. Bacteriol. **173**, 4411-4416
- 15 Otto, R., Sonnenberg, A. S., Veldkamp, H. and Konings, W. N. (1980) Generation of an electrochemical proton gradient in *Streptococcus cremoris* by lactate efflux. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **77**, 5502-5506
- 16 Olsen, E. B., Russell, J. B. and Henick-Kling, T. (1991) Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: a basis for energy derivation from malolactic fermentation. J. Bacteriol. **173**, 6199-6206
- 17 Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E. J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P. P. and Konings, W. N. (1991) Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. J. Bacteriol. **173**, 6030-6037
- 18 Marty-Teyssset, C., Posthuma, C., Lolkema, J. S., Schmitt, P., Davies, C. and Konings, W. N. (1996) Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. **178**, 2178-2185
- 19 Konings, W. N. (2006) Microbial transport: adaptations to natural environments. Antonie van Leeuwenhoek. **90**, 325-342
- 20 Pudlik, A. M. and Lolkema, J. S. (2011) Citrate uptake in exchange with intermediates in the citrate metabolic pathway in *Lactococcus lactis* IL1403. J. Bacteriol. **193**, 706-714
- 21 Liu, L. H., Ludewig, U., Frommer, W. B. and von Widen, N. (2003) AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in *Arabidopsis*. Plant Cell. **15**, 790-800
- 22 Bienert, G. P., Moller, A. L., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Moller, I. M., Schjoerring, J. K. and Jahn, T. P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. J. Biol. Chem. **282**, 1183-1192
- 23 Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
- 24 Lambert, J. M., Bongers, R. S. and Kleerebezem, M. (2007) Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. **73**, 1126-1135
- 25 Nour-Eldin, H. H., Hansen, B. G., Norholm, M. H., Jensen, J. K. and Halkier, B. A. (2006) Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. Nucleic Acids Res. **34**, e122

- 26 Nour-Eldin, H. H., Norholm, M. H. and Halkier, B. A. (2006) Screening for plant transporter function by expressing a normalized *Arabidopsis* full-length cDNA library in *Xenopus* oocytes. *Plant methods*. **2**, 17
- 27 Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M. and Chaumont, F. (2004) Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell*. **16**, 215-228
- 28 Bienert, G. P., Cavez, D., Besserer, A., Berny, M. C., Gilis, D., Rومان, M. and Chaumont, F. (2012) A conserved cysteine residue is involved in disulfide bond formation between plant plasma membrane aquaporin monomers. *Biochem. J.* **445**, 101-111
- 29 Carbrey, J. M., Gorelick-Feldman, D. A., Kozono, D., Praetorius, J., Nielsen, S. and Agre, P. (2003) Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2945-2950
- 30 Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- 31 Lorquet, F., Goffin, P., Muscariello, L., Baudry, J. B., Ladero, V., Sacco, M., Kleerebezem, M. and Hols, P. (2004) Characterization and functional analysis of the *poxB* gene, which encodes pyruvate oxidase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **186**, 3749-3759
- 32 Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. **23**, 2947-2948
- 33 Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425
- 34 Stover, B. C. and Muller, K. F. (2010) TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics*. **11**, 7
- 35 Savage, D. F., O'Connell, J. D., 3rd, Miercke, L. J., Finer-Moore, J. and Stroud, R. M. (2010) Structural context shapes the aquaporin selectivity filter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17164-17169
- 36 Goffin, P., Deghorain, M., Mainardi, J. L., Tytgat, I., Champomier-Verges, M. C., Kleerebezem, M. and Hols, P. (2005) Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **187**, 6750-6761
- 37 Zurbriggen, A., Jeckelmann, J. M., Christen, S., Bieniossek, C., Baumann, U. and Erni, B. (2008) X-ray structures of the three *Lactococcus lactis* dihydroxyacetone kinase subunits and of a transient intersubunit complex. *J. Biol. Chem.* **283**, 35789-35796

- 38 Uzcategui, N. L., Szallies, A., Pavlovic-Djuranovic, S., Palmada, M., Figarella, K., Boehmer, C., Lang, F., Beitz, E. and Duszenko, M. (2004) Cloning, heterologous expression, and characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **279**, 42669-42676
- 39 Durnin, G., Clomburg, J., Yeates, Z., Alvarez, P. J., Zygourakis, K., Campbell, P. and Gonzalez, R. (2009) Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 148-161
- 40 Johnson, C. L., Pechonick, E., Park, S. D., Havemann, G. D., Leal, N. A. and Bobik, T. A. (2001) Functional genomic, biochemical, and genetic characterization of the *Salmonella* pduO gene, an ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase gene. *J. Bacteriol.* **183**, 1577-1584
- 41 Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Tanaka, Y., Marumo, F. and Sasaki, S. (1998) Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 268-274
- 42 Hansen, M., Kun, J. F., Schultz, J. E. and Beitz, E. (2002) A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J. Biol. Chem.* **277**, 4874-4882
- 43 Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R. and Chrispeels, M. J. (2000) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.* **122**, 1025-1034
- 44 Liu, L. H., Ludewig, U., Gassert, B., Frommer, W. B. and von Widen, N. (2003) Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**, 1220-1228
- 45 Casal, M., Paiva, S., Andrade, R. P., Gancedo, C. and Leao, C. (1999) The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J. Bacteriol.* **181**, 2620-2623
- 46 Tsukaguchi, H., Shayakul, C., Berger, U. V., Mackenzie, B., Devidas, S., Guggino, W. B., van Hoek, A. N. and Hediger, M. A. (1998) Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J. Biol. Chem.* **273**, 24737-24743
- 47 Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J. and Stroud, R. M. (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*. **290**, 481-486
- 48 Pieterse, B., Leer, R. J., Schuren, F. H. and van der Werf, M. J. (2005) Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology*. **151**, 3881-3894

- 49 Kozono, D., Ding, X., Iwasaki, I., Meng, X., Kamagata, Y., Agre, P. and Kitagawa, Y. (2003) Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin. AqpM from *Methanothermobacter marburgensis*. J. Biol. Chem. **278**, 10649-10656
- 50 Heller, K. B., Lin, E. C. and Wilson, T. H. (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **144**, 274-278
- 51 Hub, J. S. and de Groot, B. L. (2008) Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**, 1198-1203
- 52 Ishibashi, K. (2006) Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. Biochim. Biophys. Acta. **1758**, 989-993
- 53 Pettersson, N., Filipsson, C., Becit, E., Brive, L. and Hohmann, S. (2005) Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. Biol. Cell. **97**, 487-500
- 54 Harold, F. M. and Levin, E. (1974) Lactic acid translocation: terminal step in glycolysis by *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. **117**, 1141-1148
- 55 Gätje, G., Müller, V. and Gottschalk, G. (1991) Lactic acid excretion via carrier-mediated facilitated diffusion in *Lactobacillus helveticus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **34**, 778-782
- 56 Nunez, M. F., Kwon, O., Wilson, T. H., Aguilar, J., Baldoma, L. and Lin, E. C. (2002) Transport of L-Lactate, D-Lactate, and glycolate by the LldP and GlcA membrane carriers of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **290**, 824-829

III.3. Troisième partie : le régulateur LarR

L'activité lactate racémase (Lar) est induite par le L-lactate mais non par un mélange de DL-lactate chez *L. plantarum* (6). Cette régulation n'est possible que si le D-lactate a un effet négatif sur la régulation et le L-lactate un effet positif. Deux hypothèses sont envisageables. Soit il y a deux régulateurs impliqués, l'un sensible au L-lactate, l'autre sensible au D-lactate, comme cela semble être le cas chez *Sh. Oneidensis* (131). Soit un même régulateur est sensible au ratio L-/D-lactate, via un mécanisme encore inconnu. Chez *Sh. oneidensis*, un régulateur sensible au L-lactate a été découvert, ce qui laisse penser qu'il s'agit d'un mécanisme de régulation à deux régulateurs, même si le deuxième régulateur n'a pas encore été identifié (131). Chez *L. plantarum*, aucun régulateur similaire à celui de *Sh. oneidensis* n'a été identifié. Mais la présence, au sein du locus *lar*, d'un gène codant pour un régulateur de la famille Crp/Fnr, LarR, suggère que la régulation de l'opéron *larA-E* est réalisée par ce régulateur. La délétion de ce régulateur confirma cette hypothèse.

Vu que la région intergénique entre les gènes *larR* et *larA* contient les deux promoteurs de ces gènes, la régulation du locus *lar* s'effectue probablement via cette région. Afin de confirmer ceci, nous avons cloné la région intergénique en amont d'un gène rapporteur. Nous avons montré que l'activité du promoteur de *larA* était fortement dépendante du ratio L-/D-lactate, avec l'activité du promoteur maximale en présence de 100% de L-lactate. L'activité lactate racémase est régulée de la même manière, ce qui montre que cette région est bien responsable de la régulation de l'opéron *larA-E* en fonction du ratio L-/D-lactate.

La purification de LarR a ensuite été réalisée par chromatographie d'affinité. Malheureusement, la présence du Streptag semble perturber la reconnaissance du D-lactate et l'inhibition par celui-ci. Par contre, le régulateur reste fonctionnel et répond à l'induction par le L-lactate, ce qui nous a permis d'étudier sa liaison à l'ADN *in vitro*. La liaison de LarR purifiée à l'ADN se réalise via la reconnaissance d'un motif palindromique de 16 paires de bases, la Lar-box, qui est typique des motifs reconnus par les régulateurs du groupe PrfA. Nous avons montré que la liaison de LarR à l'ADN était favorisée en présence de L-lactate, ce qui suggère que le L-lactate soit un effecteur de LarR.

Mais LarR ne semble pas se fixer uniquement à la Lar-box, en effet des sites de liaison suboptimaux situés proche de la Lar-box favorisent la multimérisation de LarR sur la région intergénique. Nous avons montré que cette multimérisation du côté de *larA* était nécessaire à l'activité du promoteur de *larA*. Nous avons donc émis l'hypothèse que la liaison de LarR à la Lar-box et sa multimérisation sur les sites suboptimaux, favorisées en présence de L-lactate, permettait à LarR de se lier à l'ADN à une distance favorisant son interaction avec l'ARN polymérase, induisant ainsi l'expression du gène *larA*.

Ce système de régulation semble être généralisable aux autres régulateurs LarR identifiés dans d'autres bactéries lactiques.

Article bientôt soumis au journal « Journal of Bacteriology ».

Contribution des auteurs de ce travail.

Benoît Desguin : analyse phylogénétique des homologues à LarR. Etude *in vitro* de LarR. Identification des sites suboptimaux de liaison à l'ADN et analyse de ces sites par mutagenèse. Ecriture de l'article.

Eric Viaene : délétion du gène *larR* chez *L. plantarum* et complémentation du mutant. Clonage de la région intergénique *larR-larA* en amont du gène rapporteur *gus*.

Nordine Bakouche et Damien Dandoy : purification de LarR et identification de la Lar-box.

Philippe Goffin : construction des vecteurs de surexpression et de purification. Contribution à l'écriture de l'article.

Aurélie Diman : mise au point du protocole de footprinting à la DNase I et mesures d'activité Gus.

Bernard Hallet et Pascal Hols : superviseurs du travail.

**The transcriptional regulator LarR responds
antagonistically to both lactic acid isomers for the
control of lactate racemization in *Lactobacillus
plantarum***

Benoît Desguin, Nordine Bakouche, Aurélie Diman, Eric Viaene, Damien Dandoy, Bernard Hallet, Phillipe Goffin and Pascal Hols

Biochimie et Génétique Moléculaire Bactérienne, Institut des Sciences de la Vie, Université catholique de Louvain, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

*Running title: LarR controls lactate racemization

To whom correspondence should be addressed: Pascal Hols, Institut des Sciences de la Vie, Université catholique de Louvain, 5 Place Croix du Sud, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium; Tel.: 32-10-478896, Fax: 32-10-473109, E-mail: Pascal.Hols@uclouvain.ac.be

Keywords : transcriptional regulator, lactate racemase, Crp-Fnr family, D-lactate, L-lactate, *Lactobacillus plantarum*

SUMMARY

Lactobacillus plantarum is a lactic acid bacterium that produces a racemic mixture of L- and D- lactate from sugar fermentation. Lactate isomer interconversion is performed by a lactate racemase that is transcriptionally controlled by the L-/D-lactate ratio and maximally induced in the exclusive presence of L-lactate. We previously reported that the lactate racemase (Lar) activity requires the expression of two divergently orientated operons (*larR-O* and *larA-E*). The *larR* gene codes for a novel transcriptional regulator of the Crp-Fnr family (PrfA group) which contains an effector recognition domain only shared by LarR members. Here, we characterized the functional role of LarR in the control of lactate racemization by *in vivo* and *in vitro* experiments. We showed by deletion and complementation experiments that LarR is a positive regulator that is absolutely required for Lar activity. The LarR binding site (Lar-box, 16-bp palindrome) was *in silico*-identified in the *larR-larA* intergenic regions of 20 bacterial genomes. Gel retardation

experiments showed that mutations in the Lar-box strongly affect the binding of purified LarR and completely abolish the *in vivo* activity of the *larA* promoter (P_{larA}). Two suboptimal Lar-boxes (half-sites) located between the Lar-box and the -35 box of P_{larA} were shown to promote the *in vitro* LarR multimerization on DNA, a process stimulated by the presence of L-lactate. In addition, point mutations in these two suboptimal Lar-boxes affected the *in vivo* induction of P_{larA} by L-lactate. A hypothetical mechanism of regulation by the L-/D-lactate ratio based on LarR multimerization is proposed.

Introduction

The members of the Crp-Fnr family are highly versatile regulators which respond to a broad spectrum of intracellular and exogenous signals such as cAMP, anoxia, redox state, oxidative and nitrosative stress, nitric oxide, carbon monoxide, 2-oxoglutarate or temperature. Their functions are multiple such as the control of virulence factors, stress response, enzymes of aromatic ring degradation, nitrogen fixation, photosynthesis, and various types of respiration (1).

Members of the Crp-Fnr family are characterized by the presence of two domains: a C-terminally located helix-turn-helix (HTH) motif which interacts with the major groove of DNA and a N-terminal β -barrel which is responsible for dimerization and integration of the signal (2). DNA binding sites, usually palindromes of 14 to 22 bp, are located at precise positions relative to the transcription start, often near position -41 (1). The integration of the signal occurs either through direct interaction with an allosteric effector or through a prosthetic groups linked to the protein (1).

A gene encoding a transcriptional regulator of the Crp-Fnr family, *larR*, has been discovered in the lactate racemisation (*lar*) locus of *Lactobacillus plantarum*, a homo-fermentative lactic acid bacterium that produces lactate as the main fermentation product (3). The *lar* locus is composed of two divergent operons: the first operon, *larA-E*, contains the genes encoding the lactate racemase, its accessory proteins, and a lactic acid channel, while the second, *larR-O*, encodes an ABC-type nickel transporter Lar(MN)QO and LarR (Fig. 1A) (3). LarR belongs to the PrfA group, which is a branch of the Crp-Fnr family mostly linked to pathogenicity (1). The lead member of the group, PrfA, binds to the 14-bp palindromic sequence TTAACANNTGTAA, the PrfA-box (4). The effector that activates PrfA is

currently unknown but has been proposed to be a host-derived small-molecule second messenger (5). Other members of the PrfA group are the streptococcal regulator of virulence Srv (6), the potential virulence factor Ers of *Enterococcus faecalis* (7), and the acid stress responsive factor RcfB of *Lactococcus lactis* (8). Although the effector of these transcriptional regulators remains unknown, Srv and Ers have been shown to bind DNA *in vitro* without any effector (9, 10). The last member of the PrfA group is the redox regulator of *Bacillus subtilis*, Fnr_{Bac}, which responds to the oxygen tension (11).

The role of LarR in *L. plantarum* is probably not linked to pathogenicity since *L. plantarum* is a bacterium generally recognized as safe. The presence of LarR in the *lar* locus suggests its involvement in the regulation of the lactate racemase (Lar) activity. In *L. plantarum*, the lactate racemase is used as a rescue pathway for the production of D-lactate, which is required for peptidoglycan biosynthesis (12). The Lar activity of *L. plantarum* has been shown to be dependent on the L-lactate/D-lactate ratio: L-lactate induces the Lar activity, while DL-lactate does not, suggesting a repression by D-lactate (12). An analogous situation is found in *Shewanella oneidensis*: LlpR, a member of the LysR family of regulator, positively regulates L-lactate utilization genes in presence of L-lactate but not in presence of DL-lactate (13). To the best of our knowledge, these are the only examples of an antagonist regulation by both isomers of the same molecule. However, the mechanism of this differential regulation has yet to be discovered (12, 13).

Besides LlpR, the other characterized lactate-dependent regulators are the LldR regulators, which are members of the GntR family. LldR of *Escherichia coli* activates the expression of L-lactate utilization genes in presence of either L-lactate or D-lactate (13, 14). LldR of *Pseudomonas aeruginosa* also responds to both lactate isomers but coordinately activates expression of both L- and D-lactate utilization genes (15). LldR in *Corynebacterium glutamicum* is a repressor of L-lactate utilization genes in the absence of L-lactate and is insensitive to D-lactate (16). None of these regulators responds to the L-lactate/D-lactate ratio.

The present study characterizes LarR of *L. plantarum*, a new member of the Crp-Fnr family, which regulates lactate racemization by the L-lactate/D-lactate ratio.

Material and Methods

Bacterial strains and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in the present study are listed in Table 1. Plasmid constructions were performed in *E. coli* TOP10 for pUC18Ery (17) and pSIP409 derivatives (18) and in *Lc. lactis* NZ3900 (19) for pNZ8048 derivatives (20). *E. coli* was grown in Luria Broth (LB) at 37°C with aeration, *Lc. lactis* was grown in M17 medium (Merck, Germany) at 28°C without shaking, and *L. plantarum* was grown in MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) broth (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI) at 28°C without shaking. When appropriate, chloramphenicol and erythromycin were added to the media at 10 µg/mL for *Lc. lactis* and *L. plantarum*; and erythromycin and ampicillin were added at 250 µg/mL for *E. coli*.

General DNA techniques and transformation. General molecular biology techniques were performed according to the instructions given by Sambrook et al (21). Electrotransformation of *E. coli*, *L. plantarum* and *Lc. Lactis* were performed as described by Dower et al. (22), Lambert et al. (23) and McCall and Fierke (24), respectively. PCR amplifications were performed with the Phusion high-fidelity DNA polymerase according to manufacturer's instructions (Finnzymes, Espoo, Finland). The primers used in this study were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium) and are listed in Table S1. Primer extension was performed with primer LP104PE4 as previously described (25).

Plasmid and mutant constructions. The *larR* deletion vector pGIR001 was constructed by cloning the up- and downstream regions of the *larR* gene from *L. plantarum* NCIMB8826 and the *lox66-P₃₂-cat-lox71* cassette from pGIZ850 (26) in pUC18Ery (Table S1). This suicide vector was used to delete *larR* in *L. plantarum* TF101 (27) through a two-steps homologous recombination, as previously described (23). The excision of the *cat* gene was performed by transforming the pNZ5348 harboring the *cre* recombinase, as described (23). Confirmation of the deletion was performed by PCR amplification with primers LP096UP1 and LP105B1 (Table S1). The strain TF101 Δ *larR* was then transformed with pMEC10 in order to integrate *nisRK* genes at the tRNA^{Ser} locus (28), generating strain LR0002.

Table 1, Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Characteristic(s) ^a	Source or reference
Strain		
<i>L. plantarum</i>		
NCIMB8826	wild type	NCIMB ^d
TF101	NCIMB8826 $\Delta ldhL$	(27)
LR0002	NCIMB8826 $\Delta ldhL \Delta larR nisRK$	this study
<i>Lc. lactis</i>		
NZ3900	MG1363 derivative	(19)
<i>E. coli</i>		
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ <i>nupG recA1 araD139 $\Delta(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 \lambda^-$</i>	Invitrogen
Plasmid		
pMEC10	Em ^r Amp ^r , pMC1 derivative for integration of the <i>nisRK</i> genes at tRNA ^{Ser}	(28)
pUC18Ery	Em ^r Amp ^r ; pUC18 derivative with a 1.1-kb insert containing the <i>erm</i> gene	(17)
pGIZ850	Em ^r Amp ^r ; Cm ^r ; pUC18Ery with a 4.215-kb insert containing the <i>loxD</i> gene disrupted by a <i>cat</i> gene under control of the P32 promoter	(26)
pNZ5348	Em ^r ; pGID023 derivative containing <i>cre</i> under the control of the lp ₁₁₄₄ promoter	(23)
pGIR001	Em ^r Amp ^r ; pUC18Ery with a 4.32-kb insert containing the <i>lox66-P32-cat-lox71</i> cassette from pNZ5319 surrounded by the <i>larR</i> upstream and downstream regions	This study
pBADHisA	Amp ^r ; P _{araB}	Invitrogen
pGIR991	Amp ^r ; pBADHisA with a 0.82-kb insert containing the P _{araB} - <i>streptag-larR</i> translational fusion	This study
pNZ8048	Cm ^r P _{nisA}	(20)
pGIR090	Cm ^r ; pNZ8048 derivative with a 0.78-kb insert containing the P _{nisA} - <i>larR</i> translational fusion	This study
pGIR091	Cm ^r ; pNZ8048 derivative with a 0.82-kb insert containing the P _{nisA} - <i>streptag-larR</i> translational fusion	This study
pSIP409	Em ^r ; low-copy number <i>gusA</i> reporter plasmid	(18)
pGIR002	Em ^r ; pSIP409 derivative with the P _{larA} - <i>gusA</i> translational fusion	This study
pGIR003	Em ^r ; pSIP409 derivative with the P _{larR} - <i>gusA</i> translational fusion	This study

pGIR002A	pGIR002 harbouring one point mutation in the Lar-box This study (MutA)
pGIR002B	pGIR002 harbouring one point mutation in the Lar-box This study (MutB)
pGIR002C	pGIR002 harbouring one point mutation in the +5 half site This study (MutC)
pGIR002D	pGIR002 harbouring two point mutations in +5 and +18 half sites (MutD)

^a Em^r, Amp^r, and Cm^r indicate resistance to erythromycin, ampicillin, and chloramphenicol, respectively.

^b NCIMB, The National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Ltd., Aberdeen, Scotland.

Plasmid pGIR090 (P_{nisA} -*larR* fusion) was constructed by cloning the *larR* gene from *L. plantarum* NCIMB8826, which was amplified by PCR with the primers Lp1031 and Lp1032 (Table S1), digested with NcoI and KpnI, and ligated in a similarly digested pNZ8048. The resulting plasmid was transformed in *Lc. lactis* NZ3900. Plasmid pGIR991 (P_{araB} -*streptag-larR* fusion) was constructed by cloning the *larR* gene from *L. plantarum* NCIMB8826 fused to the *streptag* at the N-terminus, which was amplified by PCR with the primers LP103OXA1 and LP103OXB1 (Table S1), digested with NcoI and EcoRI, and ligated in a similarly digested pBADHisA. The resulting plasmid was transformed in *E. coli* TOP10. The plasmid pGIR091 (P_{nisA} -*streptag-larR* fusion) was constructed by the insertion of the *streptag-larR* fusion from pGIR991 between NcoI and HindIII restriction sites of pNZ8048. *E. coli* TOP10 containing plasmid pGIR991 was used for Streptag-LarR purification. Plasmids pGIR090 (P_{nisA} -*larR* fusion) and pGIR091 (P_{nisA} -*streptag-larR* fusion) were electrotransformed in strain LR002 for complementation studies. The plasmids were confirmed by sequencing P_{nisA} -*larR* and P_{nisA} -*streptag-larR* fusions with primer UP_PNZ8048.

Plasmid pSIP409 with *gusA* as reporter gene was used as a backbone for promoter regulation studies. Plasmids pGIR002 (P_{larA} -*gusA* fusion) and pGIR003 (P_{larR} -*gusA* fusion) were constructed by the cloning in both orientations of the *larR-larA* intergenic region from *L. plantarum* NCIMB8826, which was amplified with the primer pairs PSIP103-104A1/PSIP103-104B2 and PSIP104-103A2/PSIP104-103B1 (Table S1), digested with NcoI and BamHI, and ligated in a pSIP409 plasmid digested with NcoI and BglII. The plasmids were then purified from *E. coli* TOP10 and electrotransformed in *L. plantarum* TF101 (*ldhL* mutant, exclusive D-lactate

producer). Mutations of the *larR-larA* intergenic region were performed with the QuickChange protocol on plasmid pGIR002 (29), generating plasmids pGIR002A, pGIR002B, pGIR002C and pGIR002D. The plasmids were confirmed by sequencing P_{larA} -*gusA* fusions with primers CAT1, GUSA2 and GUSB2 (Table S1).

Complementation studies. Cells from a 10 mL culture of *L. plantarum* TF101, *L. plantarum* LR0002 ($\Delta larR$) harboring pNZ8048 (empty vector), *L. plantarum* LR0002 ($\Delta larR$) harboring pGIR090 (P_{nisA} -*larR*) or *L. plantarum* LR0002 ($\Delta larR$) harboring pGIR091 (P_{nisA} -*streptag-larR*) were grown until OD₆₀₀ of 0.5. For *larR* induction, Nisin A (Sigma-Aldrich, Belgium) was added at a final concentration of 50 ng/mL. After one hour of incubation in presence nisin, NaCl (control), L-lactate or DL-lactate (lactate sodium salts, Sigma-Aldrich, Belgium) was added to a final concentration of 200 mM. After four hours of additional incubation, cells were collected by centrifugation at $5,000 \times g$ for 10 min and washed twice with 10 mL of 60 mM Tris-Maleate buffer pH 6.0 (TM buffer) using the same centrifugal conditions.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA). P_{32} -radiolabeled primers were obtained by incubating 0.25 nmol of oligonucleotide with 0.4 nmol of γ - P_{32} ATP and 20 Units of T4 multinucleotide kinase (Roche Diagnostics, Belgium) in $1 \times$ T4 multinucleotide kinase buffer during 1 hour at 37°C. The reaction was stopped by an incubation of 20 min at 70°C and primers were purified from the excess γ - P_{32} ATP with MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare, France). P_{32} -radiolabeled primers used as such were annealed as described by Sambrook et al (21). P_{32} -radiolabeled DNA probes were obtained by PCR amplification using P_{32} -radiolabeled primers and genomic DNA from *L. plantarum* NCIMB8826 as template (Table S1). Mutated *larR-larA* intergenic regions used as probes were obtained by PCR amplification using plasmids pGIR002A, pGIR002B, pGIR002C and pGIR002D as templates (Table S1). The mapping of the different probes on the DNA sequence of the *larR-larA* intergenic region is shown in supplemental Figure S1. PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen, France). Binding reactions were conducted at room temperature for 15 min in TE buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA). Bound products were separated from free DNA on 6% native multiacrylamide gel (40% Acrylamide:Bis-acrylamide 19:1 solution, Bio-

Rad) in 1 × Tris/borate/EDTA (TBE) buffer. Gels were run at 200 V for 2 to 3 hours at 4 °C.

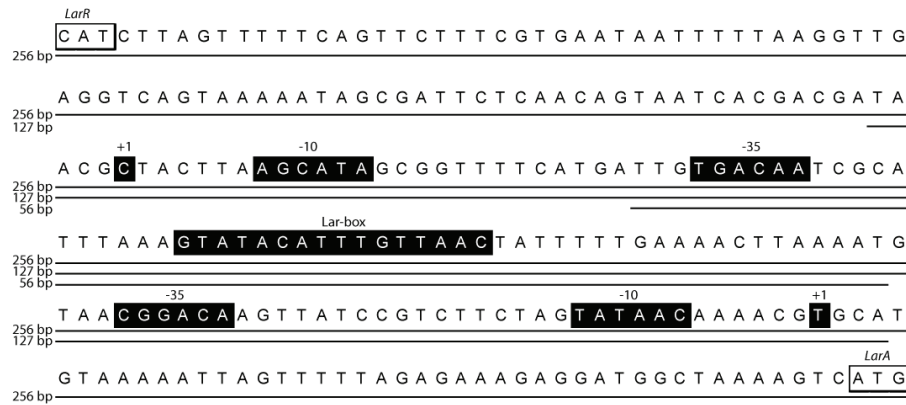


Fig. S1. Sequence of the *L. plantarum* *larR-larA* intergenic region. Putative -35 and -10 boxes, the Lar-box and transcriptional starts (+1) are highlighted in black. The *larR* and *larA* start codons are boxed. The positions of the three P₃₂ radiolabelled probes used in this study are drawn as lines below the sequence. The +1 transcription start of the P_{larA} has been determined by primer extension. The +1 transcription start of P_{larR} has been deduced from the positions of the predicted -10 and -35 boxes.

Footprinting assays. Binding reactions were performed at room temperature for 15 min in 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 25 mM MgCl₂ buffer. Three units of DNase I (Sigma-Aldrich, Belgium) were added and the binding reactions were incubated 5 min at 30°C. To stop the reaction, 1.5 volume of stop buffer (20 mM EDTA, 1% SDS, 200 mM NaCl) was added to the reaction mixture. The DNA was precipitated with ethanol, the pellet was washed several times with 70% ethanol and resuspended in 5 µL loading buffer (80% formamide, urea 5 M, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol). The reactions were heated 10 min at 100°C, loaded on a 6 % denaturing sequence gel containing 5 M urea, and separated at 75 W during 2 hours at room temperature. The first lanes were loaded with Maxam and Gilbert sequencing reactions, prepared from the DNA probe as described by Sambrook et al (21). The gel was revealed with an Imaging Screen-K (Bio-Rad, Belgium) and read on a Pharos FX Plus (Bio-Rad, Belgium).

Lactate racemase specific activity. Cells were resuspended in 0.5 mL TM buffer and lysed with 0.17-0.18 mm glass beads (Sartorius Mechatronics, Belgium) in a FastPrep-24 (MP, Belgium) using 2 runs of 1 min at 6.5 m/sec. After lysis, the supernatant was collected by centrifugation at 13,000 × g at 4°C for 15 min.

The lactate racemase (Lar) activity was assayed by incubating cell extracts 50-fold diluted with 20 mM D- or L-lactate (sodium salts) in 60 mM MES buffer pH 6 at 35°C during 10 min. The reaction was stopped by incubating the mix 10 min at 90°C. The lactate conversion was measured using the D-lactic acid/L-lactic acid UV test (R-Biopharm, Germany). The protocol was adapted to 100 µL reaction volumes. The lactate conversion was monitored in 96-well, half-area microplates (Greiner, Alphen a/d Rijn, the Netherlands) by reading the absorbance at 340 nm with a Varioskan Flash multimode reader (ThermoScientific). The protein concentration was measured with a commercial Bradford protein assay (Bio-Rad, Norway). 1 Unit of lactate racemase (Lar) activity is defined as 1 µmol of lactate converted in 1 min.

β-glucuronidase activity. Cells from 10 mL cultures of *L. plantarum* TF101 carrying pGIR002 (*P_{larA}-gusA*) or pGIR003 (*P_{larR}-gusA*) were grown until OD₆₀₀ of 0.7. Cells were then collected by centrifugation at 5,000 × g for 10 min and resuspended in fresh MRS medium containing 200 mM lactate at different L-/D-lactate ratios. After four hours of additional incubation, the culture was split in two and half of the cells was collected by centrifugation at 5,000 × g for 10 min and washed twice with 10 mL of TM buffer using the same centrifugal conditions. These cells were assayed for their Lar activity, as described above. The other half of the cells was collected by centrifugation at 5,000 × g for 10 min and washed twice with 10 mL of 50 mM P_i buffer pH 7.5 containing 10 mM β-mercaptoethanol (PB buffer) at the same centrifugal conditions. Cells were resuspended in 0.5 mL PB buffer and lysed glass beads as described above. After lysis, the supernatant was collected by centrifugation at 13,000 × g at 4°C for 15 min. The β-glucuronidase (Gus) specific activity was measured by incubation of *L. plantarum* cell extracts 2-fold diluted in Gus buffer (2 mM of p-nitrophenyl-β-D-glucuronide [Sigma-Aldrich, Belgium] in PB buffer) (30). The reaction was monitored by reading the absorbance at 405 nm every 5 min during 50 min with a Varioskan Flash multimode reader. The protein concentration was measured as described above. 1 Unit of β-glucuronidase activity (Gus) activity is defined as 1 µmol of lactate p-nitrophenyl-β-D-glucuronide hydrolyzed in 1 min.

Purification of Streptag-LarR. One liter of *E. coli* TOP10 expressing the *streptag-larR* fusion were induced by adding L-arabinose at a final concentration of 0.2% at the early log phase (OD₆₀₀ = 0.3-0.4). Cells were collected 3 hours later by centrifugation at 5,000 × g for 10 min and washed

twice with wash buffer (150 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, and 1 mM EDTA). Cells were then resuspended in 9 mL wash buffer containing 0.1 mg/mL lysozyme, incubated 30 min at 37°C, and lysed by sonication 6×10 sec, with 50 sec rest between each run, in a Bioruptor (Diagenode, Belgium). Cell extracts were loaded on a Strep-Tactin high affinity column (IBA, Germany) and the purification of Streptag-LarR was performed as described (31).

Bioinformatic analyses. LarR homology searches were performed with BlastP against the non-redundant protein sequence database from NCBI (release 193) using default parameters. A cut-off E-value of 10^{-20} was used in order to only select sequences most similar to LarR of *L. plantarum*. When LarR homologues were found in different strains within one species, only one representative candidate was retained. The alignment was constructed using clustalX2 (32) with LarR homologues, representatives of the PrfA group, and Crp as outgroup. The positioning of the C-terminal and N-terminal domains was based on the PrfA structure (PDB code: 2BEO) (Fig. S2). Alignments of both domains were performed with clustalX2 (32) and phylogenetic trees were drawn using TreeGraph 2 (33) (Fig. S3). Data referring to LarR homologues and their genetic analyses are summarized in Table S2 (on CD-ROM).

For the *in silico* analysis of LarR binding sites, *LarR-larA* intergenic regions were retrieved from the genome sequences of the 20 identified species where *larR* and *larA* genes are adjacent (NCBI database, release 193). Sequences similar to the PrfA box (4) were searched visually and referred to as Lar-boxes (Table S3). The sequences of the 20 identified Lar-boxes were used to define a position weight matrix (PWM) for the LarR binding site (Table S4). First, a position frequency matrix was defined for the 40 Lar-box half-sites (8 bp), based on the assumption that each Lar-box half-site represents one LarR binding site. Therefore, the approach assumed perfect symmetry between the two inverted repeats, and the 20 Lar-boxes represent 40 LarR binding sites. Second, corrected probabilities were calculated using the following formula (34): $p(b, i) = \frac{f_{b,i} + \psi/4}{N + \psi}$, where $f_{b,i}$ represents the counts of base *b* at position *i*, *N* represent the number of sequences (sample size), $p(b,i)$ is the corrected probability of base *b* at position *i*, and ψ is the pseudocount. A pseudocount value of 0.8 was used in all cases, independently of the sample size (35). Third, corrected probabilities were

converted into weights, using the following formula (34): $W_{b,i} = \log_2 \frac{p(b,i)}{p(b)}$, where $W_{b,i}$ represents the weight of base b at position i , $p(b,i)$ is the corrected probability of base b at position i , and $p(b)$ represents the background probability of base b . The background probabilities for the different nucleotides was calculated from the mean genome GC content of the 20 genomes in which the Lar-box sequences were found, which is 42.8 % GC (Table S5).

The theoretical binding affinity of LarR for its binding site was calculated based on the approach used by Hardiman *et al.* (36), with the adaptation described by Fontaine *et al.* (37). A specificity matrix (SpM) was derived from the Lar-box PWM, using the following formula: $a_{b,i} = 2^{W_{b,i}}$, where $a_{b,i}$ represents the specificity coefficient for base b at position i (Table S6). For each position of the *larR-larA* intergenic region sequence, a specificity score was then calculated as the product of the corresponding specificity coefficients at each position of the sequence (36): $\text{score}_k = \prod_{i=1}^n a_{b,i}$, where k represents a putative LarR binding site. All scores were then calculated relative to the consensus Lar-box sequence. The mean LarR theoretical binding affinity for the 20 *larR-larA* intergenic regions was calculated by taking the geometric mean of the 20 LarR theoretical binding affinities at each position.

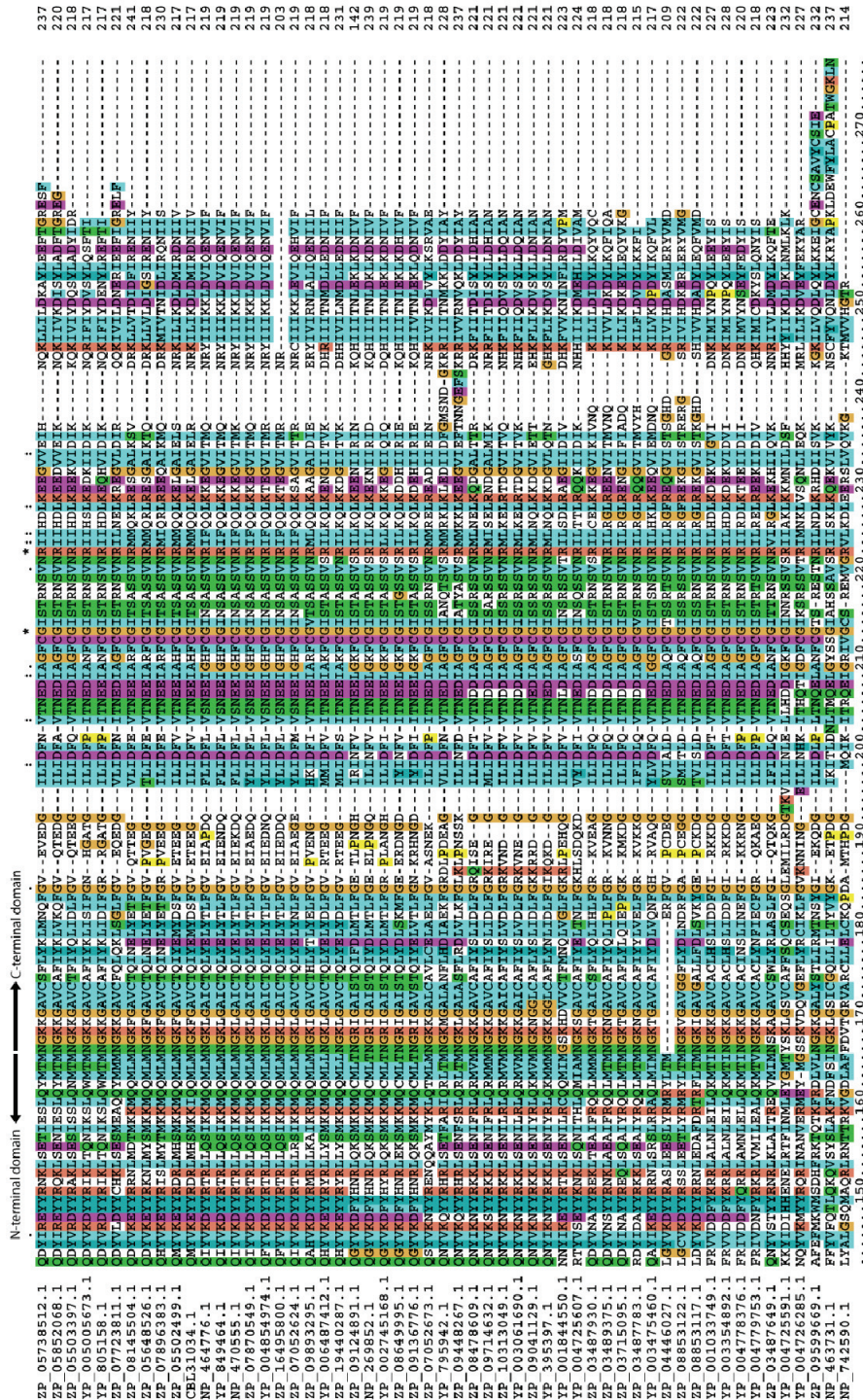


Fig. S2. Alignment of LarR homologs. The arrows show the separation between N-terminal and the C-terminal domains based on PrfA 3D structure.

Table S3. LarR-box sequences.

Species	LarR-box sequences*															
<i>Cl. genomosp.</i>	A	T	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	T	A	G	C
<i>En. faecalis</i>	G	T	T	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	A	C	C
<i>Eu. halii</i>	G	G	T	A	A	C	A	T	T	T	G	A	T	A	A	C
<i>G. adjacens</i>	G	T	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	T	A	C	T
<i>G. elegans</i>	G	T	T	A	A	C	A	T	A	T	G	T	T	A	A	C
<i>L. coryniformis</i>	G	T	A	T	A	C	A	T	T	T	G	T	T	A	A	C
<i>L. fermentum</i>	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	C	A	T	A	C	G
<i>L. brevis</i>	A	T	T	A	A	C	A	T	T	T	G	G	T	A	A	T
<i>L. mali</i>	C	T	T	A	T	C	A	A	T	T	G	G	T	A	A	T
<i>L. pentosus</i>	G	T	A	T	A	C	A	T	T	T	G	T	T	A	A	C
<i>L. plantarum</i>	G	T	A	T	A	C	A	T	T	T	G	T	T	A	A	C
<i>St. vestibularis</i>	A	A	C	A	T	C	A	A	A	T	G	A	T	A	C	T
<i>L. sakei</i>	T	T	G	A	A	C	A	T	T	T	G	T	T	A	A	C
<i>Sp. inulinus</i>	G	G	A	A	A	C	A	T	T	T	G	T	T	A	A	C
<i>Eu. biforme</i>	A	A	C	A	A	C	A	A	A	T	G	T	T	A	A	C
<i>Pe. clausenii</i>	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	T	A	C	A
<i>Pe. pentosaceus</i>	G	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	T	A	T	A
<i>L. curvatus</i>	G	T	T	A	T	C	A	T	T	T	G	T	T	A	C	A
<i>Co. intestinalis</i>	G	T	T	G	A	C	A	T	T	T	G	G	T	A	A	C
<i>Co. tanakaei</i>	T	G	C	A	C	C	A	A	A	T	G	G	T	A	A	C
Consensus	G	T	T	A	A	C	A	T/A	T/A	T	G	T	T	A	A	C

* The most conserved positions are highlighted.

Table S4. Position Weight Matrix (PWM).

	Positions							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.703	0.274	0.36	3.103	2.417	0.017	3.446	1.731
T	0.617	2.074	2.76	0.274	0.531	0.017	0.017	1.731
G	2.657	1.397	0.137	0.137	0.137	0.137	0.023	0.023
C	0.252	0.137	0.366	0.023	0.595	4.489	0.023	0.023

Table S5. GC content of species containing LarR regulators.

Species	%GC
<i>Cl. genomosp.</i>	44.2
<i>En. faecalis</i>	37.4
<i>Eu. halii</i>	38.2
<i>G. adjacens</i>	37.6
<i>G. elegans</i>	33.3
<i>L. coryniformis</i>	42.8
<i>L. fermentum</i>	52.8
<i>L. brevis</i>	46
<i>L. mali</i>	36.2
<i>L. pentosus</i>	44.5
<i>L. plantarum</i>	44.5
<i>St. vestibularis</i>	39.6
<i>L. sakei</i>	41.3
<i>Sp. inulinus</i>	45
<i>Eu. bifforme</i>	33.8
<i>Pe. clausenii</i>	37
<i>L. pentosaceus</i>	37.4
<i>L. curvatus</i>	41.9
<i>Co. intestinalis</i>	62.5
<i>Co. tanakaei</i>	60.2
Mean	42.81

Table S6. Specificity Matrix (SpM)

	Positions							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	-0.51	-1.87	-1.47	1.63	1.27	-5.87	1.78	0.79
T	-0.70	1.05	1.46	-1.87	-0.91	-5.87	-5.87	0.79
G	1.41	0.48	-2.86	-2.86	-2.86	-2.86	-5.45	-5.45
C	-1.99	-2.86	-1.45	-5.45	-0.75	2.17	-5.45	-5.45

Results

LarR is a new member of the PrfA group genetically linked to lactate racemization genes. In *L. plantarum*, the intergenic region between *larR-O* and *larA-E* operons contains both P_{larR} and P_{larA} promoters (Fig. 1A) (3). Since previous transcriptome analyses showed that both operons are induced by L-lactate (3), we hypothesized that the transcriptional regulator LarR present in the *larR-O* operon may be directly involved in this genetic regulation.

In order to evaluate *in silico* whether LarR homologs could be involved in the regulation of *lar* genes in other species, we retrieved the closest LarR homologues and searched the genetic context of their corresponding genes for the presence of *larA* genes. *larA* and *larR* genes were found syntenic in 20 species, mostly belonging to Lactobacillales but also to Clostridiales and Coriobacteriales (Table S2 on CD-ROM). Strikingly, the genetic organization is fully conserved amongst all these species, *larA* and *larR* genes being adjacent and divergently orientated. The subset of these 20 LarR homologues associated to *larA* genes will henceforth be referred to as LarR regulators, since all of them likely participate to the regulation of the *lar* locus of their respective species.

All LarR homologues were then aligned with representatives of the PrfA group and Crp as outgroup (Fig. S2). Since the transcriptional regulators of the Crp-Fnr family are composed of two functionally distinct domains, each LarR homolog was separated in two parts based on the PrfA 3D structure (Fig. S2). Two phylogenetic trees, each tree based on the alignment of one domain, were then constructed with the neighbour-joining method (Fig. S3) (38). From the phylogenetic tree of N-terminal domains, we observe that one subgroup of LarR homologues does not cluster with any known member of the PrfA group (Fig. S3A). This new group is composed almost exclusively of LarR regulators described above as associated to the *lar* locus. Other members of this group belong to species harbouring several LarR homologues, one LarR associated to the *lar* locus and the other(s) possibly arising from gene duplication. Only one member of this group, a LarR homologue from *Weissella Koreensis*, belongs to a species that does not contain any *larA* gene in its genome. The fact that N-terminal parts of LarR regulators cluster independently from other members of the PrfA group

suggests that LarR regulators respond to a different effector molecule than sensed by the other members of the group.

From the phylogenetic tree of the C-terminal domains, we observed three subgroups of LarR regulators. Interestingly, one subgroup clusters with RcfB of *Lc. Lactis* (LarR1/RcfB), which was identified as an acid stress responsive regulator (Fig. S3B). This suggests that the C-terminal domain of some LarR regulators probably recognizes a DNA motif similar to the Acid-box recognized by RcfB. The other LarR subgroups don't cluster with another known member of the PrfA family (LarR2 and LarR3 in Fig. S3B). Altogether, this *in silico* analysis shows that the effector recognition domain of LarR is unique in the PrfA group and that most of LarR homologs are genetically linked to genes involved in lactate racemization.

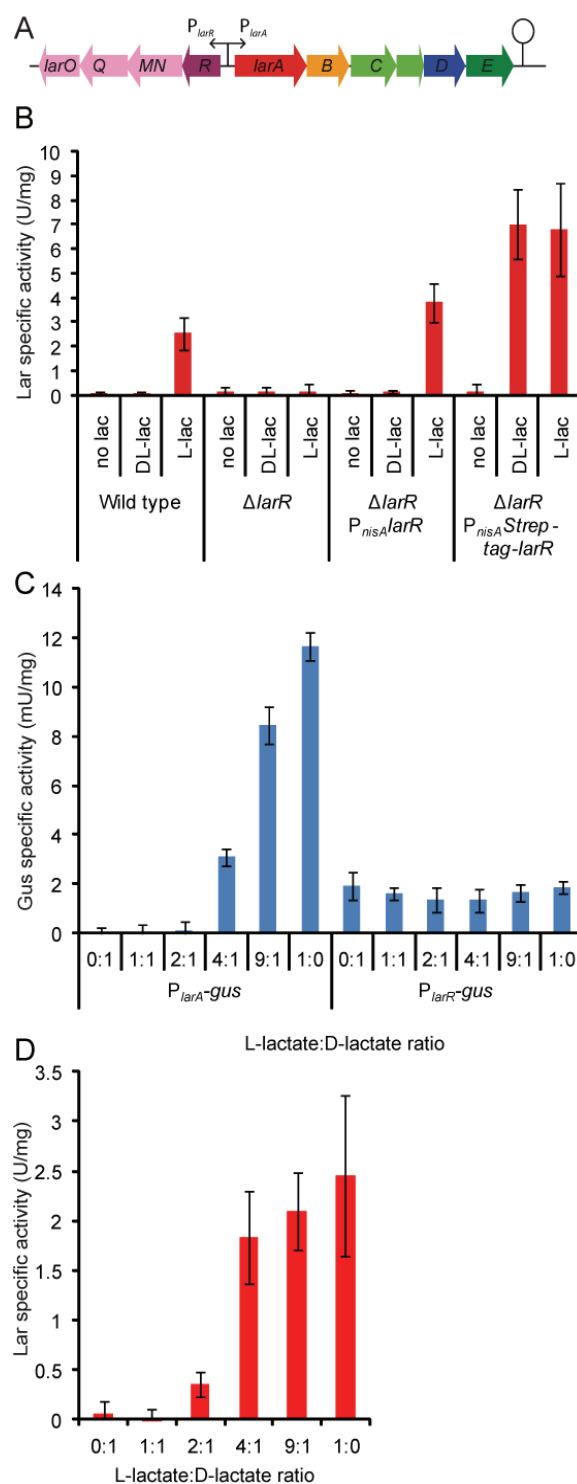
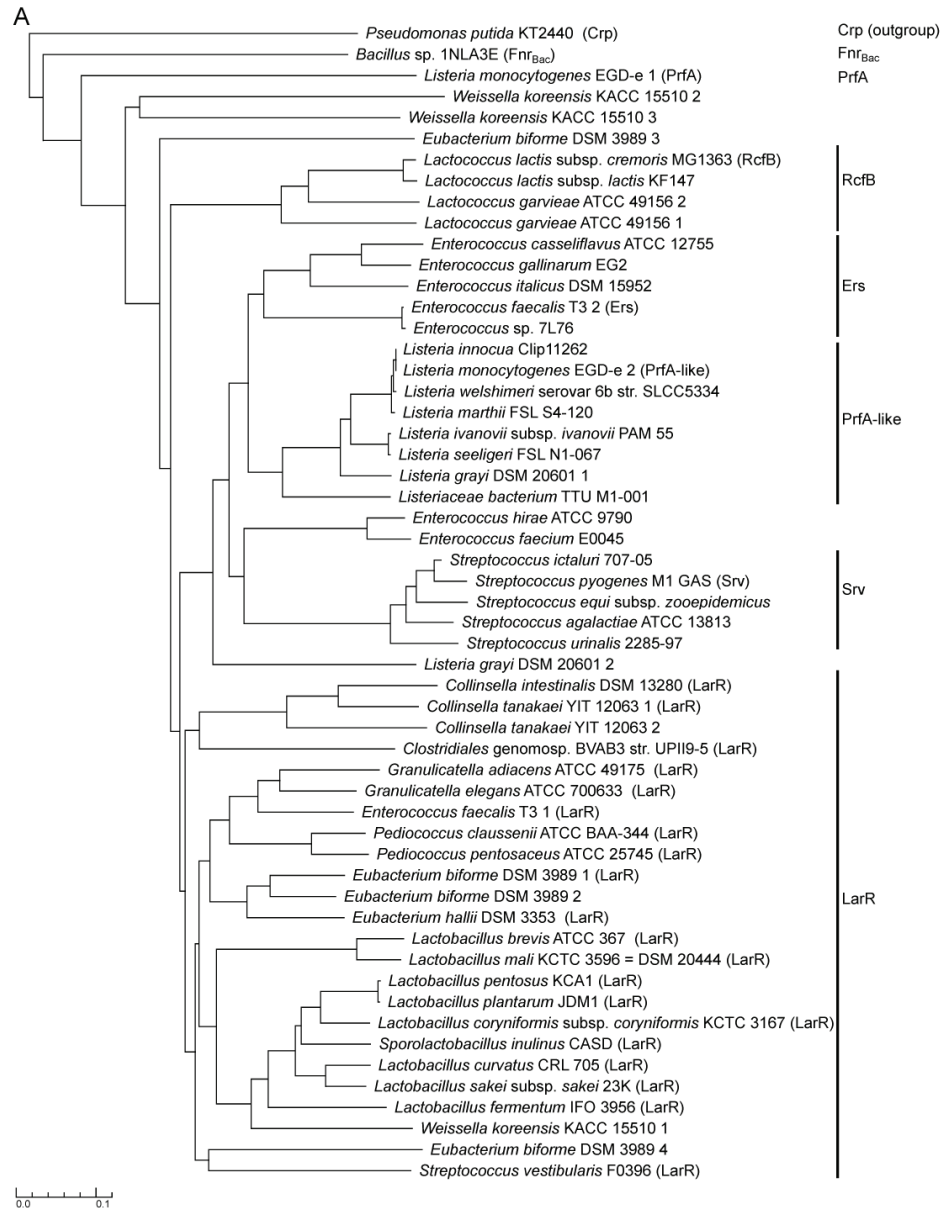


Fig. 1. In vivo LarR regulation. **A**, schematic representation of the *lar* locus of *L. plantarum* which comprises the *larA-E* operon, responsible for the lactate racemization activity, and the *larR-O* operon, coding for LarR and for an ABC-type nickel transporter. **B**, lactate racemase (Lar) specific activity of *L. plantarum* wild type, $\Delta larR$ mutant, and $\Delta larR$ mutant complemented with *larR* or *streptag-larR* under control of the *nisA* promoter. The activity is measured after induction with 200 mM NaCl (no lac), 200 mM Na-DL-lactate (DL-lac) or 200 mM Na-L-lactate (L-lac). **C**, β -glucuronidase (Gus) activity of the *larA* promoter-*gusA* fusion ($P_{larA}-gus$) and of the *larR* promoter-*gusA* fusion ($P_{larR}-gus$). The activity is measured after induction with 200 mM Na-lactate at different L-lactate:D-lactate ratios. **D**, lactate racemase (Lar) specific activity of *L. plantarum* wild type expressing the $P_{larA}-gus$ fusion. The mean value of 3 repetitions are represented, the error bar gives the confidence interval at 95% (Students *t*-test).

Résultats : le régulateur LarR



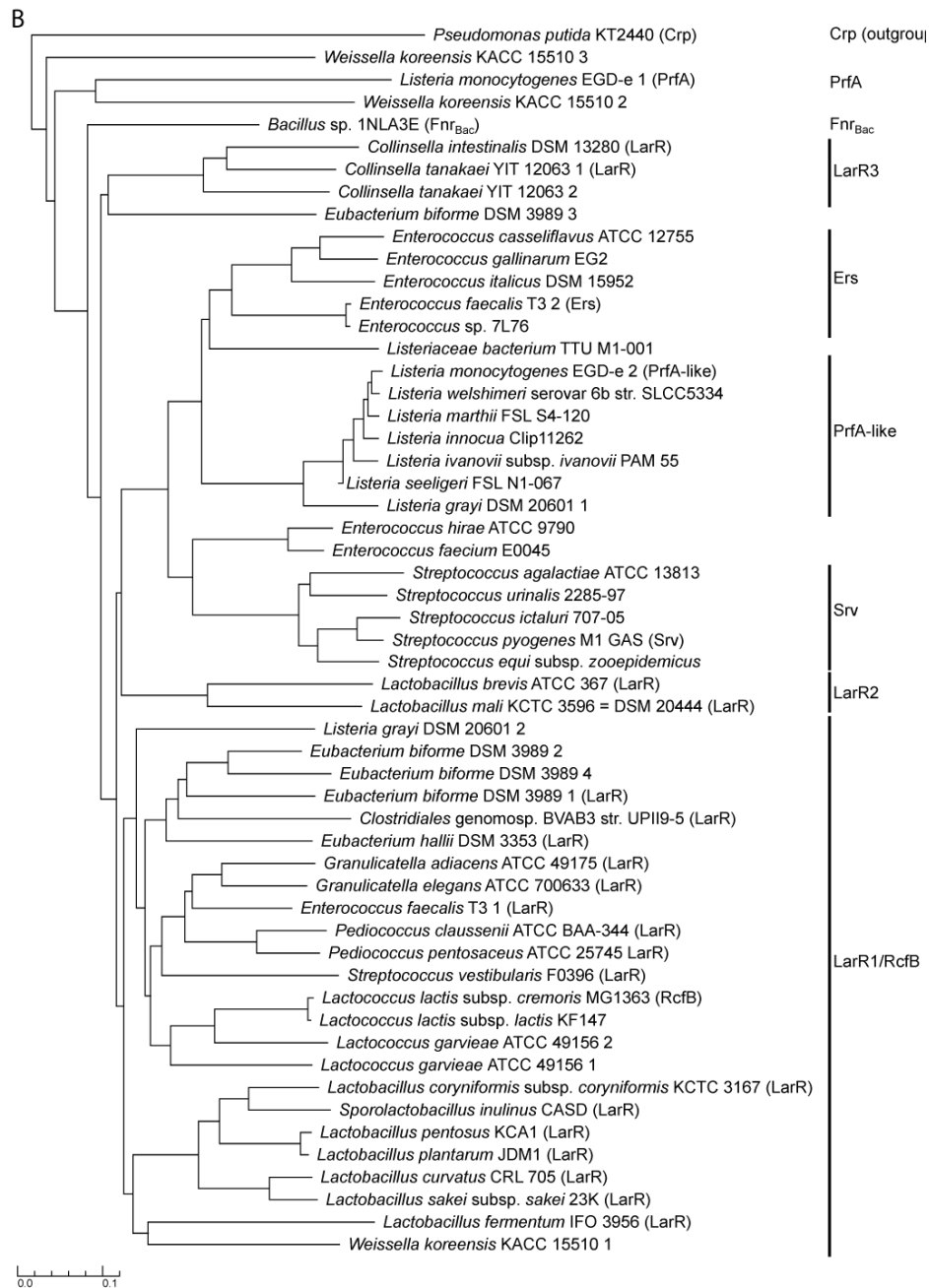


Fig. S3. Phylogenetic tree of N-terminal (A) and C-terminal (B) domains of LarR homologs. Numbers correspond to the several LarR paralogs found in the same species as reported in Table S2 (on CD-ROM). Crp is used as an outgroup. The proteins identified as known members of the PrfA group (PrfA, PrfA-like, RcfB, Srv, Ers and Fnr_{Bac}) or suggested as LarR regulators based on their genetic context (LarR) are indicated between parentheses.

LarR is a positive regulator of the lactate racemase activity in *L. plantarum*. Since the *lar* locus contains all genes necessary for the lactate racemase (Lar) activity (3), its expression could be indirectly monitored by measuring the Lar activity.

To test the relationship between LarR and Lar activity, the deletion of *larR* was achieved in strain TF101 of *L. plantarum*, which lacks the *ldhL* gene and produces only D-lactate (39). This genetic background was selected since it shows a higher Lar activity upon induction with L-lactate (12). Notably, the marker-free deleted strain does not display any Lar activity when induced by L-lactate (Fig. 1B), suggesting that LarR is the positive regulator of the *lar* locus. Since polar effects on the downstream genes *larMNQO* are not excluded and could affect Lar activity, a complementation experiment was performed. The *larR* gene was cloned under control of the *nisA* promoter (P_{nisA} -*larR* fusion) and expressed in the Δ *larR* strain. Complementation in the presence of the nisin inducer and L-lactate restored Lar activity (Fig. 1B), further confirming the role of LarR in the regulation of lactate racemization in *L. plantarum*.

The *larR-larA* intergenic region contains the *cis* elements necessary for *larA-E* regulation. To assess the involvement of the *larR-larA* intergenic region in the regulation of *larA-E* and *larR-O* operons, a β -glucuronidase (Gus) reporter system was used. The *larR-larA* intergenic region of *L. plantarum* was inserted in both orientations upstream of the *gusA* reporter gene and Gus activity was measured in different conditions. Lar activity was measured in parallel as an internal control. If both induction patterns are similar, this will be a strong indication that the *larR-larA* intergenic region is responsible for the regulation of the *lar* locus and that this region contains all necessary *cis* elements for this regulation.

The Gus activity measured from the P_{larA} -*gusA* fusion was strongly dependent on the L-lactate/D-lactate ratio (Fig. 1C). The activity was undetectable (<0.2 mU) when the L-lactate/D-lactate ratio was equal or lower than 1:1. Gus activity is induced at a L-lactate/D-lactate ratio of 4:1 and above with a maximal induction at 100% L-lactate (Fig. 1C). The Lar activity measured in parallel displayed a similar pattern of induction, showing that the *larR-larA* intergenic region contains all *cis* elements necessary for the regulation of the *larA-E* operon (Fig. 1D). This demonstrates that P_{larA} activity is dependent on the L-lactate/D-lactate ratio, strongly suggesting that L-lactate acts as an inducer and D-lactate as a

repressor. Unexpectedly, the Gus activity from the P_{larR} -*gusA* fusion was not regulated by the L-lactate/D-lactate ratio (Fig. 1C) while previous transcriptomic data showed at least an induction of the *larR-O* operon by L-lactate (3). One possible explanation is that P_{larR} regulation is depending on extra-regulatory elements which are not included in the intergenic region. Alternatively, the P_{larR} -*gusA* fusion is carried by a low-copy number plasmid which could affect its regulation compared to the native chromosomal situation.

Importantly, these results show that the *larR-larA* intergenic region contains all the *cis* elements responsible of the control of the *larA-E* operon by L- and D-lactate (Fig. 1C). To the best of our knowledge, this is the first time that the expression of a gene is shown to be oppositely regulated by the two isomers of the same molecule.

The LarR regulator binds to the *larR-larA* intergenic region. To investigate the LarR binding capacity to the *larR-larA* intergenic region, a Streptag-LarR variant (named rLarR, Streptag at N-terminus) was purified to homogeneity by affinity chromatography (Fig. S4A) (31). Purified rLarR contains a major form associated to a minor form of lower electrophoretic mobility (Fig. S4A). Both forms were identified as LarR by MALDI-TOF analysis (Table S7 on CD-ROM), suggesting that the minor form may result from a proteolytic cleavage of rLarR. To assess the impact of the Streptag on LarR activity, the *streptag-larR* fusion was cloned under control of the *nisA* promoter and expressed in the $\Delta larR$ mutant as reported above for the complementation experiments. The *streptag-larR* fusion is able to complement the mutant upon L-lactate induction, as described above for the untagged *larR* gene, but the D-lactate repression effect was lost (Fig. 1B). This may indicate that the Streptag probably impairs D-lactate recognition by LarR without affecting its binding in presence of L-lactate. To examine the rLarR binding capacity, we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with purified rLarR and a radiolabeled PCR product of 256 bp containing the entire *larR-larA* intergenic region of *L. plantarum*. Addition of rLarR in absence of lactate retarded the electrophoretic mobility of the DNA probe, showing that rLarR binding had occurred (Fig. 2A). The specificity of the binding was assessed by a competition experiment where protein-DNA complexes were challenged with specific and non-specific DNA. Results showed that the specific DNA could affect the formation of complexes while unspecific DNA has no impact (Fig S2B). Interestingly,

several resolvable bands of different electrophoretic mobility were gradually detected when the amount of rLarR was increased at a fixed DNA probe concentration (Fig. 2A). These complexes could result from rLarR binding to different sites along the DNA probe or the binding of LarR multimers with different numbers of molecules. Multiple complexes were also observed for Srv, another member of the PrfA family (9).

L-Lactate enhances rLarR binding to the *larR-larA* intergenic region.

Since the regulation of the *larA-E* operon is dependent on the L-lactate/D-lactate ratio and that LarR binds to the *larR-larA* intergenic region, it could be expected that LarR binding to its target site(s) is modulated by the L-lactate/D-lactate ratio. As the Streptag impairs D-lactate recognition by rLarR, (Fig. 1B), only the impact of L-lactate on rLarR binding was tested by gel retardation experiments. These experiments showed that L-lactate (0.2 M) significantly enhanced rLarR binding (~ 2 fold) and the formation of higher molecular weight complexes compared to the control condition (no lactate) (Fig. 2B and C). Although this experiment does not elucidate the mechanism of the lactate isomer-specific regulation, it indicates that L-lactate have a positive effect on the *in vitro* binding of rLarR on the *larR-larA* intergenic region.

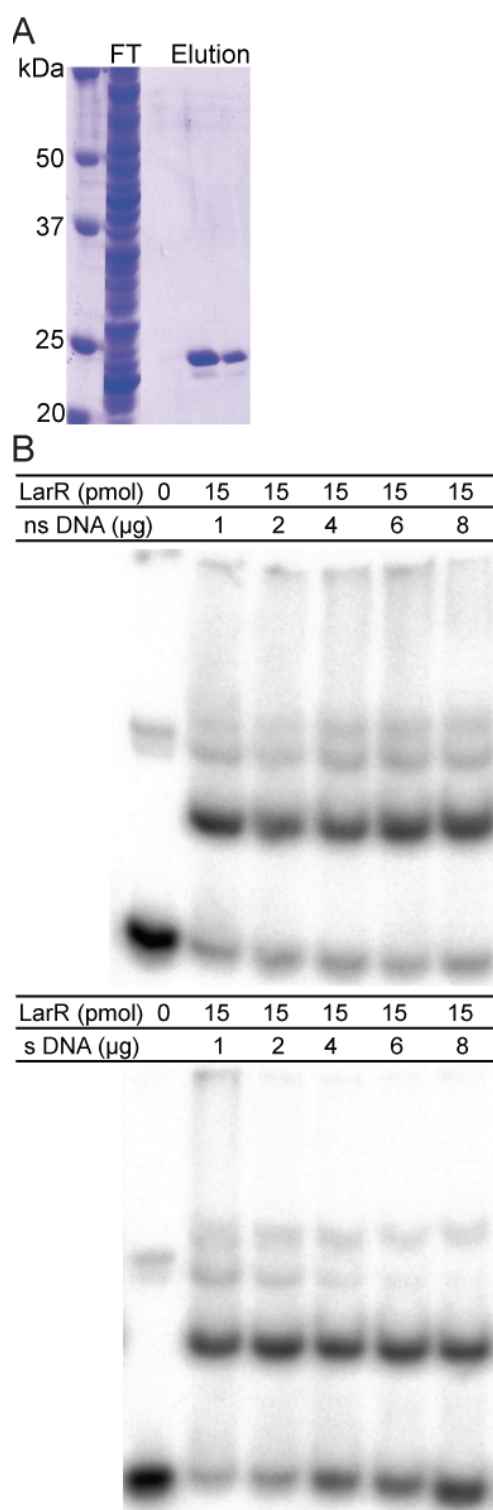


Fig. S4. rLarR purification and specificity of LarR interaction with the *larR-larA* intergenic region. **A**, SDS-PAGE gel of the flow through (FT) and the elution fractions from rLarR purification by affinity chromatography on a Strep-Tactin column. **B**, Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of a 127-bp P_{32} radiolabeled probe of the *larR-larA* intergenic region of *L. plantarum* in presence of purified rLarR and an increasing amount of nonspecific DNA (ns DNA, *larA-larB* intergenic region, 137 bp) or specific DNA corresponding to the same unlabeled probe (s DNA). The arrows indicate the position of a higher molecular weight complex and free DNA, which are decreasing and increasing in presence of specific DNA, respectively.

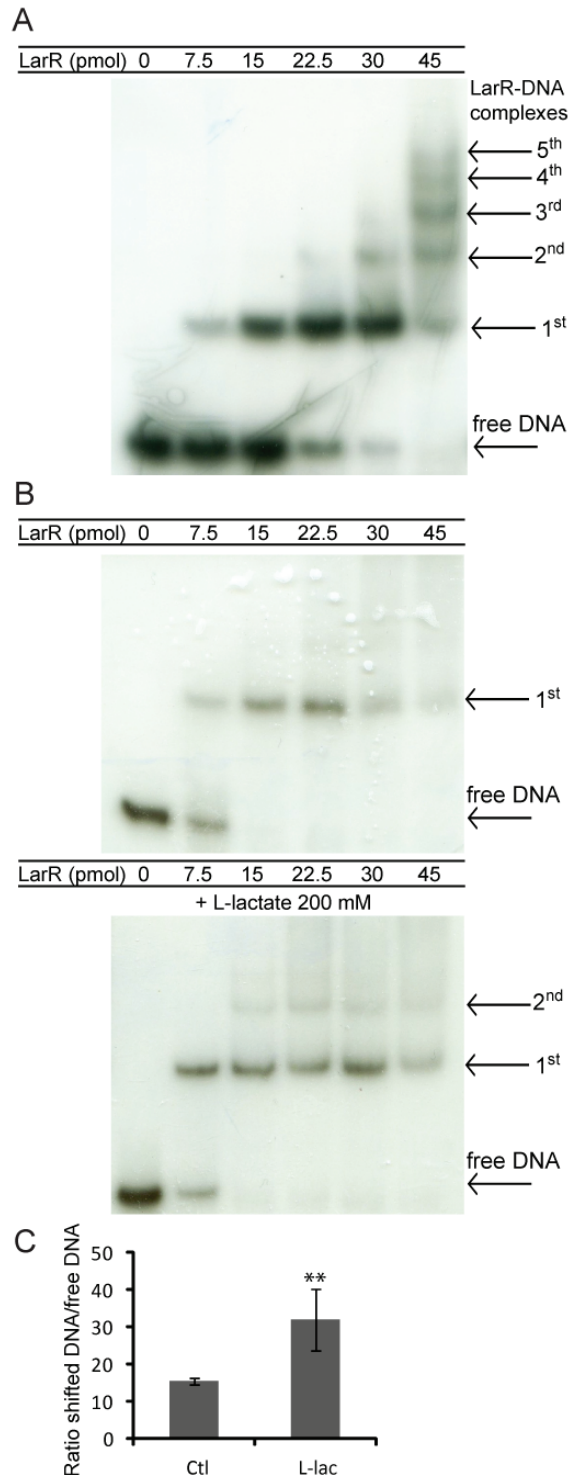


Fig. 2. *In vitro* analysis of LarR. **A**, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of a 256-bp P₃₂ radiolabeled probe of the *larR-larA* intergenic region of *L. plantarum* in presence of an increasing amount of purified rLarR. **B**, EMSA of a 127-bp P₃₂ radiolabeled probe of the *larR-larA* intergenic region of *L. plantarum* in presence of an increasing amount of purified rLarR without or with 200 mM L-lactate. **C**, Mean values of shifted DNA/free DNA ratios (n=4) of EMSA performed as is B without (Ctl) or with L-lactate (L-Lac) in presence of 30 to 120 pmol of rLarR. The error bar represents the standard deviation. Significance based on Student *t*-test; **, p-value < 0.01.

Identification of the LarR binding site. To identify the DNA binding motif of LarR regulators, we retrieved the *larR-larA* intergenic regions from the 20 genome sequences where *larA* and *larR* are associated. These regions revealed the presence of a conserved palindromic sequence of 16 bp (Fig. 3A and Table S3), whose consensus sequence is GTTAACA(T/A)(T/A)TGTTAAC and that we named Lar-box. The consensus sequence of the Lar-box is almost identical to the consensus sequences of the PrfA-box and the Acid-box (Fig. 3A). To investigate the specificity of the Lar-box binding motif, we performed EMSA with radiolabeled probes of 56 bp that contained the Lar-box of *L. plantarum* in which two highly conserved nucleotides (98%; GTATACATTTGTTAAC) and two less conserved nucleotides (55%; GTATACATTGTTAAC) were individually and pairwise mutated. As expected, mutations of the highly conserved nucleotides (named 1a, 1b, and 1ab) reduced rLarR binding to the Lar-box compared to the non-mutated probe (2.5 to 5-fold, Fig. 3B and C). Intriguingly, mutations of the less conserved nucleotides (named 2a, 2b, and 2ab) similarly affected rLarR binding as the mutation of the highly conserved positions (2 to 4-fold, Fig. 3B and C), which may indicate that these less conserved positions are of key importance in the *L. plantarum* Lar-box but possibly less critical in the Lar-box of other species.

To investigate whether the multiple resolvable bands previously observed (Fig. 2A) result from rLarR binding to different sites along the intergenic region, we performed a DNase I footprinting experiment on a radiolabeled PCR product (127 bp) containing the complete intergenic region of *L. plantarum*. When this probe was incubated in presence of rLarR in absence or presence of L-lactate, the Lar-box region was protected but this protection was extended towards regions adjacent to the Lar-box when the rLarR concentration was increased, especially in presence of L-lactate. This protection extended to the predicted -35 boxes of both P_{larR} and P_{larA} (Fig. 4A). The -35 boxes were deduced from sequence analysis (P_{larR}) and +1 transcription start mapping (P_{larA} , data not shown). Some positions exhibited enhanced sensibility to DNase I in presence of rLarR, which indicates the formation of rLarR-induced changes in the local DNA structure (40). One enhancement was observed in the Lar-box motif, which is expected, but other enhancements were also observed at the *larA* side of the intergenic region (Fig. 4A).

Résultats : le régulateur LarR

Together, these *in vitro* experiments show that LarR binding to the *larR-larA* intergenic region is mediated by the presence of the Lar-box motif and suggests an extended binding of LarR by multimerization on adjacent regions of the Lar-box, especially at the *larA* side of the intergenic region.

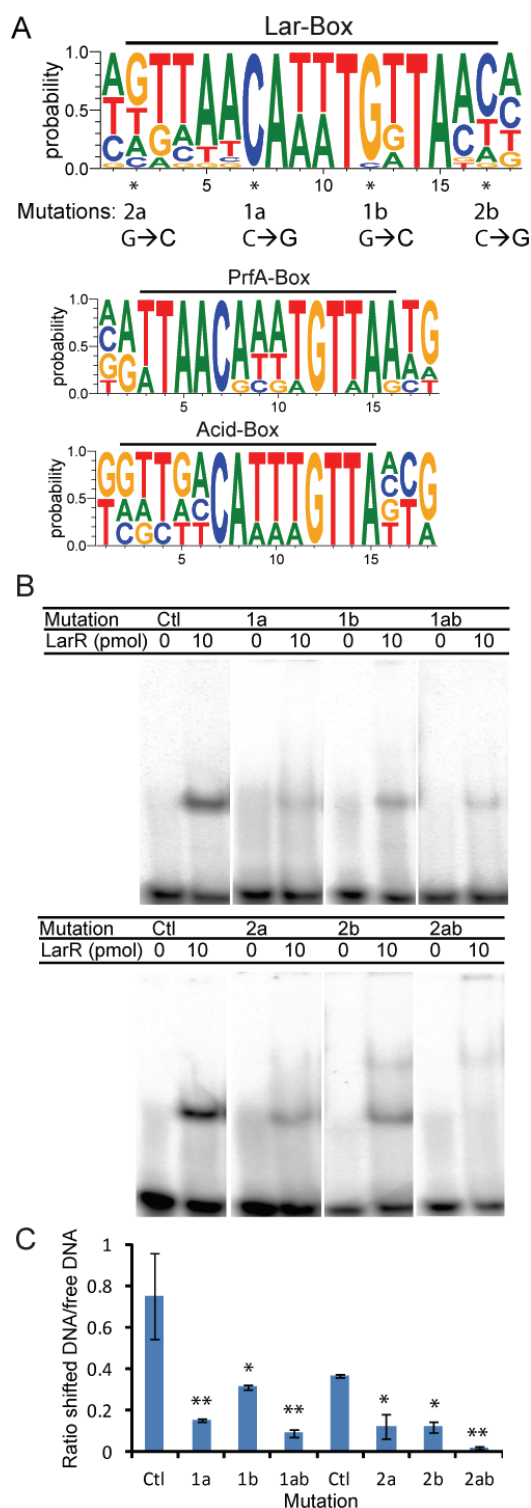


Fig. 3. Lar-box identification.

A, logos of the Lar-box, the PrfA-box, and the Acid-Box drawn with WebLogo 3. The mutations performed in the Lar-Box are indicated underneath the logo. **B**, EMSA of 56-bp P₃₂ radiolabeled probe containing the native Lar-box or mutated Lar-boxes in absence or presence of purified rLarR. Mutations are indicated in A. Ctl, control with native Lar-box. **C**, Mean values of shifted DNA/free DNA ratios (n=4) of EMSA performed as in presence of 7.5 pmol of rLarR. The error bar represents the standard deviation. Significance based on Student *t*-test; * and ** indicate a p-value < 0.5 and < 0.01, respectively, compared to the control.

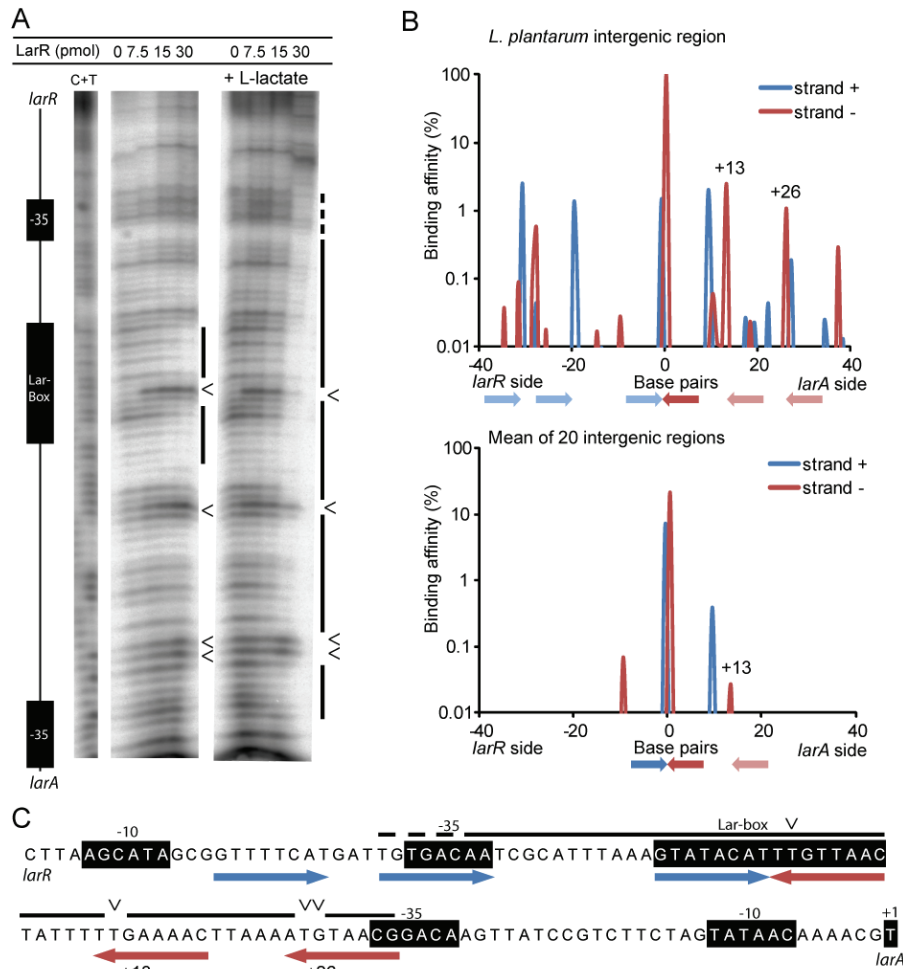


Fig. 4. Suboptimal Lar-boxes identification. **A**, DNase I footprint of a 127-bp P_{32} radiolabeled probe of the *larR-larA* intergenic region of *L. plantarum* with an increasing amount of rLarR without or with 200 mM L-lactate. The C+T bands correspond to the Maxam and Gilbert sequencing reaction. The schematic representation of the *larR-larA* intergenic region is shown on the left. The lines on the right represent the protected regions and the "<" indicate the enhancements. **B**, LarR theoretical binding affinity for *L. plantarum* *larR-larA* intergenic region (top) and mean LarR theoretical binding affinity for the 20 *larR-larA* intergenic regions (bottom). 100% corresponds to the maximal theoretical binding affinity. The 0 is the centre of the Lar-box. The most significant binding sites are represented by arrows below each graph. **C**, DNA sequence of the central part of the *L. plantarum* *larR-larA* intergenic region. Putative -35 and -10 boxes of P_{larR} and P_{larA} , the Lar-box, and the mapped transcriptional start (+1) of *larA* are highlighted in black. Protected regions (lines) and enhancements (V) observed by footprinting assays are indicated above the sequence. The suboptimal LarR binding sites surrounding the Lar-box (palindrome) are shown as arrows below the sequence.

***In silico* identification of suboptimal LarR binding sites.** To evaluate whether the extended rLarR-dependent protection could be due to the specific binding of rLarR to suboptimal LarR binding sites adjacent to the initially identified Lar-box, we calculated the theoretical binding affinity of LarR for the complete intergenic region of *L. plantarum* (Fig. 4B, upper panel). As half-sites may have significant physiological relevance (41), the position weight matrix (PWM) was calculated based on the 40 Lar-box half-sites identified (Table S4). The PWM was then used to calculate a specificity score and a theoretical binding affinity for all positions along intergenic regions. The mean theoretical binding affinity of LarR for the 20 *larR-larA* intergenic regions previously identified was also calculated (Fig. 4B, lower panel). Several suboptimal LarR binding motifs (Lar-box half-sites) with theoretical binding affinities comprised between 0.5% and 2% of the maximal binding affinity were identified near the initial Lar-box in the intergenic region of *L. plantarum*. Two suboptimal LarR motifs were found upstream (*larR* side) and downstream (*larA* side) of the initial Lar-box (Fig. 4B, upper panel). The two half-sites at the *larR* side are found at distances of -19 and -30 bp from the center of the Lar-box but are not conserved in the other *larR-larA* intergenic regions (Fig. 4B). On the *larA* side, the two half-sites are found at distances of +13 and +26 bp from the center of the Lar-box (Fig. 4B). Interestingly, the first half-site located at +13 is conserved amongst most *larR-larA* intergenic regions (Fig. 4B, lower panel) which may be indicative of a role in LarR regulation, probably by promoting LarR multimerization near the Lar-box.

These two half-sites may also be involved in the multimerization of LarR since this region was shown to be protected by rLarR *in vitro* and the positions of these half-sites correlate well with the presence of enhancements in the DNA, strongly suggesting the binding of rLarR at these positions (Fig. 4C).

Multimerization of LarR is required for *larA-E* regulation. To investigate whether LarR multimerizes on the *larR-larA* intergenic region and whether this multimerization is required for the regulation of the *larA-E* operon, EMSAs were performed with *larR-larA* intergenic regions mutated at critical positions and similarly mutated promoters were inserted upstream of the *gusA* reporter gene (Fig. 5).

When one highly conserved nucleotide of the Lar-box was mutated (MutA, Fig. 5A), formation of the first complex was strongly impaired (~26-fold) and formation of higher molecular weight complexes was enhanced (~8-fold) compared to the native situation (MutA vs. WT, Fig. 5B and Fig. S5). When one less conserved nucleotide of the Lar-box was mutated (MutB, Fig. 5A), only the formation of the first complex was impaired (~8-fold) (MutB vs. WT, Fig. 5B and Fig. S5). This shows that formation of the first complex corresponds to rLarR binding on the Lar-box motif. When one highly conserved or one less conserved nucleotide of the Lar-box is mutated, the Gus activity was undetectable and 8-fold reduced upon L-lactate induction, respectively (MutA vs. WT and MutB vs. WT, Fig. 5C). This shows that LarR binding on the Lar-box motif is required for the L-lactate-dependent induction of P_{larA} with a stronger impact for the most conserved residue.

Furthermore, when one nucleotide is mutated in both +13 and +26-bp LarR half-sites (MutD, Fig. 5A), the formation of higher molecular weight complexes was impaired (5-fold) while the formation of the first complex was only slightly affected (1.4-fold) compared to the native situation (MutD vs. WT, Fig. 5B and Fig. S5). This indicates that higher molecular weight complexes (2nd and 3rd complexes) correspond to rLarR multimerization on the suboptimal binding sites located downstream of the initial Lar-box. When the +13 bp LarR half-site was mutated or when both +13 bp and +26 bp LarR half-sites were mutated, the Gus activity was 8-fold and 21-fold reduced upon L-lactate induction, respectively (MutC vs. WT and MutD vs. WT, Fig. 5C). These results show that LarR multimerization on the suboptimal binding sites at the *larA* side of the Lar-box is required for the L-lactate-dependent activity of P_{larA} . Altogether, these results strongly indicate that the L-lactate-dependent activity of P_{larA} requires both the LarR binding on the Lar-box motif and LarR multimerisation on the suboptimal binding sites.

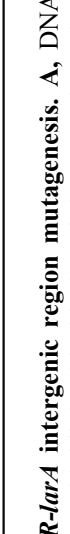
A Mutation	Promoters Sequence	B		C	
		ratio of complexes Co1/free DNA	ratio of complexes Co2+3/Co1	Gus activity (mU/mg) +DL-lac	Gus activity (mU/mg) +L-lac
WT		7.4 ± 1.0	0.34 ± 0.06	ND	11.6 ± 0.2
MutA		0.28 ± 0.05***	1.1 ± 0.2***	ND	ND
MutB		0.87 ± 0.20***	0.30 ± 0.02	ND	1.37 ± 0.03***
MutC		5.9 ± 1.8	0.26 ± 0.05	ND	1.36 ± 0.04***
MutD		5.4 ± 0.8*	0.07 ± 0.02***	0.28 ± 0.07*	0.55 ± 0.06***

Fig.5. *larR-larA* intergenic region mutagenesis. A, DNA sequence including the Lar-box and the -35 box of *P_{larA}*. The mutations are highlighted in black and the LarR theoretical binding sites are represented by arrows under the sequence. B, mean ratios of first complex on free DNA (Co1/free DNA) and of 2nd and 3rd complexes on first complex (Co2+3/Co1) as observed in an EMSA of a 127-bp P₃₂ radiolabeled probe of the mutated *larR-larA* intergenic regions of *L. plantarum* in presence of 15 pmol of rLarR (see Fig. S5 for details). C, Gus activities measured with the mutated *larA* promoters after induction by 200 mM of DL-lactate (+DL-lac) or L-lactate (+L-lac). Mean values ± standard deviations (n=4). Significance of comparison between WT and MutA-D was based on Student *t*-test; *, **, and *** indicate p-values <0.05, <0.01, and <0.001, respectively. ND, not detected (< 0.1 mU).

Résultats : le régulateur LarR

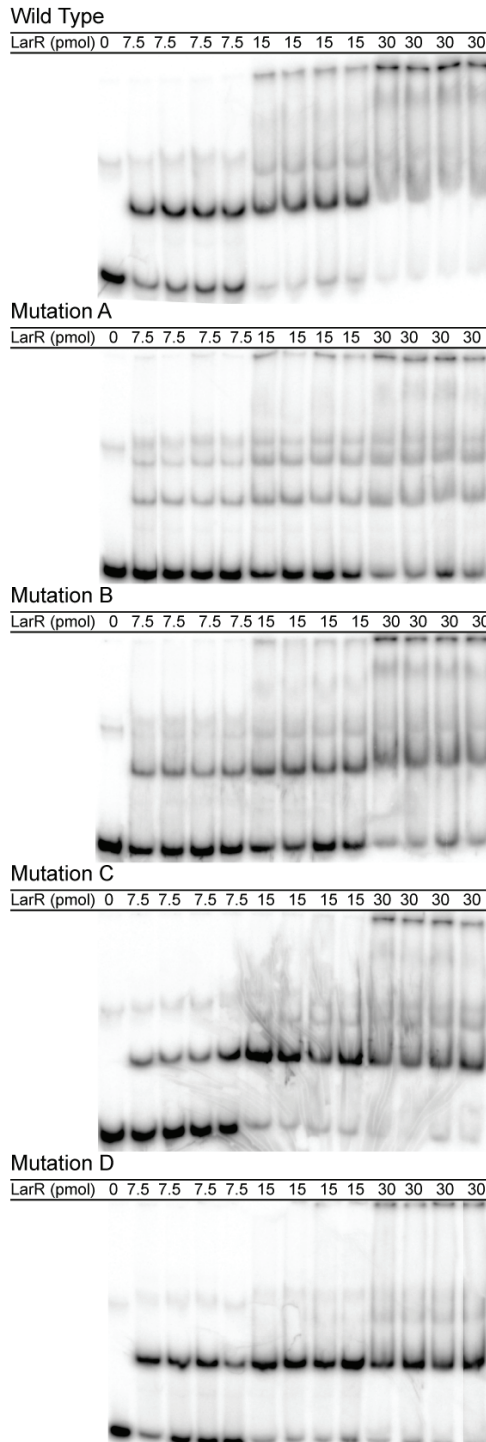


Fig. S5. *larR-larA* intergenic region mutagenesis. EMSAs of 127-bp P₃₂ radiolabeled probes of the mutated *larR-larA* intergenic regions of *L. plantarum* in presence of an increasing amount of purified rLarR. Four repetitions were performed for each condition. The conditions with 15 pmol of rLarR were used for the measurement of the ratios of complexes by densitometry (Fig. 5B).

Discussion

In this study, we characterized the regulation of lactate racemization genes by LarR, which is a new member of the PrfA group of regulators belonging to the Crp-Fnr family. The regulation of LarR by the L- /D-lactate ratio adds a new function to the large variety of roles performed by regulators of the Crp-Fnr family. To our knowledge, this is the first characterized regulator that responds to the ratio of two isomers of the same molecule. As effectors of the other members of the PrfA group are unknown, it is not excluded that some of them could also respond to isomers of the same molecule.

Most members of the PrfA group, such as PrfA, Srv, and Ers, are involved in pathogenicity (1, 9, 42). RcfB, on the other hand, is involved in the lactic acid stress response of *Lc. Lactis* (8) while the role of LarR seems to be restricted to the regulation of the lactate racemase activity. This restricted role is reinforced by the fact that *in silico* searches in the genome of *L. plantarum* fail to identify conserved Lar-box outside of the *lar* locus (data not shown). The transcriptional control of lactate racemase genes by the L- /D-lactate ratio makes all sense since lactate racemase needs only to be produced when required, i.e. when one isomer of Lactate is in excess compared to the other. Nevertheless, lactate racemase genes are not expressed in presence of an excess of D-lactate, which means that only the conversion of L-lactate to D-lactate seems to be physiologically relevant. The role of this conversion may be linked to the absolute requirement for D-lactate incorporation in peptidoglycan during cell wall biosynthesis, as previously demonstrated (12). In addition, it has been suggested that lactate racemisation could replace the D-lactate dehydrogenase activity at a very low growth rate in *L. plantarum* (43). Furthermore, L-lactate-induced lactate racemisation may also be useful for decreasing the L-lactate dehydrogenase inhibition by its product, L-lactate, in species where no D-lactate dehydrogenase is present, as suggested in *Lactobacillus sakei* (44).

In this study, we showed that the L-lactate/D-lactate ratio had a strong effect on the regulation of the promoter of the *larA-E* operon ($P_{larA-gusA}$ fusion), its induction being only observed above a four-fold excess in L-lactate (Fig. 1C). Although these *in vivo* results clearly showed the importance of the L- /D-lactate ratio, this effect could not be confirmed *in vitro*. Unfortunately, the

presence of the Streptag at the N-terminus of LarR impaired D-lactate recognition, which makes the purified rLarR unsuitable for *in vitro* studies in presence or absence of this isomer. Nevertheless, a positive effect of L-lactate on rLarR binding was observed *in vitro*, suggesting that L-lactate is an effector molecule of LarR. As rLarR binding was validated *in vitro*, its binding site in the *larR-larA* intergenic region was investigated. We showed that rLarR binding is mediated by the presence of a Lar-box motif, whose consensus is nearly identical to the PrfA-box and the Acid-box recognized by RcfB (Fig. 3A). Since RcfB, PrfA and LarR regulators are found in different bacteria, the fact that the DNA binding sites are almost identical is not an issue for these regulators but could indicate that they have evolved from a common ancestor. It is quite surprising that the mutation of the nucleotides at the edge of the Lar-box, which are conserved in only 55% of the Lar-boxes, affects rLarR binding similarly to the mutation of the central nucleotides that are conserved in 98% of the Lar-boxes (Fig. 3B). One explanation is that the position of these nucleotides may be variable among Lar-boxes. Indeed, the same nucleotides are found with a one bp shift in position in many Lar-boxes (Fig. 3A and Table S3). Another explanation is the variability of the LarR binding motifs, which is correlated to the variability of the C-terminal DNA-binding domains of LarR regulators. In support to this hypothesis, the alignment of C-terminal domains of LarR homologs shows several clusters of LarR regulators (Fig. S3B). For instance, LarR regulators from *L. brevis* and *L. mali* form a separate cluster, which is in agreement with non-conserved nucleotides at the edge of their Lar-box motifs compared to the consensus Lar-box motif (Fig. S3B and Table S3). The majority of LarR C-terminal domains clusters together with RcfB C-terminal domains and, accordingly, the nucleotides at the edge of their Lar-box motif are also conserved in 50% of Acid-box motifs (Fig. S3B and Fig. 3A). The recognition of these nucleotides may be a specific trait of RcfB and of the majority of LarR regulators which is not shared by the other LarR regulators and members of the PrfA group.

We also showed that LarR regulation by the L-/D-lactate ratio not only requires LarR binding on the Lar-box motif, probably as a dimer as found for most members of the Crp-Fnr family (1), but also LarR multimerisation on suboptimal binding sites located between the Lar-box and the -35 box of the *larA* promoter. We showed that the binding of rLarR on its operator sequences is enhanced in presence of L-lactate (Fig. 2C). Although not demonstrated *in vitro*, we propose that the presence of D-lactate disrupts the

binding of LarR on its binding sites. This led us to postulate a hypothetical LarR regulation mechanism, where LarR binding is promoted by L-lactate and disrupted by D-lactate (Fig. 6).

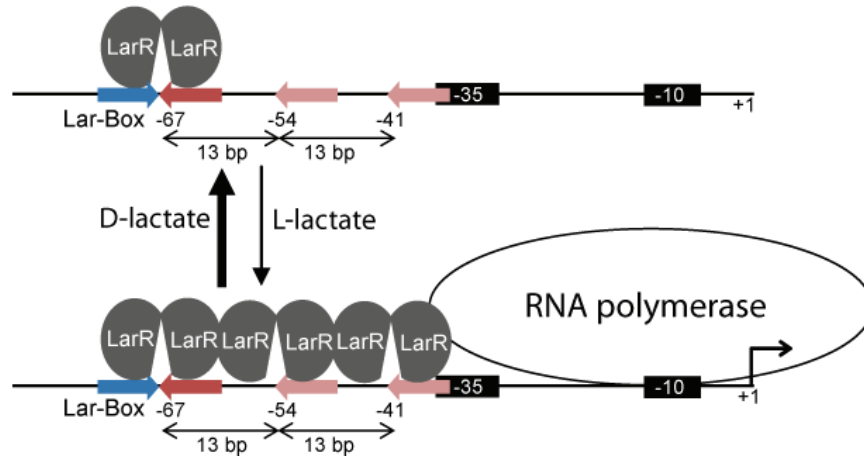


Fig. 6. Hypothetical model of LarR activation. In presence of D-lactate or DL-lactate, a first LarR dimer is proposed to bind to the Lar-box motif without multimerization and recruitment of the RNA polymerase. In presence of L-lactate, the binding of LarR is enhanced and the multimerization of two additional LarR dimers on the suboptimal LarR binding sites results in the recruitment of the RNA polymerase at a position favourable for the transcriptional activation of the P_{larA} .

This mechanism further requires the Lar-box to be located at a distance allowing interaction with the RNA polymerase. For most promoters induced by regulators of the Crp-Fnr family, the centre of the binding motif is located around 41 bp upstream of the transcription start (1), as in class II Crp-dependent promoters (45). This distance was shown to be optimal for the positive interaction between a dimer of regulators and the RNA polymerase (45). In *L. plantarum*, the centre of the Lar-box is located 67 bp upstream of the mapped transcription start of P_{larA} (Fig. 6). In all other species where LarR regulators have been identified, the precise location of transcription starts in *larA* promoter sequences is unknown. However, *in silico* analyses suggest that the Lar-box is generally located around position - 67 or - 54 bp from predicted transcriptional starts (Fig. S6). The positioning of the LarR suboptimal binding sites in the *larA* promoter of *L. plantarum* at position -41 and -54 (5' ends) is compatible with the binding of two additional LarR dimers, the dimer located at position -41 may directly activate the RNA polymerase as in class II Crp-dependent promoters (Fig. 6). This type of activation, which depends on the presence of suboptimal LarR binding sites

adjacent to the Lar-box, may probably be effective for all promoters controlled by LarR regulators.

Species	bp from the center of the Lar-box																																						
	-0.5							0.5							10.5							20.5							30.5										
<i>Cl. genomosp.</i>	A	T	A	C	A	A	T	G	T	T	A	G	C	A	T	T	T	G	A	G	C	T	A	A	C	C	G	G	C	A	T	T	A	T	T				
<i>En. faecalis</i>	G	T	A	G	C	A	A	T	G	T	T	A	C	C	A	C	A	T	A	A	G	G	A	C	T	G	T	G	A	T	T	C	C	T	A	A			
<i>Eu. hali</i>	G	G	T	A	A	C	A	T	T	G	A	T	A	C	A	T	T	T	T	A	T	A	T	C	T	T	A	C	T	A	A	C	A	C	A				
<i>G. adjacens</i>	G	T	A	A	C	A	A	T	G	T	T	A	C	T	A	A	C	C	T	T	G	A	G	A	C	T	C	T	G	T	G	C	G	T	T	A			
<i>G. elegans</i>	G	T	A	A	C	A	T	T	G	T	T	A	C	A	C	C	A	T	T	G	T	A	T	T	C	A	C	A	T	T	C	A	A	A	G	A	A		
<i>L. coryniformis</i>	G	T	A	A	C	A	T	T	G	T	T	A	C	C	T	A	C	T	T	G	A	A	A	A	T	G	C	T	A	A	C	G	T	G	G	C	A	G	
<i>L. fermentum</i>	T	G	T	A	A	C	A	T	C	A	T	A	C	G	C	T	A	T	T	T	G	A	C	G	C	T	G	A	A	A	G	C	A	A	C	G	C	A	
<i>L. brevis</i>	C	T	T	A	A	C	A	T	T	G	G	T	A	T	G	A	C	A	C	T	G	G	C	T	A	T	T	G	A	T	A	C	C	G	A	T	A	T	
<i>L. mali</i>	C	T	T	A	C	A	T	T	G	G	T	A	T	G	T	T	A	A	A	G	A	A	C	A	T	A	C	A	C	T	T	A	A	A	T	A	A	T	
<i>L. pentosus</i>	G	T	A	T	A	C	A	T	T	G	T	T	A	C	T	A	T	T	T	G	A	A	A	A	C	T	T	G	A	A	T	G	A	A	T	G	T	A	G
<i>L. plantarum</i>	G	T	A	T	A	C	A	T	T	G	T	T	A	C	T	A	T	T	T	G	A	A	A	A	C	T	T	A	A	A	T	G	T	A	A	T	A	A	
<i>St. vestibularis</i>	A	A	C	A	T	C	A	A	T	G	A	T	A	C	T	T	A	T	G	T	A	T	T	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	T	T	A	A	T	
<i>L. sakei</i>	T	T	G	A	A	C	A	T	T	G	T	T	A	C	A	T	T	G	T	A	G	C	C	T	T	C	C	T	T	C	T	T	G	T	A	A	C	G	
<i>Sp. inulinus</i>	G	G	A	A	A	C	A	T	T	G	T	T	A	C	A	T	T	T	T	G	A	T	G	A	T	A	G	C	A	A	A	C	G	G	A	A	C	C	G
<i>Eu. biforme</i>	A	A	C	A	A	C	A	A	T	G	T	T	A	C	A	T	A	A	A	A	T	G	A	G	G	T	T	C	A	T	A	T	A	T	T	A	T	A	A
<i>Pe. clausenii</i>	T	G	T	A	A	C	A	A	T	G	T	T	A	C	A	C	C	T	A	A	T	T	G	T	G	T	A	T	C	C	A	C	G	A	C	T	T	A	A
<i>Pe. pentosaceus</i>	T	G	T	A	A	C	A	A	T	G	T	T	A	C	A	C	C	A	A	T	G	T	G	A	T	A	C	C	C	G	G	T	C	G	A	T	T	T	A
<i>L. curvatus</i>	G	T	T	A	T	C	A	T	T	G	T	T	A	C	C	T	A	A	A	G	T	A	T	A	T	A	A	T	G	A	A	T	G	T	T	G	T	T	C
<i>Co. intestinalis</i>	G	T	T	G	A	C	A	T	T	G	G	T	A	C	T	A	C	A	T	C	G	A	C	A	T	A	A	C	G	C	A	T	A	C	C	C	T	T	C
<i>Co. tanakaei</i>	T	G	C	A	C	A	A	A	G	G	T	A	C	A	C	A	C	A	A	A	G	G	T	C	A	G	A	C	C	C	G	C	C	G	A	T	G	C	A

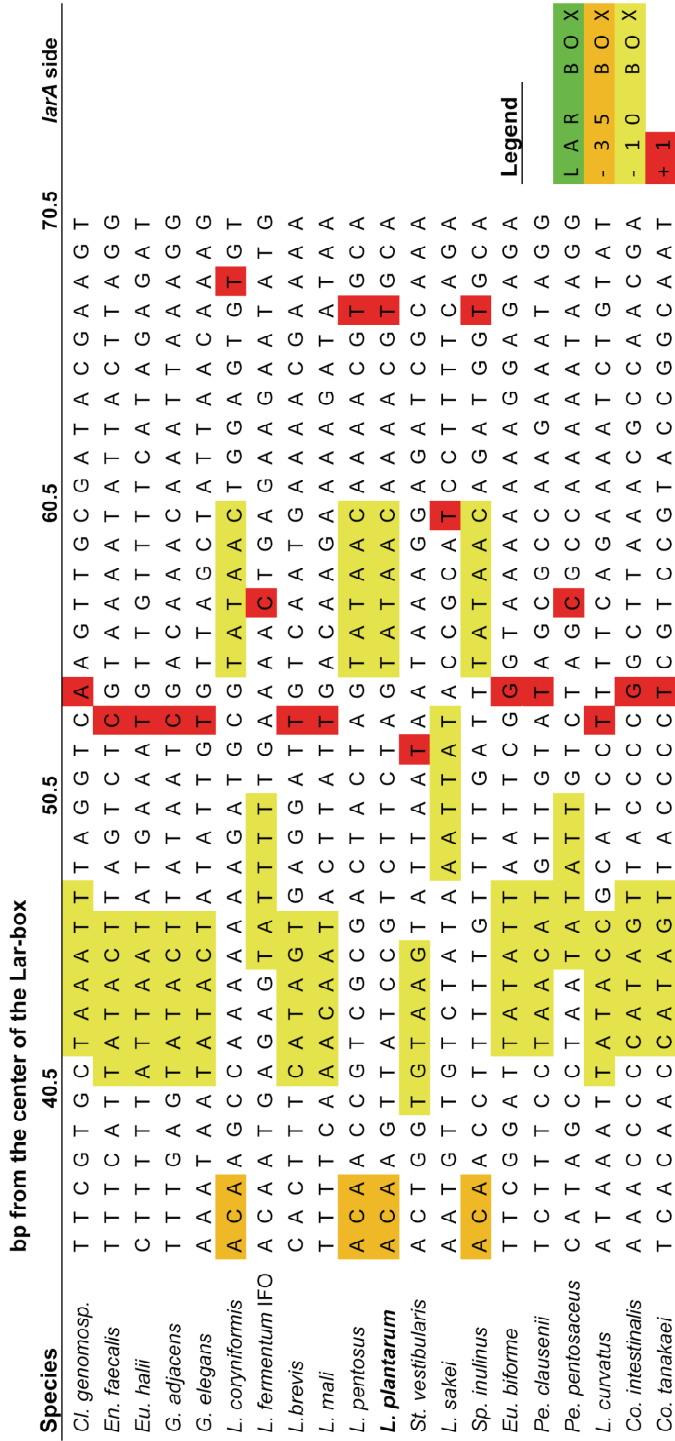


Figure S6. Sequences of *larA* promoters.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS), the Interuniversity Attraction Poles Programme–Belgian Science Policy, the “Communauté française de Belgique–Actions de Recherches Concertées”, and the “UCL-Fonds Speciaux de Recherche”. B.D. and P.H. are respectively Research Fellow and Research Associate at FNRS.

References

1. Korner H, Sofia HJ, & Zumft WG (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* 27(5):559-592.
2. Busby S & Ebright RH (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293(2):199-213.
3. Desguin B, *et al.* The lactate racemase, a chaperone-activated nickel-dependent enzyme with a novel α/β fold. *submitted*.
4. Vega Y, *et al.* (1998) Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J. Bacteriol.* 180(24):6655-6660.
5. Xayarath B, Volz KW, Smart JI, & Freitag NE (2011) Probing the role of protein surface charge in the activation of PrfA, the central regulator of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *PLoS ONE* 6(8):e23502.
6. Reid SD, Montgomery AG, & Musser JM (2004) Identification of srv, a PrfA-like regulator of group A *Streptococcus* that influences virulence. *Infect. Immun.* 72(3):1799-1803.
7. Giard JC, *et al.* (2006) Characterization of Ers, a PrfA-like regulator of *Enterococcus faecalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46(3):410-418.
8. Madsen SM, Hindre T, Le Pennec JP, Israelsen H, & Dufour A (2005) Two acid-inducible promoters from *Lactococcus lactis* require the cis-acting ACiD-box and the transcription regulator RcfB. *Mol. Microbiol.* 56(3):735-746.
9. Doern CD, Holder RC, & Reid SD (2008) Point mutations within the streptococcal regulator of virulence (Srv) alter protein-DNA interactions and Srv function. *Microbiology* 154(Pt 7):1998-2007.
10. Riboulet-Bisson E, *et al.* (2008) Characterization of the Ers regulon of *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 76(7):3064-3074.

11. Reents H, Munch R, Dammeyer T, Jahn D, & Hartig E (2006) The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188(3):1103-1112.
12. Goffin P, *et al.* (2005) Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 187(19):6750-6761.
13. Brutinel ED & Gralnick JA (2012) Preferential Utilization of D-Lactate by *Shewanella oneidensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(23):8474-8476.
14. Aguilera L, *et al.* (2008) Dual role of LldR in regulation of the *lldPRD* operon, involved in L-lactate metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190(8):2997-3005.
15. Gao C, *et al.* (2012) Lactate utilization is regulated by the FadR-type regulator LldR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 194(10):2687-2692.
16. Georgi T, Engels V, & Wendisch VF (2008) Regulation of L-lactate utilization by the FadR-type regulator LldR of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190(3):963-971.
17. van Kranenburg R, Marugg JD, van S, II, Willem NJ, & de Vos WM (1997) Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 24(2):387-397.
18. Sorvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VG, & Axelsson L (2005) High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology* 151(Pt 7):2439-2449.
19. de Ruyter PG, Kuipers OP, & de Vos WM (1996) Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(10):3662-3667.
20. Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, & de Vos WM (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24(5):895-904.
21. Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
22. Dower WJ, Miller JF, & Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16(13):6127-6145.
23. Lambert JM, Bongers RS, & Kleerebezem M (2007) Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(4):1126-1135.
24. Holo H & Nes IF (1989) High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(12):3119-3123.

25. Derzelle S, *et al.* (2000) Changes in *cspL*, *cspP*, and *cspC* mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 182(18):5105-5113.
26. Goffin P, Lorquet F, Kleerebezem M, & Hols P (2004) Major role of NAD-dependent lactate dehydrogenases in aerobic lactate utilization in *Lactobacillus plantarum* during early stationary phase. *J. Bacteriol.* 186(19):6661-6666.
27. Ferain T, *et al.* (1996) Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178(18):5431-5437.
28. Pavan S, *et al.* (2000) Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10):4427-4432.
29. Liu H & Naismith JH (2008) An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol.* 8:91.
30. Griffith KL & Wolf Jr RE (2002) Measuring β -Galactosidase Activity in Bacteria: Cell Growth, Permeabilization, and Enzyme Assays in 96-Well Arrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290(1):397-402.
31. Schmidt TG & Skerra A (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* 2(6):1528-1535.
32. Larkin MA, *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-2948.
33. Stover BC & Muller KF (2010) TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11:7.
34. Wasserman WW & Sandelin A (2004) Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet.* 5(4):276-287.
35. Nishida K, Frith MC, & Nakai K (2009) Pseudocounts for transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res.* 37(3):939-944.
36. Hardiman T, *et al.* (2010) Prediction of kinetic parameters from DNA-binding site sequences for modeling global transcription dynamics in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 12(3):196-211.
37. Fontaine L, *et al.* (2013) Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci. *Mol. Microbiol.*
38. Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4):406-425.
39. Ferain T, Garmyn D, Bernard N, Hols P, & Delcour J (1994) *Lactobacillus plantarum* *ldhL* gene: overexpression and deletion. *J. Bacteriol.* 176(3):596-601.

40. Hampshire AJ, Rusling DA, Broughton-Head VJ, & Fox KR (2007) Footprinting: a method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. *Methods* 42(2):128-140.
41. Leuze MR, Karpinets TV, Syed MH, Beliaev AS, & Uberbacher EC (2012) Binding Motifs in Bacterial Gene Promoters Modulate Transcriptional Effects of Global Regulators CRP and ArcA. *Gene regulation and systems biology* 6:93-107.
42. Riboulet-Bisson E, *et al.* (2009) Ers a Crp/Fnr-like transcriptional regulator of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* 131(1):71-74.
43. Goffin P, *et al.* (2010) Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. *Mol. Syst. Biol.* 6:413.
44. Malleret C, Lauret R, Ehrlich SD, Morel-Deville F, & Zagorec M (1998) Disruption of the sole *ldhL* gene in *Lactobacillus sakei* prevents the production of both L- and D-lactate. *Microbiology* 144 (Pt 12):3327-3333.
45. Busby S & Ebright RH (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293(2):199-213.

IV. Discussion

IV.1. La racémisation du lactate, un mécanisme original

IV.1.1. Introduction

Des études précédentes, effectuées sur la lactate racémase de *C. beijerinckii*, suggèrent que la lactate racémase possède un mécanisme catalytique par transfert d'hydrure (179). Néanmoins, il s'agit de preuves indirectes qui ne permettent pas d'écarter définitivement l'hypothèse d'une abstraction de proton. Nous allons voir comment les données que nous avons obtenues permettent d'éclairer la situation.

La première question qu'on se pose est de savoir si la lactate racémase de *C. beijerinckii* étudiée antérieurement peut être comparée à celle de *L. plantarum*. En effet, vu que le gène de la lactate racémase de *C. beijerinckii* n'a pas été identifié, rien ne nous indique que ce soit une enzyme semblable à celle de *L. plantarum*. Même si nous ne pouvons pas apporter de réponse définitive à la question, l'étude des homologues aux protéines Lar chez *C. beijerinckii* révèle deux homologues à LarA_{Lp}, un homologue à LarB_{Lp}, un homologue à LarC_{Lp} et un homologue à LarE_{Lp} dans le génome de *C. beijerinckii* NCIMB 8052. Les homologues à LarB_{Lp}, LarC_{Lp} et LarE_{Lp} forment un opéron, comme c'est généralement le cas dans le genre *Clostridium*. La séquence de l'homologue le plus proche de LarA_{Lp} est identique à 60% et similaire à 72% à la séquence de LarA_{Lp}. Vu que LarA_{Tp}, qui possède une similarité plus faible avec LarA_{Lp}, est également une lactate racémase, il paraît assez probable que l'homologue de *C. beijerinckii* le soit également. Nous allons donc considérer que les lactate racémases de *L. plantarum* et de *C. beijerinckii* sont des enzymes similaires qui utilisent un mécanisme catalytique identique.

IV.1.2. Mécanisme catalytique par abstraction de proton

Vu que toutes les racémases connues utilisent le mécanisme d'abstraction de proton, c'est le mécanisme catalytique qui semble le plus intuitif dans le cadre de la racémisation du lactate. En se basant sur l'organisation du site catalytique de la mandélate racémase, on peut tenter de reconstruire le site catalytique de la lactate racémase.

Dans le cas de la mandélate racémase, l'ion $Mg(II)$ est coordonné par 2 aspartates, un glutamate, une molécule d'eau et par deux oxygènes du substrat, formant un site octaédrique (269). Le nickel, quant à lui, préfère la coordination par des histidines et adopte généralement une coordination de type octaédrique, pyramide carrée ou planaire carrée (222, 223). Les résultats obtenus en EXAFS indiquent que le Ni serait vraisemblablement coordonné par au moins deux histidines et adopterait une géométrie pyramide carrée à 5 ligands (III.1 Fig. S10 p. 133 et Table S6 p. 132). Les trois histidines conservées dans la structure de $LarA_{Tt}$ sont situées à des distances qui ne permettent pas la coordination du nickel, du moins dans cette conformation. En effet, elles sont distantes les unes des autres de 6,6, 8,7 et 9,9 Å dans le premier monomère et de 6,6, 8,4 et 9,2 Å dans le second monomère (Fig. 48). Vu que les ions Ni sont en général distants de leurs ligands de 2 Å (270, 271), la distance entre deux histidines coordonnant un ion Ni peut être de 4 Å au maximum. Afin que deux histidines puissent coordonner un nickel dans la lactate racémase, il faudrait qu'il s'opère un changement de conformation entre l'enzyme active et inactive rapprochant deux histidines suffisamment l'une de l'autre. L'His174, plus particulièrement, fait partie d'une boucle de 12 résidus dont plusieurs sont des glycines conservées (Fig. 48). Il paraît envisageable que cette boucle puisse rapprocher l'His174 de quelques Å de l'His200, qui se situe à une distance de 6,6 Å. Un rapprochement de seulement 2,6 Å rendrait la coordination du nickel possible. Mais il n'est pas exclu que ce soit plutôt l'His200 qui se rapproche de l'His174, ou les deux à la fois. La coordination du nickel serait finalement complétée par la liaison du substrat et d'une molécule d'eau, comme pour la mandélate racémase (269). Le site ainsi formé pourrait avoir une géométrie de coordination de type pyramide carrée à 5 ligands, comme le prévoient les données d'EXAFS.

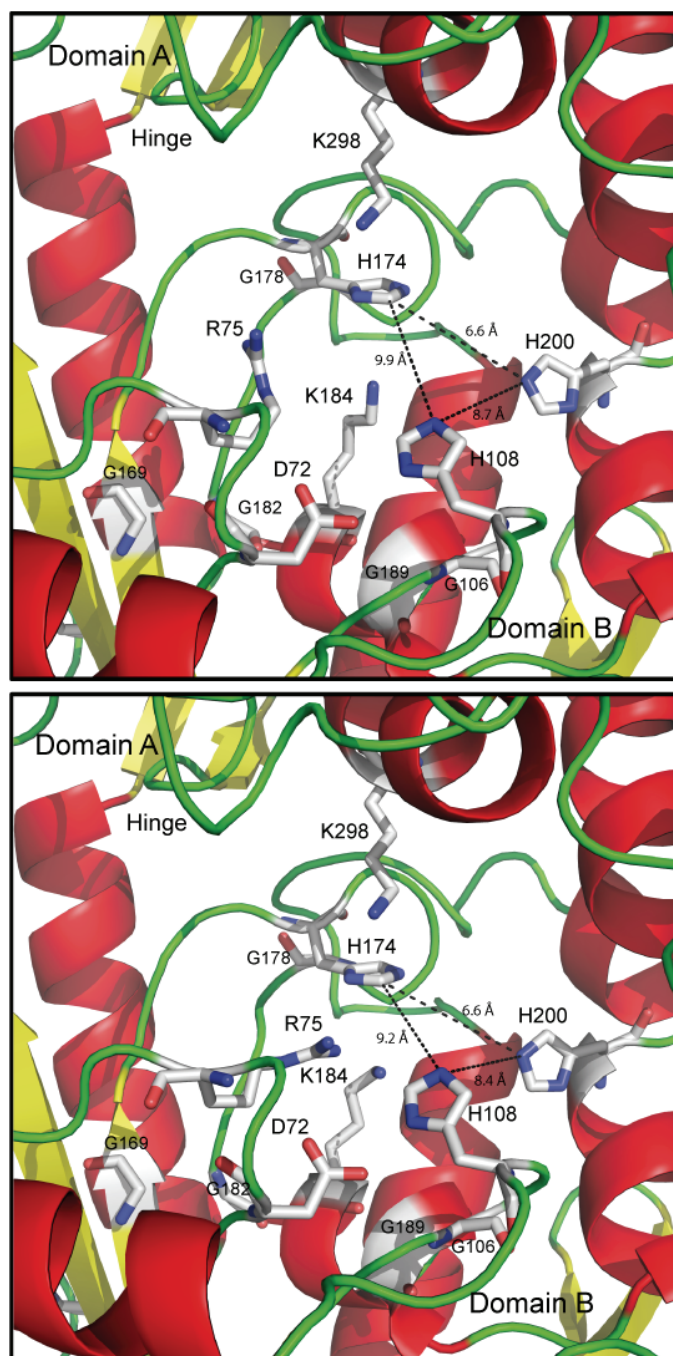


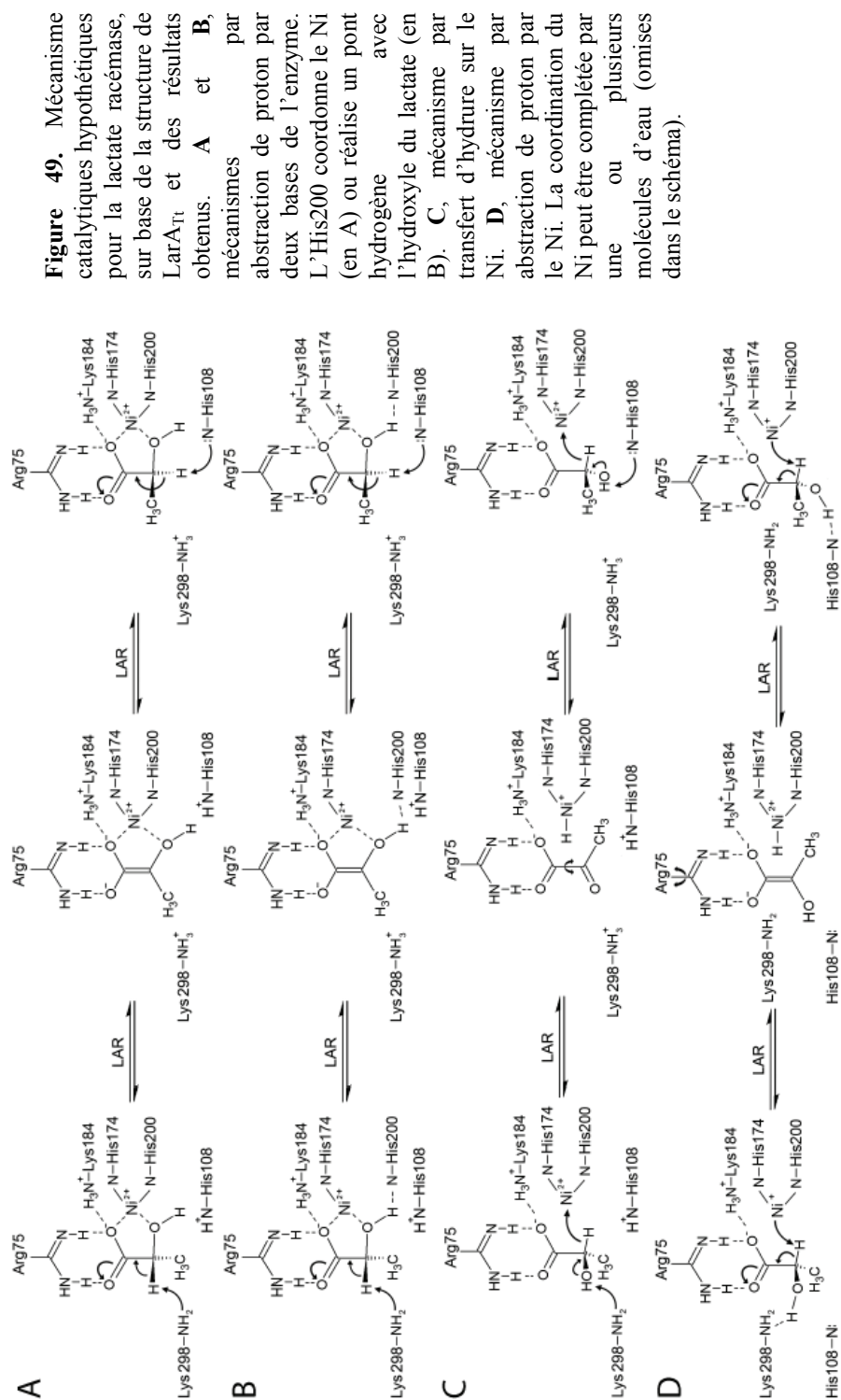
Figure 48. Zoom sur le site catalytique du premier (en haut) et du deuxième (en bas) monomère de LarA_{TL}. Les hélices α sont en rouge, les brins β en jaune et les boucles sont en vert. Les résidus catalytiques sont en représentation par bâtonnets avec la C en blanc, le N en bleu et le O en rouge. Les distances entre les histidines sont notées par des pointillés noirs.

Concernant la coordination du groupement carboxylate, la mandélate racémase utilise pour cela un acide glutamique et une lysine (162). Dans la lactate racémase, deux résidus conservés, l'Arg75 et la Lys184, pourraient remplir ce rôle (Fig. 49A). L'Arg75 forme d'ailleurs des ponts hydrogènes avec un ion sulfate qui occupe le site catalytique du deuxième monomère de LarA_{Tt}, à l'endroit où pourrait se situer le lactate dans l'enzyme active (III.1 Fig. S8 p. 128). Une arginine coordonne le carboxylate du substrat dans la L-Ldh (191), un tel rôle pour l'Arg75 est donc cohérent. La Lys184 pourrait également intervenir dans la neutralisation de la charge négative du carboxylate, malgré qu'elle se trouve un peu loin (5,6 Å) du sulfate en question dans la structure du deuxième monomère de LarA_{Tt} (III.1 Fig. S8 p. 128). Elle pourrait se rapprocher un peu lors du changement conformationnel qui interviendrait lors de l'activation, ou alors le lactate pourrait se situer plus profondément enfoui dans le site catalytique que ne l'est le sulfate.

Si l'on considère la situation décrite précédemment : le lactate à la place du sulfate et le nickel coordonné par les His174 et 200, on observe que deux résidus catalytiques restant, l'His108 et la Lys298, sont idéalement situés pour la catalyse. En effet, ils sont situés de part et d'autre du sulfate, formant des ponts hydrogènes avec celui-ci (III.1 Fig. S8 p. 128). La mandélate racémase utilise également une lysine et une histidine pour effectuer l'abstraction du proton du mandélate, situés pratiquement à la même distance l'une de l'autre que dans le cas de la lactate racémase (7,1 Å pour 7,4 Å dans le cas de la lactate racémase). Qui plus est, le dernier résidu conservé autre qu'une glycine est justement un aspartate interagissant avec l'His108, comme observé aussi dans le cas de la mandélate racémase et de la L-Ldh FMN-dépendante (Figs. 14 p. 43 et 19 p. 49). Le rôle de cet aspartate serait de stabiliser la forme protonée de l'histidine, afin de faciliter l'abstraction du proton (189).

Vu comme cela, le site catalytique semble approprié à une catalyse de type déprotonation/protonation telle que réalisée par la mandélate racémase (Fig. 49A). Il manque cependant un élément important. En effet, une asparagine de la mandélate racémase forme un pont hydrogène avec l'hydroxyle du mandélate, ce qui stabilise l'intermédiaire de réaction et favorise la catalyse (163). Cependant, dans le cas de la lactate racémase, aucun résidu asparagine n'est conservé et, de plus, aucun résidu ne se situe à une distance permettant la formation d'un pont hydrogène avec l'hydroxyle du lactate dans le site catalytique tel que décrit ci-dessus. Vu l'importance de cette interaction, il

semble peu probable que la lactate racémase puisse s'en passer alors que la déprotonation du proton α du lactate est encore plus difficile à réaliser que la déprotonation du proton α du mandélate (164). Nous avons vu que l'inhibition par l'oxalate⁻, qui possède un hydroxyle en α , est meilleure que l'inhibition par l'oxalate²⁻, qui n'a pas d'hydroxyle disponible. De plus, le pyruvate, qui ne possède pas d'hydroxyle en α , inhibe faiblement la lactate racémase, malgré sa ressemblance avec l'oxalate et le lactate. Ces données soutiennent l'importance d'un pont hydrogène entre la lactate racémase et un hydroxyle en α du substrat. Le seul résidu qui pourrait éventuellement permettre ce pont hydrogène, dans le site catalytique tel que décrit ci-dessus, est l'His200, qui forme d'ailleurs un pont hydrogène avec une molécule de glycol dans le site catalytique du premier monomère de LarA_{Tt} (III.1 Fig. S8 p. 128) (Fig. 49B). Vu qu'au départ nous avons attribué la coordination du nickel à l'His200 et à l'His174, cela signifie qu'il ne resterait plus que l'His174 pour coordonner le nickel, ce qui est insuffisant. Sans données additionnelles, nous ne pouvons malheureusement résoudre ce dilemme.



De manière plus générale, si on compare la structure de la lactate racémase à celle de la mandélate racémase, les différences sont flagrantes. Le repliement de la mandélate racémase est un tonneau $(\beta/\alpha)_7\beta$ avec une coiffe $\alpha+\beta$, alors que le repliement de la lactate racémase est composé de deux domaines de type α/β (Fig. 14 p. 43 et III.1 Fig. 2 p. 126). Dès lors, pourquoi les structures sont-elles à ce point différentes, si le mécanisme catalytique est semblable ? En outre, la mandélate racémase est capable de racémiser du trifluorolactate (164), un substrat fort semblable au lactate. La structure originale de la lactate racémase ne se justifierait donc pas par sa spécificité envers son substrat, mais plutôt par un mécanisme catalytique inhabituel (abordé au point IV.1.3) ou par une géométrie de coordination particulière. En effet, le Mg(II) adopte une géométrie de coordination différente de celle adoptée par le Ni(II), vu que le Ni(II) a un diamètre ionique plus grand que le Mg(II) (219). La nécessité de positionner correctement les ligands par rapport à l'ion métallique est une raison qui pourrait expliquer la nécessité d'une structure différente pour la coordination du nickel. De plus, le fait que l'enzyme nécessite un mécanisme d'activation par une protéine accessoire qui insère le nickel dans le site catalytique est également un facteur qui joue en faveur d'une structure différente pour la lactate racémase.

Cela nous amène à la question du rôle du Ni(II) dans le site catalytique de la lactate racémase, alors que le Mg(II) semble bien faire l'affaire dans le site catalytique de la mandélate racémase. Comme le proton α du lactate est moins acide que celui du mandélate d'environ 3 unités (184), la stabilisation de l'intermédiaire doit être plus efficace. Le Zn(II), qui est un meilleur électrophile et donc un meilleur acide de Lewis que le Mg(II) (196), est cependant un moins bon catalyseur électrophile que le Ni(II), comme le montre la comparaison de ces deux ions dans le cadre d'une réaction d'hydrolyse (253). De plus, le Ni(II) possède un potentiel redox plus élevé que le Zn(II) et que le Mg(II) (-0.26 V vs -0.76 V et -2,37 V). Il semble donc que le Ni(II) soit un bien meilleur électrophile et donc un meilleur stabilisateur de l'intermédiaire de réaction que le Mg(II). Si, dans le cas de la mandélate racémase, le Mg(II) suffit, la stabilisation de l'intermédiaire de réaction réalisée par la lactate racémase semble nécessiter un bien meilleur électrophile : le Ni(II). Le fait que la mandélate racémase n'utilise pas de Ni(II) peut s'expliquer par la difficulté d'obtenir cet ion et la complexité du mécanisme nécessaire à son incorporation au sein de l'enzyme. La lactate racémase nécessite donc ce qu'il y a de mieux en termes de stabilisation, du fait de la difficulté d'abstraire le proton α du lactate.

Certaines données, notamment le fait que le proton ne soit pas échangé avec le milieu lors de la catalyse (180), sont cependant difficiles à concorder avec un mécanisme catalytique par transfert de proton, tel que décrit ci-dessus. Dans le cas de la glyoxalase I, le proton est protégé du milieu lors de son transfert (Fig. 41 p. 82), ce qui résulte en une absence d'échange du proton avec le milieu lors de la catalyse (249). Dans le cas de la lactate racémase, le proton devrait passer d'un côté à l'autre de la molécule, ce qui est un trajet plus long que le passage d'un carbone à un carbone voisin, comme réalisé par la glyoxalase I. De plus, une des bases proposées pour la catalyse est une lysine, dont la fonction ammonium porte trois protons échangeables avec le milieu. Pour garder le proton protégé du milieu, la lactate racémase devrait donc utiliser un mécanisme à une base monoprotique. Mais, afin d'être reprotoné sur l'autre face, l'intermédiaire dianionique devrait réaliser une rotation ou une torsion de 180°. Vu, d'une part, la présence suspectée d'une double liaison dans l'intermédiaire et, d'autre part, la nécessité d'avoir de nombreuses liaisons de coordination et ponts hydrogènes entre l'intermédiaire et l'enzyme afin de stabiliser celui-ci (Fig. 49B p. 256), cette hypothèse semble fort improbable.

Un autre argument en défaveur du mécanisme par transfert de proton est la présence d'un intermédiaire de réaction de type carbonyle lors de la catalyse (179), présence qu'un mécanisme par abstraction de proton n'explique pas.

IV.1.3. Mécanisme catalytique par transfert d'hydrure

Le fait que la lactate racémase possède un repliement unique pourrait indiquer un mécanisme catalytique original. En effet, les différentes superfamilles d'enzymes possèdent généralement une stratégie mécanistique chimique commune, même si les réactions qu'elles catalysent sont parfois fort différentes (272). Si le mécanisme catalytique par déprotonation/reprotonation n'explique pas tous les résultats obtenus, peut-être faut-il dès lors envisager un autre mécanisme catalytique. Le mécanisme de transfert d'hydrure, tel que proposé pour la lactate racémase par Cantwell et Dennis (179), est une alternative intéressante à plusieurs points de vue.

Premièrement, l'organisation du site catalytique supposée pour la catalyse par déprotonation/reprotonation peut également être adoptée pour une catalyse par transfert d'hydrure. En particulier, l'Arg74 et la Lys184 peuvent

toujours former des ponts hydrogènes stabilisant la fonction carboxylate du substrat, les His174 et 200 peuvent toujours coordonner le nickel et les résidus His108 et Lys298 peuvent toujours servir à l'abstraction d'un proton (Fig. 49C p. 256). Seulement, dans ce cas, ce n'est pas le proton α du lactate qui est concerné, mais plutôt le proton du groupement hydroxyle, situé en α également (Fig. 49C p. 256). Ce proton est bien plus acide que le proton α , ce qui facilite son abstraction (273). Vu que l'hydroxyle du lactate n'est dès lors plus disponible pour la coordination du nickel, celle-ci doit être assurée par d'autres ligands. L'His108 pourrait être impliquée dans cette coordination, mais elle ne serait alors plus disponible pour la catalyse. L'hypothèse que d'autres ligands non-protéiques soient impliqués dans la coordination du nickel sera abordée au point IV.1.5.

Deuxièmement, les données obtenues par Cantwell et Dennis (179) ont montré qu'un intermédiaire de type carbonyle était vraisemblablement présent lors de la catalyse, ce qui soutient l'hypothèse d'un transfert d'hydrure. Les auteurs postulèrent que l'hydrure serait transféré sur le thioester formé à partir du carboxylate du lactate, via un transfert intramoléculaire, mais n'exclurent pas la possibilité d'un accepteur d'hydrure externe (179). On peut donc imaginer un mécanisme catalytique par lequel un hydrure serait transféré du lactate sur le nickel durant la catalyse, formant du pyruvate comme intermédiaire de réaction (Fig. 49C p. 256). Le nickel semble être un accepteur d'hydrure valable, en effet un intermédiaire de type NiH est observé dans le site catalytique de trois des huit enzymes à nickel décrites : la [NiFe]-hydrogénase (274), la CODH (242) et la MCR (241). Ces trois enzymes à nickel montrent également toutes une forte sensibilité à l'oxygène, probablement due à la présence d'un noyau bimétallique ou d'un Ni réduit (Ni(I) ou Ni(0)) (275-277).

Pour terminer, l'organisation du site catalytique ressemble à celui de la Ldh. En effet, on voit aussi la présence d'une arginine qui peut lier le carboxylate du lactate, située à côté d'une histidine rendue plus basique par la présence d'un aspartate (Fig. 49C p. 256). Vu qu'un mécanisme catalytique par transfert d'hydrure a finalement été reconnu pour la Ldh (186), la lactate racémase pourrait donc suivre la même voie et adopter un mécanisme similaire pour la racémisation de l'acide lactique.

IV.1.4. Inactivation de la lactate racémase

Une étude précédente attribua la sensibilité à l'oxydation de la lactate racémase à une cystéine catalytique sensible à l'oxygène (172), mais l'absence de cystéine présente dans le site catalytique ou conservée au sein de la séquence nous pousse à revoir cette hypothèse. La sensibilité à l'oxydation de la lactate racémase pourrait être due à la présence d'un site bimétallique de type NiFe, comme présent dans la [NiFe]-hydrogénase et dans la CODH (254), mais les données d'EXAFS infirment l'hypothèse d'un noyau bimétallique (Vlad Martin-Diaconescu, communication personnelle). Elle pourrait également être due à la présence d'un Ni(I) qui serait oxydé en Ni(II) en présence d'oxygène, rendant l'enzyme inactive, comme dans le cas de la MCR (278). La présence d'un Ni(I) dans la lactate racémase au repos est cependant difficilement conciliable avec un mécanisme catalytique d'abstraction d'hydrure par le nickel. En effet, le Ni(I) est un nucléophile qui préfère les noyaux chargés positivement tel les méthyles ou les protons, il aurait donc peu d'affinité pour un hydrure. On pourrait dès lors imaginer un mécanisme de déprotonation/reprotonation où ce ne sont pas les bases de l'enzyme qui effectuent la catalyse acido-basique, mais le Ni(I) (Fig. 49D p. 256). Ce mécanisme a l'avantage d'être cohérent avec la présence d'un Ni(I) dans l'enzyme au repos et permet d'attribuer un nouveau rôle de receveur de pont hydrogène aux résidus basiques du site catalytique. De plus, le fait que le Ni soit responsable de la déprotonation et de la reprotonation permet d'expliquer pourquoi le proton n'est pas échangé avec le milieu durant la catalyse (180). La rotation de l'intermédiaire de réaction, qui n'est plus lié au Ni, pourrait être réalisée grâce à la rotation de l'arginine (Fig. 49D p. 256). Par contre ce mécanisme n'explique pas la présence d'un intermédiaire de type carbonyle lors de la catalyse (179), on privilégie donc plutôt l'hypothèse d'un transfert d'hydrure (Fig. 49C p. 256).

L'inactivation de la lactate racémase est pratiquement identique dans un environnement faible en oxygène par rapport à un environnement aérobie (III.1 Fig. S4 p. 117). C'est seulement la combinaison d'un environnement faible en oxygène et de vitamine C qui permet de préserver l'enzyme de l'oxydation (III.1 Fig. S4 p. 117). L'oxygène moléculaire n'est donc peut-être pas directement impliqué dans l'inactivation de l'enzyme, qui serait alors plutôt due à la présence d'un radical libre dans le site catalytique. Cela nous mène à envisager un quatrième mécanisme, impliquant une catalyse radicalaire. Il est cependant très difficile d'imaginer un tel mécanisme dans

l'état actuel de nos connaissances. En effet, les enzymes radicalaires nécessitent généralement un cofacteur de type SAM ou cobalamine pour générer un radical libre (279). La MCR est une enzyme à Ni qui fonctionne via un mécanisme radicalaire, mais ce mécanisme nécessite la présence de cofacteurs possédant un atome de soufre afin de produire et stabiliser le radical libre. Cependant, aucun cofacteur capable de générer un radical libre ou possédant un atome de soufre n'a été mis en évidence dans le cas de la lactate racémase. Nous n'avons donc aucune piste qui nous permette de comprendre comment un radical libre pourrait éventuellement être généré dans le site catalytique de la lactate racémase.

Une différence entre la lactate racémase et les autres enzymes à nickel sensibles à l'oxygène est le fait que le nickel s'échappe du site catalytique au cours du temps. Ceci est un phénomène unique parmi les enzymes à nickel et rend l'étude du site catalytique de la lactate racémase d'autant plus délicate. L'inactivation de l'enzyme est probablement liée à ce phénomène, vu que les vitesses de sortie du Ni et d'inactivation sont similaires (Fig. 50). Cette sortie du nickel suit par ailleurs une courbe de type double exponentielle (Fig. 50), ce qui indique qu'il y ait en fait deux vitesses de sortie du Ni. Ceci peut s'expliquer soit par la présence de deux ions nickel ayant des étages d'oxydation différents, soit par la présence de deux conformations de l'enzyme, liant le Ni de manière différente. Le fait que LarA cristallise sous forme de dimères avec des variétés structurales entre les deux sites actifs soutient plutôt l'hypothèse d'un site de fixation du Ni variable. Dans ce cas, un site de fixation serait plus sensible que l'autre à l'inactivation et perdrait plus rapidement son nickel.

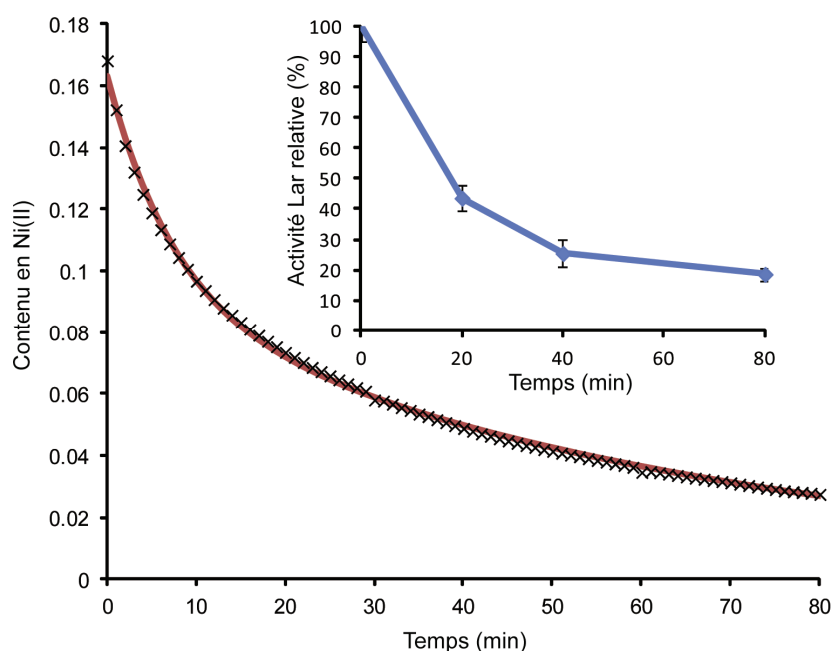


Figure 50. Evolution au cours du temps du contenu en nickel de LarA_{Lp} suivi par dosage au 4-(2-pyridylazo)résorcinol. Les marques noires représentent les données expérimentales et la ligne rouge la courbe ajustée selon l'équation suivante : $Y = \exp(1.66 - 0.0152 \cdot X) + \exp(1.44 - 0.134 \cdot X)$. L'encart représente l'évolution au cours du temps de l'activité lactate racémase relative de LarA_{Lp}. L'activité au temps 0 est fixée à 100%. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95% (test de Student).

IV.1.5. Présence d'un deuxième cofacteur

On pourrait admettre que d'autres ligands puissent être nécessaires à l'activité lactate racémase de LarA. En effet, le domaine B de LarA_{Tt} comporte une cavité délimitée, entre autres, par certains résidus conservés (Fig. 51). Le volume de cette cavité est de 359 Å³ dans le premier monomère et de 295 Å³ dans le deuxième monomère (Fig. 51), elle pourrait donc facilement accueillir un petit cofacteur, en plus du nickel. Ce cofacteur pourrait même coordonner lui-même le nickel. Le fait que trois protéines accessoires soient nécessaires à l'activation de la lactate racémase montre que le mécanisme d'activation est probablement plus complexe que la seule incorporation de nickel dans le site catalytique. S'il existe bien, ce cofacteur est probablement synthétisé par les protéines accessoires (discuté au point IV.2.1). Malgré nos recherches, nous n'avons jamais pu caractériser la nature de ce cofacteur ni même pu l'isoler à partir de la lactate racémase.

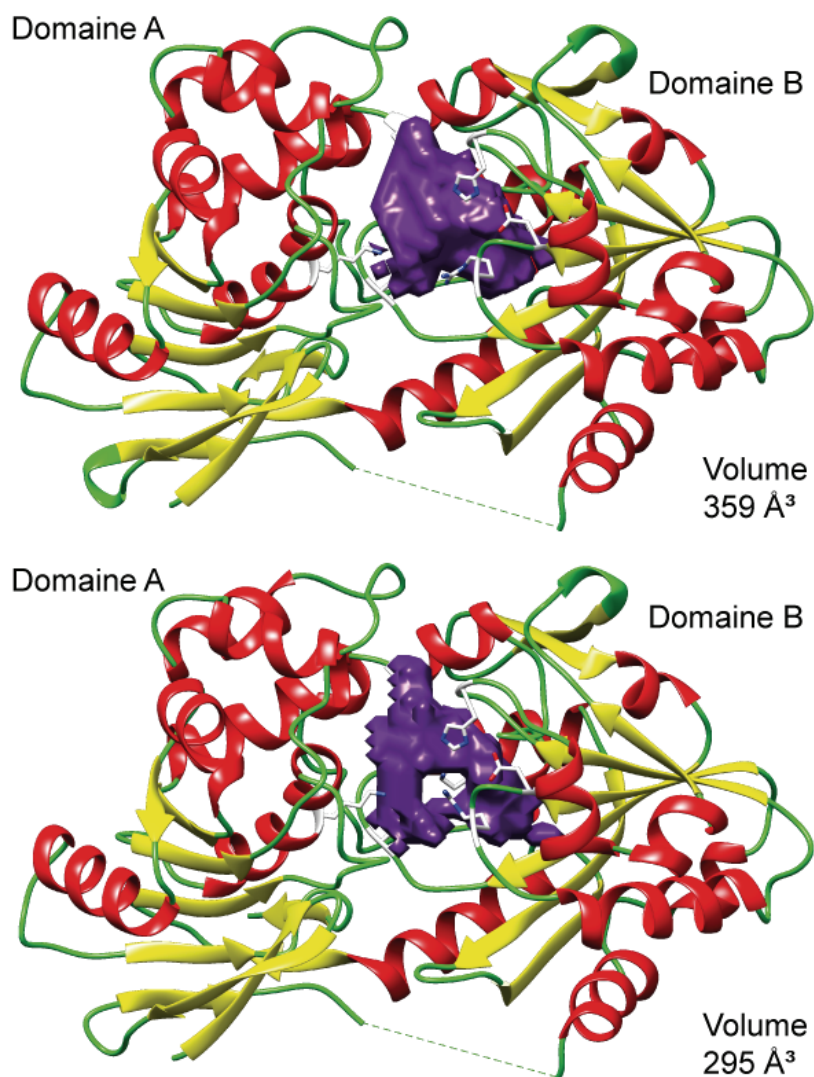


Figure 51. Volume accessible au sein du domaine B du premier monomère (en haut) et du deuxième monomère (en bas) de LarA_{Tb}, calculé avec le programme 3V (<http://3vee.molmovdb.org/>). Les hélices α sont en rouge, les brins β en jaune et les boucles sont en vert. Les résidus catalytiques D72, R75, His108, His174, Lys184 et Lys 298 sont en représentation par bâtonnets avec la C en blanc, le N en bleu et le O en rouge. Le volume détecté au sein du domaine B est en mauve.

La seule indication claire que nous ayons obtenue de la présence de ce cofacteur est la comparaison des masses totales de différentes formes de LarA_{Lp} (Table 6). Après avoir été activée par les protéines accessoires,

LarA_{Lp} montre une masse excédentaire de 409 ± 3 Da par rapport à l'apoprotéine (Table 6). Étonnamment, aucune différence de masse n'a été observée pour les mêmes formes de LarA_{Tt}. Si ce cofacteur existe bel est bien, sa masse devrait donc se situer autour de 409 Da, sans le nickel vu la fuite du nickel hors du site catalytique.

Table 6. Mesure des masses totales des protéines LarA, LarB, LarC et LarE par ESI-TOF.

Protéine ^a	Masse (Da) ^b				dimère
	observée	théorique	$\Delta(\text{ob-th})^c$	$\Delta(\text{ob-th-Nter})^d$	
LarA _{Tt} ^{NiBCE}	47944	48076.3	-132.3	-1.1	non observé
LarA _{Tt} ^{Ni}	47944	48076.3	-132.3	-1.1	non observé
LarA _{Lp} ^{NiBC} E	47803	47523	280	411.2	non observé
LarA _{Lp} ^{Ni}	47394	47523	-129	2.2	non observé
LarB ^{Ni}	26549	26490.9	58.1	189.3	oui
LarC ^{Ni}	29999	29977.6 ^{&}	21.4	152.6	oui
LarE ^{NiBC}	31667	31681.2	-14.2	117	oui

^aPROTEINE^{NiBCE} : la protéine a été purifiée à partir de cellules de *Lc. lactis* exprimant les protéines accessoires LarB, LarC et LarE et cultivées en présence de 1 mM de NiCl₂.

^bUne reureur de ± 3 Da est à prendre en compte dans la détermination de la masse observée.

^cmasse théorique de LarC1.

^d $\Delta(\text{ob-th})$: différence entre la masse observée et théorique. th-Nter : masse théorique sans la méthionine N-terminale.

Le sulfite est connu comme inhibiteur de nombreuses flavoprotéines, si liant de manière réversible au cofacteur de type flavine. Cette inhibition semble être corrélée à la sensibilité à l'oxygène des flavoprotéines (280). Vu que le sulfite inhibe fortement la lactate racémase et que celle-ci est également sensible à l'oxygène, la lactate racémase pourrait-elle être une flavoprotéine ? La riboflavine, par exemple, a un poids de 376 Da. Une riboflavine oxydée aurait donc un poids de 408 Da, ce qui correspond au poids observé chez LarA_{Lp}. En outre, le volume occupé par la riboflavine est de 305 Å³ (calculé grâce au programme Molinspiration Property Calculator sur le site <http://www.molinspiration.com/>), ce qui correspond à l'espace disponible dans la cavité présente au sein du domaine B de LarA_{Tt} (Fig. 51). Vu qu'un complexe entre de l'histidinate de Ni(II) et de la riboflavine a été observé *in vitro* (281), une flavine pourrait aider à coordonner le nickel.

Mais si la riboflavine était présente dans LarA, on devrait observer un spectre caractéristique avec des pics d'absorptions à 276 nm, 373 nm et 447 nm. Le spectre d'absorption de LarA possède deux pics d'absorption autour de 300 nm et 420 nm (Fig. 52A et C), ce qui ne correspond donc pas au spectre d'une flavine. Par ailleurs, ce spectre d'absorption émet en fluorescence autour de 570 nm et diminue après « bleaching » aux ultraviolets (Fig. 52B et C). L'observation de ce spectre à partir de l'apoenzyme de LarA_{Lp} (Fig. 52A) montre cependant qu'il n'est pas dépendant de la présence des protéines accessoires et qu'il ne provient donc probablement pas du cofacteur coordonnant le nickel. Nous n'avons cependant aucune autre information sur la nature du chromophore donnant à LarA ce spectre particulier.

L'analyse du surnageant après dénaturation thermique, chimique ou protéolytique de LarA ne nous a pas permis d'identifier un quelconque cofacteur et les pics d'absorptions observés chez LarA n'ont pas pu être observés dans le surnageant après dénaturation de la protéine. Il n'est pas exclu que ce cofacteur soit extrêmement sensible à l'oxydation, à la lumière ou encore à la chaleur. Ceci expliquerait d'une part pourquoi nous n'avons pas réussi à l'identifier et d'autre part pourquoi l'enzyme s'inactive en perdant son nickel. En effet, si ce cofacteur est impliqué dans la coordination du nickel, sa dégradation va logiquement de pair avec la fuite du nickel du centre catalytique.

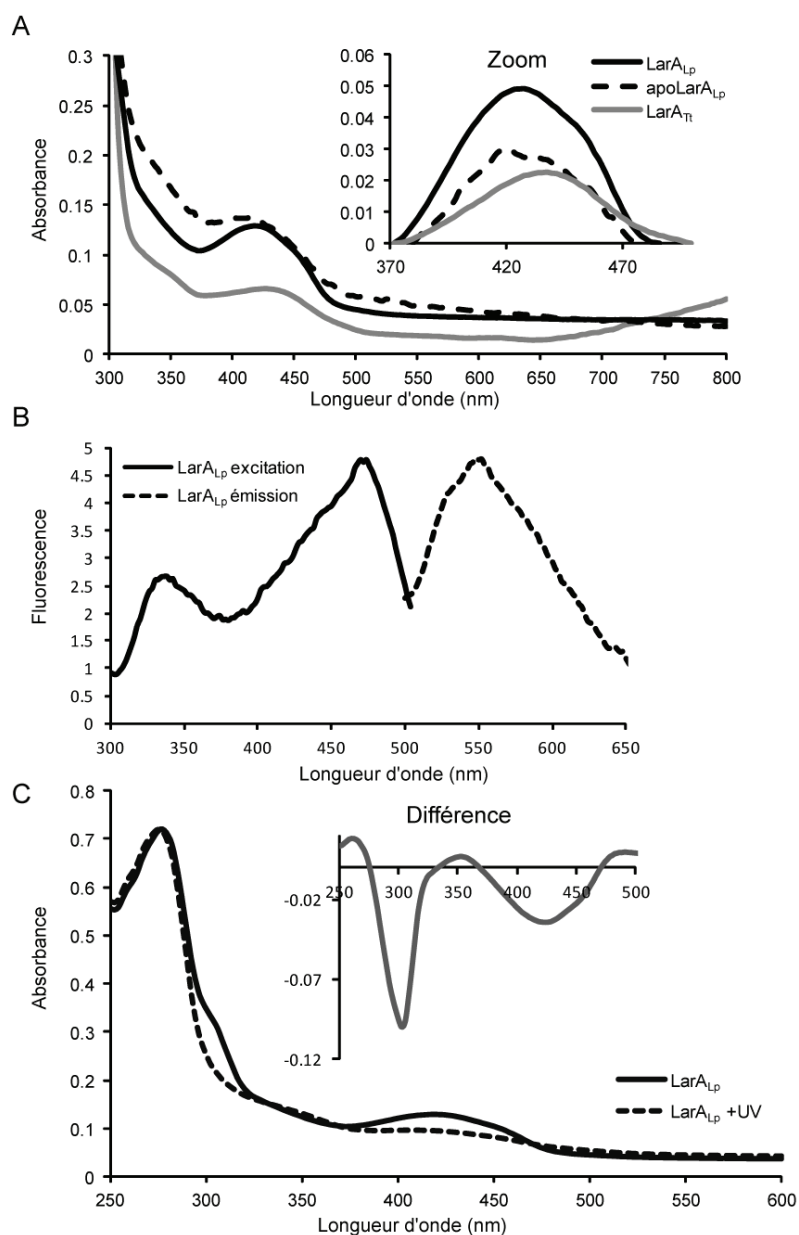


Figure 52. **A**, spectre d'absorption de LarA_{Tt}, LarA_{Lp} et apoLarA_{Lp} (LarA purifié en absence des protéines accessoires). Les concentrations en protéine utilisées sont les suivantes : LarA_{Lp} 0,9 mg/ml, apoLarA_{Lp} 0,6 mg/ml et LarA_{Tt} 18 mg/ml. Dans l'encart, un zoom sur la région comprise entre 370 et 500 nm avec la droite reliant le début et la fin des pics d'absorption comme ligne de base. **B**, spectres d'excitation et d'émission de LarA_{Lp} concentré à 6 mg/ml. **C**, spectre d'absorption de LarA_{Lp} concentré à 0,9 mg/ml avant et après 2 min de « bleaching » aux ultraviolets. La différence entre les deux spectres est mise en évidence dans l'encart.

IV.1.6. Structure de la lactate racémase

La particularité de la lactate racémase se marque particulièrement au niveau de sa structure. Une comparaison de la structure de LarA_{Tt} avec toutes les structures connues via l'algorithme VAST (282) indique que la structure de LarA ne ressemble globalement à aucune structure connue. Pourtant, on peut identifier une certaine ressemblance entre chacun des domaines de LarA et d'autres structures connues.

On observe en effet une certaine similarité entre le domaine A de la lactate racémase et le petit domaine de la triméthylamine déshydrogénase (TMD), dont la fonction est inconnue (283). Cependant, certains éléments de la structure secondaire de LarA, notamment trois brins β et quatre hélices α , n'ont pas de correspondant dans le petit domaine de la TMD (III.1 Fig. S11 p. 135). De plus, le feuillet β qui forme le cœur du domaine A est plus étendu que celui du petit domaine de la TMD d'un brin β (III.1 Fig. S11 p. 135). Ceci montre que la topologie du domaine A de la lactate racémase est nouvelle. Afin de confirmer la nouveauté de ce domaine, nous avons parcouru la base de données de classification des structures de protéines « SCOP » à la recherche d'un domaine de protéine de topologie 162345 avec 6 brins parallèles (comme observée dans le domaine A). Aucune topologie de ce type ne se trouve dans la base de données.

On observe également une certaine similarité entre le domaine B de la lactate racémase et plusieurs méthyle transférases dépendantes de la SAM (284). Ici aussi, certains éléments de la structure secondaire de LarA, notamment deux brins β et trois hélices α , ne trouvent pas de correspondant (III.1 Fig. S11 p. 135). Le feuillet β qui forme le cœur de la lactate racémase n'est pas non plus équivalent à celui des méthyle transférases : le feuillet est en effet composé de seulement 6 brins β , le sixième brin correspondant au septième brin du feuillet β des méthyle transférases (III.1 Fig. S11 p. 135). Cependant, dans la base de données « SCOP », on peut trouver d'autres repliements dont la topologie comprend également un feuillet β de topologie 321456 avec le brin 6 antiparallèles aux autres : le repliement des formyltransférases, par exemple. Cela signifie que la topologie du domaine B de la lactate racémase a déjà été observé dans d'autres repliements et qu'elle n'est donc pas aussi originale que la topologie du domaine A. Cependant, cette ressemblance ne concerne que la topologie du feuillet β , pas la structure globale du domaine B.

Même si la structure est nouvelle, certains éléments ressemblant à des structures connues peuvent nous éclairer quant à leur fonction. En effet, la ressemblance avec des méthyle transférases suggère, malgré les différences notées, que le domaine B de la lactate racémase puisse lier la SAM. Malheureusement, outre le fait qu'aucune amélioration significative de l'activité Lar n'ai été observée en présence de SAM (III.1 Table S2 p. 116), aucun des motifs reconnus pour lier la SAM ne se trouve dans la séquence primaire de LarA aux endroits où ceux-ci devraient logiquement se trouver (285) (III.1 Fig. S9 p. 129). De plus, la structure 3D du site de liaison de la SAM des méthyle transférases n'est pas conservée dans la structure 3D de la lactate racémase (III.1 Fig. S11 p. 135). Il est donc fort improbable que la lactate racémase lie la SAM comme cofacteur.

Une autre particularité de la structure de la lactate racémase est la présence, dans chacun des monomères, d'un site actif légèrement différent. Le résidu Arg75, particulièrement, adopte deux conformations très différentes d'un monomère à l'autre (Fig. 48 p. 253). Cette différence est encore accentuée par la présence, dans un monomère, d'une molécule de glycol, remplacée par un ion sulfate dans l'autre monomère (III.1 Fig. S8 p. 128). Ce type d'asymétrie a déjà été observé dans d'autres protéines homodimérique (286) et pourrait jouer un rôle dans la catalyse en favorisant, par exemple, un équilibre entre une forme ouverte et une forme fermée de la protéine (287). Les deux conformations observées pourraient donc correspondre soit à la présence ou l'absence de cofacteur, soit à la présence ou l'absence de substrat, ou encore à la présence de L- ou de D-lactate dans le site catalytique. Le rôle de chacune de ces deux conformations reste encore à élucider.

IV.2. Les protéines accessoires

IV.2.1. Activation de LarA

Les délétions réalisées dans l'opéron *larA-E* ont montré que les quatre gènes *larA*, *larB*, *larC1C2* et *larE* sont nécessaires à l'activité de racémisation du lactate *in vivo* (III.1 Fig. 1C p. 112). La purification de LarA a montré que cette protéine était la lactate racémase au sens strict (III.1 Fig. 1E p. 112). Le fait que l'expression des autres gènes soit également nécessaire à l'activité Lar indique que leur rôle serait d'activer LarA. L'activation de LarA par LarE a pu être démontrée *in vitro*, confirmant par là le rôle clé de cette

protéine accessoire dans le processus d'activation (III.1 Fig. 1E p. 112). La fonction d'activation de LarE n'a pu être montrée que quand *larE* était surexprimée en présence de *larB* et de *larC*, confirmant également le rôle des protéines LarB et LarC dans la maturation de LarA, même si cette maturation s'effectue via LarE (III.1 Fig. 1E p. 112).

IV.2.1.1. Rôle de LarB

LarB a été purifiée mais seulement en absence des autres protéines Lar dans l'extrait (III.1 Fig. 1D p. 112). En effet la purification de LarB à partir d'une surexpression de l'opéron *larA-E* n'a pas pu être réalisée. Ceci peut soit être dû à la moins bonne stabilité de LarB ou alors au fait que LarB forme un complexe avec d'autres protéines Lar et que, dans ce complexe, le Streptag ne soit pas accessible. De plus, la présence d'un détergent, le Triton X-100, était nécessaire afin de purifier LarB à partir des extraits de *Lc. lactis* (III.1 *Materials and Methods* p. 145). LarB est donc assez hydrophobe et serait vraisemblablement localisée à la membrane plasmique. Cette hypothèse est supportée par le fait que la séquence de LarB possède deux motifs qui ressemblent à des traverses transmembranaires dans sa partie N-terminale. Si LarB est bien une protéine membranaire périphérique, la raison de son ancrage dans la membrane cytoplasmique est inconnue. L'analyse par spectrométrie de masse de LarB montre que LarB se trouve sous forme monomérique ou dimérique en solution et qu'elle possède un excédent de masse de 58 ± 3 Da par rapport à la masse théorique, probablement du à un NaCl (Table 6 p. 264). LarB n'est pas chargée en nickel (III.1 Fig. 1F p. 112).

IV.2.1.2. Rôle de LarC

Comme LarB, LarC a été purifiée en absence des autres protéines Lar dans l'extrait, la purification de LarC à partir d'une surexpression de l'opéron *larA-E* n'ayant pas pu être réalisée. Le gel SDS-PAGE de la purification de LarC montre un mélange de deux formes de la protéine : la forme complète LarC1C2 et la forme tronquée LarC1 (III.1 Fig. 1D p. 112). Ceci s'explique par la présence, à la fin de *larC1*, d'un décalage programmé du cadre de lecture qui permet la synthèse de la protéine complète LarC1C2 (10). L'identité de ces deux formes de la protéine a été confirmée par MALDI-TOF à partir d'une digestion à la trypsine des deux bandes du gel SDS-PAGE (III.1 Dataset S1 sur CD-ROM). De nombreux homologues à LarC ne possèdent pas ce décalage programmé du cadre de lecture et sont donc

uniquement exprimées sous la forme LarC1C2 (III.1 Dataset S5 sur CD-ROM). Afin de savoir si LarC2 est bien indispensable à l'activité de LarC, nous avons effectué la délétion de *larC2* dans l'opéron *larA-E* surexprimé chez *Lc. lactis*. L'opéron *larA-E ΔlarC2* ne montre aucune activité Lar alors qu'en rendant le décalage programmé du cadre de lecture constitutif on garde l'activité Lar (III.1 Fig. S1 p. 113). Ces données montrent que LarC1C2 est la forme physiologique de LarC. Le rôle de ce décalage du cadre ouvert de lecture est intrigant, il semble que sa fonction soit de permettre la synthèse de la protéine tronquée LarC1 afin de limiter le nombre de LarC1C2.

Le dosage du nickel dans LarC nous indique que la protéine lie entre 7 et 9 ions nickel par monomère (III.1 Fig. 1F p. 112). L'analyse par spectrométrie de masse de LarC montre que le pic le plus important correspond à un excédant de masse de 153 ± 3 Da par rapport à la masse théorique de LarC1 sans la méthionine N-terminale (Table 6 p. 264). De nombreux pics additionnels sont cependant observés autour de celui-ci, indiquant que LarC1 est chargé de plusieurs ions différents (Fig. 53). Il semble donc que LarC1 soit capable de lier de nombreux ions et particulièrement des ions nickel. Ces données sont cohérentes avec la surreprésentation d'histidines dans la séquence de LarC1 (8.0% vs. 1.7% en moyenne dans les protéines de *L. plantarum* (288)) et avec le fait que LarC1 contienne une région de 14 résidus comprenant 9 histidines. Par comparaison, l'UreE de *K. aerogenes* contient 10 histidines résidus parmi ses 15 acides aminés C-terminaux et lie 6 ions nickel (201). Le rôle de LarC1 pourrait donc être, par analogie avec UreE, de stocker les ions nickel avant leur transfert vers LarE et LarA *in fine*. Le rôle de LarC2, par contre, ne semble pas lier au stockage de nickel vu que la séquence de LarC2 ne contient que deux histidines. LarC2 pourrait néanmoins être impliquée dans le transfert des ions nickel vers LarE. LarC1 pourrait donc servir au stockage du nickel et LarC1C2 au stockage et au transfert du nickel vers LarE. LarC1 semble également exister sous forme dimérique, comme LarB (Table 6 p. 264). Étonnamment, aucun pic correspondant à LarC1C2 n'a été observé en spectrométrie de masse (Table 6 p. 264), ce qui semble indiquer qu'il soit moins stable que LarC1.

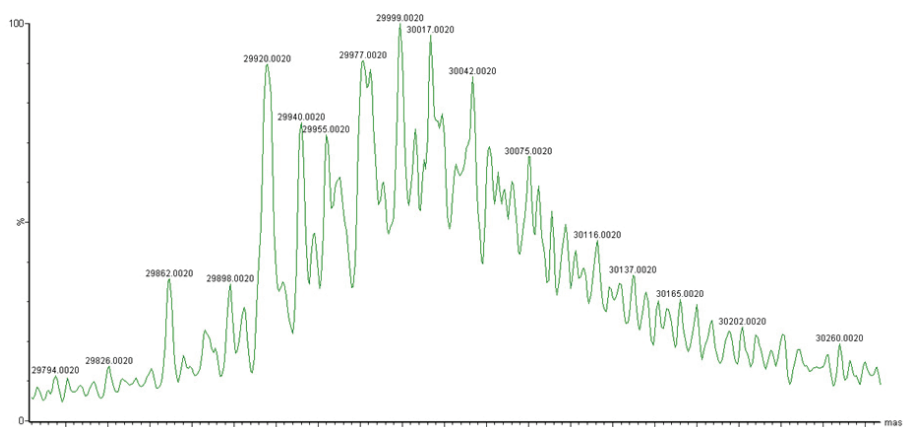


Figure 53. Zoom sur les masses totales de LarC mesurées par ESI- TOF autour de 30kDa.

IV.2.1.3. Rôle de LarE

LarE possède un motif conservé dont le consensus est SXGXDS, caractéristique de la superfamille des enzymes à PP-loop (11), LarE serait donc une ATPase hydrolysant l'ATP en AMP et pyrophosphate. Cette hydrolyse libère de l'énergie que LarE peut utiliser dans le processus d'activation de LarA. Une particularité de LarE est son insolubilité en condition de faible osmolarité. En effet, LarE est soluble jusqu'à une haute concentration dans un tampon contenant au moins 200 mM de sel (NaCl par exemple), mais précipite quand la teneur en sel chute en dessous de cette valeur. Par analogie avec UreG, qui est désordonnée en solution et n'acquiert sa structure et son activité GTPase qu'en interagissant avec ses partenaires (238), LarE pourrait être en partie désordonnée. LarE a été purifiée en présence des autres protéines Lar et en absence de celle-ci (III.1 Fig. 1D p. 112). LarE purifiée en présence de LarB, LarC et de nickel est chargée à hauteur de 45% en nickel, selon la mesure par chélation avec du 4-(2-pyridylazo)résorcinol (III.1 Fig. 1F p. 112). Selon une mesure d'absorption atomique après minéralisation, le chargement de LarE en nickel dans ces conditions serait plutôt de 80% (III.1 Fig. 1F p. 112). La différence entre ces deux mesures montre qu'une partie du nickel présent dans LarE pourrait ne pas être disponible à la chélation. Quand LarE est exprimé en absence de LarB et de LarC, son taux de nickel est pratiquement nul (III.1 Fig. 1F p. 112), ce qui montre que ces protéines sont impliquées dans le chargement de LarE en nickel et, de manière plus générale, dans la préparation de LarE en vue de l'activation de LarA.

L'analyse par spectrométrie de masse de LarE montre que la protéine possède un excédent de 117 ± 3 Da par monomère de plus que la masse théorique de LarE sans la méthionine N-terminale (Table 6 p. 264). Cette différence peut correspondre à l'ajout de deux Ni (58,7 Da), de deux NaCl (58,4 Da) ou d'une combinaison des deux. L'analyse par spectrométrie de masse de LarE nous indique également que LarE existe sous forme dimérique, comme LarB et LarC1 (Table 6 p. 264).

Vu que LarE joue un rôle central dans le processus d'activation de LarA, la résolution de sa structure tridimensionnelle pourrait être cruciale pour la compréhension de ce mécanisme. Plusieurs essais de cristallisation de la protéine LarE ont été entrepris, sans succès. De très fins cristaux ont été obtenus dans certaines conditions, mais n'étaient pas diffractables. Des cristaux diffractables ont été obtenus dans d'autres conditions, mais les cristaux étaient maclés et la résolution de la structure n'a pas été possible.

IV.2.1.4. Mécanisme d'activation de LarA

Quand LarE est surexprimée en présence de LarB, de LarC et de nickel, elle est capable d'activer apoLarA *in vitro* sans rien d'autre dans le tampon (III.1 Fig. 1E p. 112). L'ATP ou le GTP n'ont aucun effet sur cette étape de l'activation, indiquant que l'hydrolyse de NTP ait probablement eu lieu dans une étape précédente du processus d'activation (III.1 Table S2 p. 116). La vitesse avec laquelle cette activation prend place est également une indication que l'étape d'activation d'apoLarA ne nécessite aucun cofacteur autre que ceux déjà présents dans LarE. Pourtant, seulement une faible proportion de LarE est capable d'activer apoLarA car il faut un excès d'environ 150 LarE par apoLarA pour obtenir une activation complète de cette dernière (III.1 Fig. S3 p. 115). Il pourrait donc n'y avoir qu'une faible fraction de LarE qui soit « prête » à activer apoLarA. Cela montre que la première partie du processus d'activation, c'est-à-dire la préparation de LarE, soit probablement l'étape limitante. Une autre limitation semble être liée à LarA, en effet apoLarA_{Lp} semble bien moins « activable » qu'apoLarA_{Tt} (III.1 Fig. 1E p. 112 et Fig. S1C p. 113), malgré le fait que les protéines accessoires utilisées pour l'activation soient celles de *L. plantarum*.

Malgré les efforts fournis et les différentes combinaisons de cofacteur et de protéines LarB, LarC, LarE utilisées pour activer apoLarA, nous n'avons jamais pu stimuler significativement le mécanisme d'activation d'apoLarA par LarE *in vitro* (III.1 Table S2 p. 116). On observe une meilleure

conservation de l'activité Lar en présence de LarC, mais celle-ci n'est pas différente de la conservation d'activité observée par ajout de NiCl_2 (III.1 Table S2 p. 116). La SAM et la cystéine semblent également avoir un effet similaire (III.1 Table S2 p. 116), probablement via un mécanisme de protection vis-à-vis des radicaux libres, comme observé pour la vitamine C (III.1 Fig. S4 p. 117).

Afin de voir si les protéines Lar purifiées pouvaient montrer une quelconque activité *in vitro*, nous avons mélangé chacune des protéines Lar purifiée avec un extrait de *Lc. lactis* contenant la surexpression de toutes les autres protéines Lar. De cette manière, on suppose que si un cofacteur est nécessaire à l'activité des protéines accessoires, il soit présent dans l'extrait cellulaire. La seule protéine pour laquelle nous avons eu du succès est LarA, qui peut être facilement activée en présence d'un extrait de *Lc. lactis* contenant la surexpression de LarB, LarC et LarE. Toutes les autres combinaisons se sont révélées infructueuses (Table 7). En conclusion, il semble que la première étape du processus d'activation, c'est-à-dire la préparation de LarE par LarC et LarB, ne puisse pas se réaliser *in vitro* dans les conditions testées. Vu que LarB semble être ancrée dans la membrane, cette étape se déroule peut-être seulement au contact d'une membrane cellulaire intègre et ne peut plus avoir lieu une fois les cellules lysées. Alternativement, cette étape ne peut être réalisée qu'en anaérobie.

Finalement, l'interaction des protéines Lar entre elles a été investiguée par double hybride bactérien (B2H) (Fig. 54) (289). A part l'interaction de LarA, LarB et LarE avec elles-mêmes, nous n'avons observé aucune interaction croisée (Fig. 54). Le fait qu'on observe quand même une interaction de certaines protéines Lar avec elles-mêmes montre que le système est fonctionnel et confirme la formation de dimères de LarA, LarB et LarE en solution. Cela ne démontre pas que les protéines Lar n'interagissent pas entre elles, car il pourrait y avoir de nombreuses raisons qui empêchent l'observer d'une interaction en B2H. Entre autres, le fait qu'on soit dans un hôte hétérologue chez qui l'activité des protéines Lar n'a pas été vérifiée, que les protéines soient fusionnées avec un domaine de l'adénylate cyclase et finalement que tous acteurs ne soient jamais présents que deux à la fois, sont autant de raisons pour lesquelles aucune interaction en B2H n'ait été observée.

Table 7. Activité Lar d'extraits bruts de cultures de *Lc. lactis* exprimant les protéines Lar complémentés par ajout des protéines Lar purifiées.

Protéines purifiées	apo LarA	LarB	LarC	apo LarE	apo LarA +LarB	apo LarA +LarC	apo LarA +apo LarE
Extraits de <i>Lc. lactis</i>							
Extrait	0	0	0	0	NT	NT	NT
Extrait LarBCE (ΔA)	1	0	0	0	1	1	1
Extrait LarACE (ΔB)	0	0	NT	NT	0	NT	NT
Extrait LarABE (ΔC)	0	NT	0	NT	NT	0	NT
Extrait LarABC (ΔE)	0	NT	NT	0	NT	NT	0
Extrait LarACE (ΔB) + extr. LarABE (ΔC)	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT
+ extr. LarABC (ΔE)							

Les protéines LarB, LarC et LarE ont été purifiées à partir de cellules de *Lc. lactis* cultivées en présence de 1 mM de NiCl₂. 1 : présence et 0 : absence d'activité Lar. NT : non testé.

A

Protein fusion	LarA-T25 T25-LarA	LarB-T25 T25-LarB	LarC-T25 T25-LarC	LarE-T25 T25-LarE
LarA-T18				
T18-LarA				
LarB-T18				
T18-LarB				
LarC-T18				
T18-LarC				
LarE-T18				
T18-LarE				

B

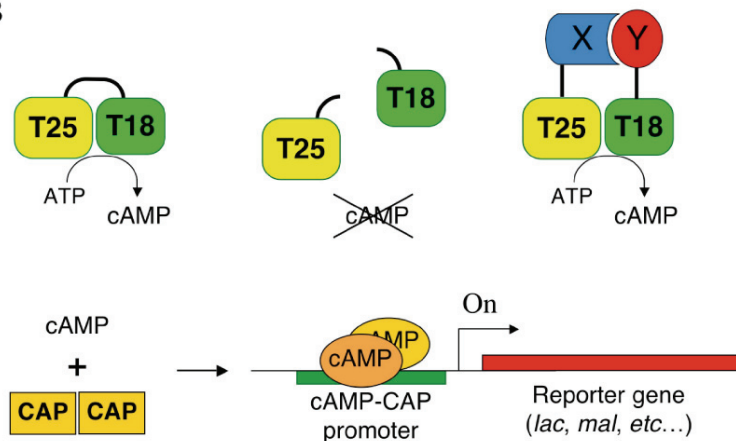


Figure 54. A, colonies d'*E. coli* DHP1 (Δcya) transformées par combinaison de deux plasmides, l'un portant la sous-unité T18 et l'autre la sous-unité T25 de l'adénylate cyclase fusionnée par le N-terminus ou par le C-terminus à un gène *lar*. Les colonies exprimant le gène de la β -galactosidase hydrolysent le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal), colorant celles-ci en bleu. **B**, principe du B2H : l'interaction entre deux protéines X et Y permet l'association des deux sous-unités T25 et T18 de l'adénylate cyclase, la synthèse d'AMP cyclique et l'expression du gène rapporteur. CAP : régulateur transcriptionnel Crp.

IV.2.2. Comparaison avec d'autres systèmes d'activation

Les séquences des protéines accessoires LarB, LarC et LarE ne révèlent aucune ressemblance avec les séquences des autres protéines accessoires impliquées dans l'activation d'autres protéines à nickel. Pourtant, on peut établir une certaine analogie entre LarC et UreE ainsi qu'entre LarE et UreG, comme discuté aux points IV.2.1.2. et IV.2.1.3. Malgré ces analogies, le système d'activation de LarA ne ressemble en rien au système d'activation de l'uréase. En effet, le processus d'activation de l'uréase fonctionne avec quatre protéines accessoires qui sont toutes nécessaires à l'activation complète de l'uréase *in vitro* (237) (Fig. 32 p. 74), alors que LarE seule est capable d'activer LarA *in vitro* (III.1 Fig. 1E p. 112).

Les systèmes d'activation des autres enzymes à nickel sont différents également. Le système de la [NiFe]-hydrogénase fonctionne avec 6 ou 7 protéines accessoires qui assemblent le noyau NiFe progressivement sur la grosse sous-unité (Fig. 27B p. 67). La dernière étape, l'incorporation de nickel dans le site catalytique, peut être remplacée par l'ajout d'un excès de nickel dans le milieu. Le système de la CODH fonctionne avec deux protéines accessoires qui peuvent également être remplacées par un excès de nickel (8) (Fig. 38 p. 79). Dans le système Lar, la délétion de LarC ne peut pas être remplacée par ajout de Ni (III.1 Fig. 1C p. 112), ce qui montre que LarC possède probablement une fonction qui n'est pas limitée au stockage et à la distribution du Ni.

Pour les autres enzymes à nickel, le mécanisme d'activation est inconnu (8).

Etonnamment, le système d'activation de LarA possède une certaine ressemblance avec le système d'activation des [FeFe]-hydrogénases. Ces hydrogénases, qui sont monomériques comme LarA, sont activées par les trois protéines accessoires HydG, HydE et HydF, qui sont des enzymes à noyau fer-soufre (Fig. 29 p. 71). Comme dans le système Lar, HydF est capable d'activer HydA, l'apoprotéine, quand elle est purifiée en présence de HydG et HydE. Cette activation est rapide et ne nécessite pas de cofacteur *in vitro*, mais nécessite un excès de HydF (234), comme l'activation de apoLarA par LarE. La formation du cofacteur commence d'abord sur HydG, qui le transfère ensuite à HydF, où il est encore associé à divers ligands et finalement transféré sur l'apoprotéine HydA (290). Cette activation peut être réalisée complètement *in vitro* grâce à l'ajout de lysat cellulaire et de divers

cofacteurs tels que la tyrosine, la SAM et le GTP (235) (Fig. 29 p. 71). L'analogie entre ce système et le système Lar nous montre qu'un cofacteur contenant du nickel soit probablement assemblé sur LarE et que la synthèse de ce cofacteur nécessite au moins LarB, LarC et du nickel. Il est difficile de déduire plus que cela de l'analogie entre ces deux systèmes, vu que le type de cofacteur synthétisé est probablement différent.

En conclusion, il semble que le système d'activation de LarA se situe entre celui de l'uréase et celui des [FeFe]-hydrogénases, mais aucune comparaison réelle ne peut être réalisée avec aucun de ces deux systèmes. On a bien affaire à un système complètement nouveau.

IV.2.3. Autres fonctions des protéines accessoires

En étudiant la présence d'homologues aux gènes *lar* dans plus de 1000 génomes de procaryotes, on trouve des homologues aux gènes *larB*, *larC* et *larE* dans près d'un quart des génomes étudiés (III.1 Fig. 3A p. 137). Pourtant, dans la majorité de ceux-ci, on ne retrouve pas d'homologue à *larA* (III.1 Fig. 3A p. 137). On peut en déduire que les protéines accessoires ont probablement une fonction plus générale que la seule activation de LarA.

Vu qu'on ne connaît pas les mécanismes d'activation de toutes les enzymes à nickel, il est tentant de penser que les protéines accessoires LarB, LarC et LarE peuvent être impliquées dans l'activation d'une autre enzyme à nickel que LarA. Si c'est le cas, on devrait retrouver des gènes homologues à *larB*, *larC* et *larE* dans tous les génomes où cette autre enzyme à nickel est présente. En comparant la présence de ces gènes avec la présence des gènes des autres protéines à nickel, on remarque que seuls les gènes de la MCR répondent à ce critère. On retrouve en effet des homologues à *larB*, *larC* et *larE* dans les 35 génomes d'archées méthanogènes (III.1 Dataset S4 sur CD-ROM). Parmi ces 35 génomes, 26 ne possèdent en outre pas d'homologue à *larA*. Comme on ne connaît pas les enzymes impliquées dans la synthèse du Facteur 430, le cofacteur de la MCR, on pourrait imaginer que LarB, LarC et LarE fasse partie de cette voie de biosynthèse. Celle-ci implique au moins 6 étapes et il est donc peu probable que ces 3 protéines soient responsable de l'entièreté de la voie de synthèse de ce cofacteur (239), mais elles pourraient être impliquées dans l'incorporation du nickel dans le noyau porphyrine et peut-être dans la réduction de celui-ci en Ni(I). Cette explication permet

d'éclaircir la présence des gènes de protéines accessoires dans certains génomes, mais cela n'explique pas encore la présence de ces gènes dans la majorité des génomes ou des homologues à *larB*, *larC* et *larE* se retrouvent sans homologue à *larA*.

Le cas des cyanobactéries est particulièrement illustratif de cette situation. En effet, parmi les 28 génomes de cyanobactéries étudiés, 27 possèdent des homologues à *larB*, *larC* et *larE* mais seul un génome parmi ces derniers possède un homologue à *larA* (III.1 Table S7 p. 137). La plupart des cyanobactéries possèdent un homologue de l'uréase ou la [NiFe]-hydrogénase (7), mais rien n'indique que les protéines accessoires aient un quelconque rapport avec ces enzymes à nickel, d'autant plus que le système d'activation de ces enzymes a déjà largement été décrit. A quoi serviraient donc les protéines accessoires chez les cyanobactéries ? De manière étonnante, un homologue à *LarB*, *CpmA*, est impliqué dans le cycle circadien des cyanobactéries, la délétion de ce gène entraînant une modification du signal de sortie du rythme circadien et un défaut de croissance des cellules (291). De plus, ce gène est particulièrement bien conservé chez les cyanobactéries (292). Le fait qu'un homologue à *LarB* joue un rôle dans le contrôle du rythme circadien des cyanobactéries laisse penser que les autres protéines accessoires pourraient également être impliquées. Il est pourtant difficile d'imaginer les protéines accessoires de *LarA* également impliquées dans la régulation du rythme circadien. Une piste pourrait être les porphyrines à nickel, en effet on a retrouvé des porphyrines contenant du nickel dans des ascidies, des organismes marins de l'embranchement des chordés vivant en symbiose avec des cyanobactéries. L'origine de ces porphyrines n'a pas été déterminé mais il est possible qu'elles proviennent des cyanobactéries symbiotiques (293). Si tel est bien le cas, on pourrait imaginer que les protéines accessoires *LarB*, *LarC* et *LarE* soient impliquées dans la synthèse de ces porphyrines à nickel chez les cyanobactéries. Le rôle de ces porphyrines à Ni, si elles existent, reste encore à découvrir.

IV.3. À quoi sert la racémisation du lactate ?

IV.3.1. Chez les bactéries lactiques

La production d'un mélange des deux isomères du lactate est une caractéristique partagée par la majorité des bactéries lactiques, sans qu'il y

ait une raison évidente à cela (19). L'incorporation de D-lactate dans leur peptidoglycane permet aux bactéries lactiques d'être intrinsèquement résistantes à la vancomycine et à d'autres glycopeptides antimicrobiens (77), mais la production d'une faible concentration de D-lactate par les réductases NAD-dépendantes à large spectre pourrait suffire à la synthèse des précurseurs du peptidoglycane, sans que la production équivalente des deux isomères soit nécessaire pour autant. De plus, cela n'explique pas que la production de L-lactate soit équivalente à celle de D-lactate, alors que seul du D-lactate pourrait être produit.

Chez les bactéries lactiques, la concentration intracellulaire en lactate excède facilement 200 mM en condition de croissance exponentielle (96). Mais cette concentration pourrait en réalité être encore plus élevée. En effet, *L. plantarum* est toujours capable de réaliser la fermentation lactique en présence de 300 mM de lactate extracellulaire (95). Afin d'excréter l'acide lactique produit, la concentration intracellulaire doit être supérieure à la concentration extracellulaire en acide lactique. Mais vu que *L. plantarum* a besoin de maintenir un gradient de protons vers l'extérieur, l'équilibre est déplacé vers une concentration en lactate intracellulaire nettement plus élevée. Une différence de pH entre le milieu et le cytosol de 0,4 unité, ce qui est une valeur minimale chez *L. plantarum* (294), impliquerait une concentration intracellulaire en lactate 2,5 fois supérieure à la concentration extracellulaire, c'est-à-dire 0.75 M de lactate. Une telle concentration en lactate pourrait inhiber les Ldhs et mener à une accumulation intracellulaire de pyruvate. Dans de telles conditions, *L. plantarum* a d'ailleurs tendance à réorienter son métabolisme vers la production d'autres produits de fermentation tels le malate, l'acétate et l'éthanol (95).

Si la concentration en lactate ressentie par une Ldh est réduite de moitié, l'inhibition est diminuée et la quantité de lactate produit peut augmenter. Cette réduction de la concentration en lactate ressentie, c'est ce que fait la lactate racémase en présence d'un excès de L-lactate. En racémisant 1 M de L-lactate en 1 M de DL-lactate, la concentration en lactate ressentie par la L-Ldh est diminuée de moitié. Dans le cas où une seule Ldh est présente, comme chez *L. sakei*, la racémisation du lactate pourrait donc permettre à la L-Ldh de produire une plus grande quantité de lactate. Mais dans le cas où la bactérie possède les deux Ldhs (L-Ldh et D-Ldh), comme *L. plantarum*, l'activité de racémisation du lactate fait double emploi avec les deux Ldhs. Néanmoins, une racémase peut s'avérer utile dans le cas où une quantité

extracellulaire élevée en L-lactate est présente ou quand l'activité D-Ldh est faible. L'activité D-Ldh pourrait chuter en condition de non-croissance (295) ou en condition de stress thermique, par exemple. Les D-Ldhs sont en effet plus sensibles à la chaleur que les L-Ldhs (3). Dans ces conditions, la lactate racémase peut s'avérer utile afin de continuer à produire un mélange racémique de lactate et donc produire plus de lactate *in fine*.

Chez les bactéries lactiques ne possédant qu'une seule Ldh, comme *L. sakei*, l'énergie gagnée par racémisation du lactate peut être calculée comme suit. La fermentation de glucose en deux molécules de L-lactate produit -205.2 kJ/mol dans les conditions standard (26). Si l'on considère une situation avec lactate racémase, la concentration de L-lactate sera divisée par deux. On aura donc une différence d'énergie égale à $R \cdot T \cdot \ln(0.5^2)$ avec $R = 8.314 \text{ J/mol/K}$ et T la température absolue (26), ce qui correspond à -3,44 kJ/mol. Cette énergie gagnée provient de l'augmentation de l'entropie lors de la racémisation du lactate. Cette différence est loin d'être négligeable, elle représente un supplément de 1,7 % d'énergie par rapport à la situation sans lactate racémase. Même si la bactérie ne pourra pas produire plus d'ATP par molécule de glucose consommée grâce à la racémisation du lactate, l'énergie supplémentaire pourra néanmoins permettre d'augmenter le flux de la réaction et finalement la quantité de lactate produit. Vu que la production de lactate est centrale dans le métabolisme de ces bactéries, on comprend l'importance que pourrait prendre la racémisation du lactate dans une telle situation.

Si la production d'un mélange racémique de lactate est si intéressante pour les bactéries lactiques, on peut dès lors se demander pourquoi toutes les bactéries lactiques ne produisent pas de mélange racémique. Certaines bactéries lactiques, telles que *Lc. lactis*, ne produisent pratiquement que du L-lactate alors que d'autres, telles que *Le. mesenteroides*, ne produisent que du D-lactate (19). Il a été montré chez *Lc. lactis* que l'excrétion de L-lactate pouvait être accompagnée de la sortie de deux protons, ce qui permet à la bactérie de générer un gradient de pH supplémentaire et donc de produire plus d'énergie par fermentation (97). Cette augmentation du rendement va forcément de pair avec une réduction du flux (26), ce qu'on peut simplifier en disant que *Lc. lactis* privilégie la qualité à la quantité. Ce symport de lactate avec deux protons est certainement réalisé par un transporteur, même si celui-ci n'a pas encore été identifié. Vu que ce transporteur est probablement spécifique envers le L-lactate, on comprend dès lors que la

production d'un mélange racémique de lactate ne soit pas bénéfique à *Lc. lactis*. De plus, la fermentation malolactique réalisée par *Lc. lactis* implique un antiporteur malate/lactate, qui est connu pour être spécifique envers le L-lactate (296). En ce qui concerne *Le. mesenteroides*, la réalisation de la fermentation citrolactique implique la consommation de citrate couplée à la production de D-lactate via un antiporteur citrate/lactate (104). Ce transporteur étant plus efficace avec du D-lactate comme substrat (296), on comprend dès lors que le D-lactate soit le produit majoritaire de fermentation de ces bactéries lactiques.

La lactate racémase peut également s'avérer utile pour la consommation de lactate, même chez les bactéries lactiques qui en produisent habituellement. En effet, *L. plantarum* est capable d'oxyder le lactate en acétate en aérobie (40), voire en anaérobie en présence de citrate (25) et utilise pour cela ses deux Ldhs NAD-dépendantes (41). Dans le cas où la D-Ldh serait inactive, la lactate racémase pourrait permettre à *L. plantarum* de consommer le D-lactate malgré tout.

IV.3.2. Chez les autres procaryotes

Parmi les 148 homologues à *larA* trouvés, seuls 6 appartiennent à des bactéries de l'ordre des lactobacilles, auquel appartiennent les bactéries lactiques (III.1 Table S7 p. 137). Cela signifie que la grande majorité des gènes de lactate racémases trouvés n'appartient pas à des bactéries lactiques. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, par exemple, chez qui nous avons montré la présence d'une lactate racémase (III.1 Fig. S1 p. 113), est une bactérie thermophile qui produit principalement de l'éthanol à partir de différents glucides. D'autres produits de fermentation sont le CO₂, l'acide lactique L et D, l'acide acétique et le 1,2-propanediol (297). Le fait que les deux isomères de lactate soient produits indique que la bactérie possède soit deux Ldhs stéréospécifiques, soit qu'elle possède une Ldh et une lactate racémase, soit les trois. L'analyse de son génome indique la présence d'une seule L-Ldh et l'inactivation de la L-Ldh d'une bactérie proche, *T. saccharolyticum*, abolit la production d'acide lactique (298). Il semble donc que *T. thermosaccharolyticum* produise du DL-lactate via la racémisation du L-lactate. La production d'un mélange racémique de lactate par cette bactérie lui permettrait de diminuer l'inhibition de la L-Ldh par son produit, comme discuté au point IV.3.1. Mais il est également possible que la bactérie puisse utiliser le lactate comme substrat et utilise la lactate racémase afin de

pouvoir consommer les deux isomères du lactate indifféremment. La fermentation de pyruvate en acétate et H_2 par cette espèce a été rapportée, mais pas la fermentation de lactate en acétate et H_2 , bien que les enzymes pour l'utilisation du lactate soient présentes (299). Cependant, vu le peu d'énergie produite par ce type de fermentation, celle-ci n'est possible qu'en présence d'un méthanogène consommant le H_2 , entraînant une relation de type syntrophique (cf. point I.1.3.2.2). Il est envisageable que la consommation de lactate par une coculture de *T. thermosaccharolyticum* et d'un méthanogène thermophile soit réalisable. Un argument en faveur de cette hypothèse est la présence, dans le génome de *T. thermosaccharolyticum*, d'une perméase à lactate de type LldP, généralement impliquée dans l'import de lactate (105).

On retrouve également des gènes de lactate racémase dans de nombreuses bactéries réductrices de soufre, tel que *D. desulfuricans* (III.1 Dataset S4 sur CD-ROM). Le lactate est un substrat typique des bactéries réductrices de soufre, qui sont généralement capables d'utiliser les deux isomères, bien qu'elles ne possèdent pas forcément les deux activités L-Ldh et D-Ldh (cf. point I.1.3.2.2). Les bactéries réductrices de métaux sont également friandes de lactate et la présence de gène de lactate racémase chez plusieurs espèces de *Geobacter* n'est donc pas étonnante (III.1 Dataset S4 sur CD-ROM). Il en va de même de nombreuses bactéries acétogènes, tel que *Moorella thermoacetica* (III.1 Dataset S4 sur CD-ROM). On ne s'étonnera pas non plus de la présence de gènes de lactate racémase chez *M. elsdenii* et chez *Se. sputigena* (III.1 Dataset S4 sur CD-ROM), des bactéries du rumen chez qui une activité de racémisation du lactate avait déjà été démontrée précédemment (cf. point I.1.3.2.3). *C. acetobutylicum*, qui est capable de fermenter le lactate en butyrate pour sa croissance, possède également une activité lactate racémase démontrée (171, 300). Chez toutes ces espèces utilisatrices de lactate, la présence d'une lactate racémase se justifie le fait qu'elle permet à la bactérie de consommer le D- et le L-lactate indifféremment, quelque soit la stéréospécificité de leur Ldh.

Chez certaines archées halophiles, tel que *H. marismortui*, *H. vallismortis* et *Hx. volcanii*, une activité Lar a été rapportée (174). Mais malgré la présence de gènes homologue à *larB*, *larC* et *larE* chez *H. marismortui* et chez *Hx. volcanii*, aucun gène homologue à *larA* n'a été identifié dans le génome de ces espèces (III.1 Dataset S4 sur CD-ROM). Vu que *H. marismortui* et *H. vallismortis* possèdent toutes deux une activité Ldh NAD-dépendante (174),

il est possible que l'activité de racémisation du lactate observée soit due à l'activité combinée de deux Ldhs NAD-dépendantes (L-Ldh et D-Ldh). Concernant *Hx. Volcanii*, l'activité Lar de cette espèce pourrait être souche-spécifique. En effet, la souche dont le génome a été séquencé n'est pas la même que la souche chez qui l'activité Lar a été rapportée (174, 301).

La présence de gènes homologues à *larA* dans de nombreux génomes de méthanogènes, principalement du genre *Methanosarcina* ou *Methanosaeta*, est curieuse (III.1 Dataset S4 sur CD-ROM). En effet, les méthanogènes n'utilisent pas de lactate pour croître (61), mais nécessitent néanmoins du L-lactate comme précurseur du cofacteur F₄₂₀ (32). Ce L-lactate peut provenir de l'oxydation du L-lactaldéhyde, lui-même produit par réduction du méthylglyoxal (92). Une voie alternative serait l'isomérisation du méthylglyoxal directement en D-lactate via la glyoxalase et ensuite la conversion du D-lactate en L-lactate via la lactate racémase. Vu la présence d'homologues à la glyoxalase dans les génomes de méthanogènes, cette hypothèse est réaliste.

Ce qui est encore étonnant aussi, c'est la présence des gènes de lactate racémase dans plusieurs génomes de *Frankia*, des actinomycètes symbiotes de plantes (III.1 Dataset S4 sur CD-ROM). Lors de leur vie libre, ces bactéries utilisent principalement des acides gras à courte chaîne pour leur croissance, mais pas de lactate. En symbiose, le type de substrat carboné donné par la plante est inconnu. Comme ces bactéries sont des fixatrices d'azote, elles doivent maintenir la pression en oxygène la plus basse possible afin de ne pas inhiber la nitrogénase (302). Elles pourraient pour cela utiliser une L-lactate oxydase afin de consommer l'oxygène présent, comme le font les cyanobactéries (34). Dans ce cas, la présence d'une lactate racémase pourrait se justifier afin de convertir le D-lactate éventuellement présent en L-lactate pour la L-lactate oxydase.

On peut conclure que la large répartition des gènes de lactate racémase dans les génomes de procaryotes illustre les nombreux types de métabolismes dans lesquels cette activité enzymatique pourrait intervenir. En effet, la racémisation du lactate n'est pas l'apanage des bactéries lactique mais est présente dans une large variété d'espèces consommant du lactate, généralement en anaérobiose. Comme le lactate est un produit de fermentation anaérobiose, il est logique qu'il soit plutôt consommé par des bactéries anaérobies, même si les bactéries aérobies sont généralement capables de dégrader le lactate également. C'est peut-être aussi la sensibilité de la lactate

racémase à l'oxygène qui favorise son utilisation par les bactéries anaérobies. Pourtant, certaines bactéries aérobies strictes possèdent des gènes de lactate racémase, comme *Starkeya novella*, par exemple (III.1 Dataset S4 sur CD-ROM). Vu qu'elle consomme du DL-lactate comme substrat (303), la lactate racémase peut en effet lui être utile.

IV.4. LarD et le transport de l'acide lactique

IV.4.1. Les différentes aquaglycéroporines de *L. plantarum*

Les bactéries possèdent généralement une ou deux protéines de canal de type MIP (123), ce nombre pouvant aller jusqu'à 4 chez les bactéries lactiques (126). *L. plantarum*, avec ces 6 protéines MIP, établit un nouveau record. Ce nombre va de pair avec la grande adaptabilité et la versatilité de *L. plantarum* (268), qu'on retrouve dans nombreuses niches écologiques et qui doit donc être capable d'adapter la perméabilité de sa membrane à une large variété de solutés.

L'analyse de 49 protéines MIP de *L. plantarum* et d'autres espèces de l'ordre des Lactobacillales nous permet de distinguer 5 groupes de protéines MIP (III.2 Fig. 1 p. 177). Les 6 protéines MIP de *L. plantarum* sont réparties dans chacun de ces 5 groupes, soulignant la flexibilité du potentiel de transport de *L. plantarum* (III.2 Fig. 1 p. 177). Dans certains cas, on peut déduire le type de soluté transporté par analyse du contexte génétique dans lequel se trouve le gène de la protéine MIP. En effet, les gènes d'utilisation des solutés sont souvent colocalisés avec leur protéine de transport (125). Ceci nous a permis de déduire que les protéines MIP du groupe des homologues à GlpF2 transportaient probablement du dihydroxyacétone, que les homologues à GlpF3 transportaient probablement du glycérol et que les homologues à GlpF4 et à GlpF1 (LarD) transportaient probablement de l'acide lactique, vu leur localisation dans des opérons d'utilisation du dihydroxyacétone, du glycérol et de la lactate racémase, respectivement (III.2 Fig. 1 p. 177). Il semble qu'entre les transporteurs de dihydroxyacétone et de glycérol, une certaine interconversion soit possible, vu la présence d'un transporteur de dihydroxyacétone parmi les transporteurs de glycérol et inversement (III.2 Fig. 1 p. 177). En outre, le propanediol pourrait également être un substrat de ces transporteurs, vu la présence au sein d'un opéron d'utilisation du

propanediol d'un gène de protéine MIP homologue à GlpF2 (III.2 Fig. 1 p. 177). Le quatrième groupe, composé d'homologues à GlpF5, est plus disparate. En effet, certains membres de ce groupe sont des homologues à Gla, un transporteur de glycérol et d'eau chez *Lc. lactis* (121) et d'autres font partie d'un opéron de racémisation du lactate. Les membres de ce groupe pourraient donc être assez peu spécifiques. Finalement le dernier groupe, composé d'homologues à GlpF6, semble être composé de transporteurs d'eau, vu leur homologie avec AqpZ d'*E. coli*. C'est aussi le seul groupe composé de protéines MIP du groupe des aquaporines (AQP), les autres groupes étant composés d'aquaglycéroporines (GLP).

Les données de transport obtenues en surexprimant les aquaglycéroporines de *L. plantarum* dans des oocytes de nous ont permis de confirmer nos déductions concernant le groupe des transporteurs de dihydroxyacétone, des transporteurs de glycérol et des transporteurs d'acide lactique (III.2 Fig. 2 p. 180 et Fig. 4B pp. 187). Ces trois transporteurs semblent par ailleurs fort proches du point de vue de leur spécificité. En effet, le dihydroxyacétone est non seulement transporté par GlpF2, mais également par GlpF3 et GlpF4 (III.2 Fig. 2 p. 180). Même chose pour le glycérol, qui est transporté non seulement par GlpF3, mais également par GlpF2 et GlpF4 (III.2 Fig. 2 p. 180). Le transport d'acide lactique, par contre, est strictement limité à GlpF4 (III.2 Fig. 4B p. 187).

Le fait que GlpF1 ne transporte pas d'acide lactique quand il est surexprimé dans des oocytes (III.2 Fig. 4B p. 187) ne prouve pas qu'il soit inactif chez *L. plantarum*. De fait, le transport d'acide lactique observé lors de sa surexpression dans la levure (III.2 Fig. 4A p. 187) et la réduction du transport d'acide lactique observée chez le mutant $\Delta glpF1$ de *L. plantarum* (III.2 Fig. 6 p. 192) nous montre que GlpF1 transporte bien de l'acide lactique, comme GlpF4.

IV.4.2. Rôle du transport d'acide lactique chez *L. plantarum*

Le transport d'acide lactique semble revêtir plusieurs rôles chez *L. plantarum*. La première fonction semble être l'échange d'acide lactique avec le milieu pour une racémisation plus rapide de celui-ci. En effet, après délétion de GlpF1 ou de GlpF4, une diminution de la vitesse de racémisation du lactate par les cellules est observée, effet qui est additionnel dans le

double mutant (III.2 Fig. 6 p. 192). L'échange d'acide lactique avec le milieu permettrait donc d'équilibrer plus rapidement la concentration extracellulaire en lactate avec la concentration intracellulaire et permettre ainsi une racémisation plus rapide du lactate extracellulaire. Ceci expliquerait la présence de transporteurs d'acide lactique dans de nombreux opérons *lar*. Cette racémisation du lactate extracellulaire pourrait remplir plusieurs fonctions. Elle pourrait servir comme signal à d'autres organismes du milieu, elle pourrait permettre de limiter la croissance d'organismes consommateurs exclusifs de L-lactate ou encore pourrait limiter l'inhibition par le L-lactate de certains processus métaboliques, comme la réduction du pyruvate en L-lactate, par exemple. Finalement, la racémisation extracellulaire du lactate pourrait également permettre à *L. plantarum* de s'assurer une réserve suffisante de D-lactate pour la synthèse de sa paroi.

Une autre fonction des transporteurs d'acide lactique peut cependant être envisagée. Un défaut de croissance a été observé pour le double mutant $\Delta glpF1 \Delta glpF4$ en phase exponentielle, particulièrement en présence d'une haute concentration extracellulaire en lactate (III.2 Fig. 7 p. 194). Il semble donc que les transporteurs d'acide lactique puissent être utilisés afin d'exporter l'acide lactique produit par fermentation hors de la cellule. Ce transport serait d'autant plus important que la concentration extracellulaire en acide lactique est élevée. En effet, dans ce cas, la concentration intracellulaire en lactate est suffisamment élevée pour inhiber la réduction du pyruvate et ralentir donc la fermentation lactique. L'export rapide d'acide lactique par les protéines MIP homologues à GlpF4/1 limite l'accumulation de lactate intracellulaire et permet ainsi une fermentation lactique plus rapide.

Finalement, en fin de phase exponentielle, on observe l'effet inverse : le double mutant $\Delta glpF1 \Delta glpF4$ continue à croître alors que la croissance du sauvage ralentit (III.2 Fig. 7 p. 194). Ceci semble contradictoire avec le résultat précédent, qui montre que le mutant a un défaut de croissance en phase exponentielle. Mais les conditions en fin de phase exponentielle sont différentes de celles du début : l'acide lactique s'accumule dans le milieu et le pH chute, ce qui génère un stress acide et ralentit la croissance (95). Dans ces conditions, la perméabilité de la membrane à l'acide lactique est peut-être moins souhaitable, vu que la rentrée d'acide lactique dans le cytoplasme provoque alors l'acidification de celui-ci. Le double mutant, dont la

membrane est moins perméable à l'acide lactique, pourrait donc être plus résistant que le sauvage au stress lactique en fin de phase exponentielle.

IV.4.3. La spécificité pour le lactate

Deux régions de la séquence des protéines MIP sont particulièrement importantes pour leur fonction de transport et pour leur sélectivité. La première région, commune à toutes les protéines MIP, est composée de deux motifs asparagine-proline-alanine (NPA) qui ont pour fonction de bloquer le passage de molécules chargées, en particulier des protons (304). La deuxième région est l'endroit du canal où le diamètre est le plus faible et qui définit la sélectivité de la protéine MIP. Cette région, appelée filtre de sélectivité, est composée de quatre résidus, généralement un petit résidu non chargé, deux résidus aromatiques et une arginine. C'est ce filtre qui détermine la différence de sélectivité entre un transporteur à glycérol ou un transporteur d'eau. Le filtre de sélectivité de l'AqpZ de *E. coli*, par exemple, est composé des résidus FHTR et celui de la GlpF d'*E. coli* des résidus WGFR (305).

Les motifs NPA des protéines MIP de *L. plantarum* sont assez bien conservés, à part ceux du groupe des homologues à GlpF4/1, qui possèdent des motifs du type NPA-NLA et NPA-NQA (III.2 Table S5 p. 173). Cela n'est cependant pas suffisant en soi pour donner à ces transporteurs une sélectivité particulière, comme le montre certaines protéines MIP qui possèdent également des motifs NPA inhabituels (306). En ce qui concerne les filtres de sélectivité des protéines MIP, on voit une très forte ressemblance entre le filtre de sélectivité de GlpF d'*E. coli* et celui des homologues à GlpF2, GlpF3 et GlpF4/1 (III.2 Table S5 p. 173). La seule différence observable se situe chez les homologues à GlpF3, qui possèdent un motif WGYR au lieu de WGFR (III.2 Table S5 p. 173). Cette différence n'est cependant pas significative et on ne peut donc pas tirer de conclusion concernant la sélectivité envers l'acide lactique sur base de cette région. Le filtre de sélectivité des homologues à GlpF5, composé des résidus YVPR, est plus particulier (III.2 Table S5 p. 173). Mais vu que nous n'avons pas pu montrer de transport pour GlpF5, nous ne pouvons rien en tirer comme conclusion. Le filtre de sélectivité des homologues à GlpF6 est typique des transporteurs d'eau (305) (III.2 Table S5 p. 173).

Vu que la sélectivité envers l'acide lactique ne semble pas être due à un filtre de sélectivité ni à un motif NPA particulier, la base de cette sélectivité

pourrait uniquement être due au diamètre du canal des transporteurs. En effet, vu que GlpF4 transporte non seulement de l'acide lactique, mais également des molécules plus petites, il n'est pas réellement sélectif envers l'acide lactique. Le diamètre du canal est en effet le déterminant majeur de la sélectivité envers les molécules plus grosses, tel le glycérol (307). D'autres résidus n'interagissant pas directement avec la molécule transportée peuvent donc également intervenir dans la sélectivité (305). Le résidu juste après le premier motif NPA, la valine 71 de GlpF d'*E. coli*, est remplacé par une méthionine chez tous les homologues à GlpF4/1 (III.2 Fig. S1 p. 174). De plus, on retrouve également cette méthionine chez trois homologues à GlpF5 dont deux se trouvent dans un opéron *lar*. Il serait donc intéressant de voir si cette méthionine ne serait pas directement impliquée dans la sélectivité envers l'acide lactique de ces transporteurs, peut-être via un élargissement du diamètre du canal.

IV.5. La régulation par LarR

IV.5.1. Le mécanisme de régulation par LarR

LarR est un membre de la famille des régulateurs transcriptionnels de type Crp-Fnr. Le mode de fonctionnement de ce type de régulateur est illustré par le régulateur Crp, qui constitue l'archétype du régulateur transcriptionnel. Typiquement, le régulateur interagit avec une molécule signal, l'AMP cyclique dans le cas de Crp, qui modifie la structure du régulateur, facilitant la liaison de la partie C-terminale du régulateur à l'ADN. Dans certains cas, c'est le contraire qui s'observe : la liaison de la molécule signal promeut la dissociation du régulateur de l'ADN. Le site de fixation à l'ADN, constitué d'un palindrome de 14 à 22 paires de bases, est généralement situé à une distance bien particulière du début de la transcription, selon la classe de promoteur en question (cf. point I.4).

Le régulateur LarR pourrait utiliser le même type de mécanisme. En effet, nous avons montré que LarR régulait l'opéron *larA-E* en réponse à l'excès énantiomérique de L-lactate (III.3 Fig. 1 p. 224), ce qui suppose que chacun des isomères du lactate soit reconnu par LarR tout en ayant un effet opposé. Nous avons pu montrer que LarR se liait à l'ADN via la reconnaissance d'un motif particulier, la Lar-box (III.3 Fig. 3 p. 234) et que l'ajout de L-lactate favorisait la liaison de LarR à l'ADN (III.3 Fig. 2 p. 231). Par contre, l'effet du D-lactate n'a pas pu être observé car la présence du Streptag perturbe la

reconnaissance du D-lactate *in vivo* par Streptag-LarR (III.3 Fig. 1 p. 224). Cet effet pourrait être évité en insérant le Streptag à un autre endroit de la protéine, à son extrémité C-terminale par exemple, ce qui sera investigué bientôt au laboratoire. On peut cependant déjà émettre l'hypothèse que le D-lactate puisse avoir l'effet inverse du L-lactate, c'est-à-dire la perturbation du complexe entre LarR et la Lar-box.

Une autre hypothèse est que LarR seul soit incapable de reconnaître l'excès énantiomérique de L-lactate et qu'il nécessiterait donc un facteur supplémentaire de reconnaissance du signal. Un autre mécanisme de régulation pourrait intervenir dans la reconnaissance du ratio D-/L-lactate. La présence d'un riboswitch ou d'un mécanisme similaire est néanmoins improbable, vu l'absence de structure secondaire stable dans la partie non-codante 5' de l'ARNm de l'opéron *larA-E*.

Le mécanisme de régulation par LarR pourrait être fort semblable à la régulation par Crp, si ce n'était la distance inhabituelle entre le site de fixation de LarR et le début de la transcription. En effet, le site de fixation des régulateurs transcriptionnels de la famille Crp-Fnr se situe généralement soit à 41,5 paires de bases (classe II), soit à $62,5 + n \cdot 10,5$ ($n = 1, 2$ ou 3) paires de bases (classe I) du début de la transcription. La position de la Lar-box à 67,5 paires de bases du début de la transcription chez *L. plantarum* ne correspond pas à une distance classique des régulateurs de cette famille. Nous avons résolu ce problème en montrant que LarR multimérise sur des sites de fixation adjacents (III.3 Fig. 4 p. 235) et que cette multimérisation était nécessaire à l'activation de la transcription (III.3 Fig. 5 p. 238). Le footprint *in vitro* sur la région intergénique entre *larR* et *larA* suggère également que la multimérisation de LarR est favorisée par le L-lactate (III.3 Fig. 4 p. 235). Le L-lactate pourrait donc avoir comme effet de favoriser la multimérisation de LarR afin de permettre l'interaction entre LarR et l'ARNP. Le D-lactate pourrait avoir l'effet contraire, c'est-à-dire la démultimérisation de LarR, mais cet effet n'a pas pu être étudié *in vitro*, comme discuté précédemment.

Ce mécanisme de multimérisation ne serait pas uniquement présent chez *L. plantarum*, mais également chez d'autres espèces possédant un régulateur LarR. En effet, chez ces autres bactéries, la distance entre la Lar-box et le début de la transcription se situe généralement autour de 54,5 ou 67,5 paires de bases (III.3 Fig. S6 pp. 243-244). Vu que la distance permettant l'activation de l'ARNP dans les promoteurs Crp-dépendant de classe II est

de 41,5 paires de bases, ces distances correspondent à 13 ou 26 paires de bases supplémentaires. Cela pourrait correspondre à la liaison supplémentaire d'un ou de deux dimères de LarR. Il semble donc que ce système puisse être généralisé à d'autres régulateurs LarR, avec cependant une différence dans le nombre de dimères supplémentaires nécessaires à l'activation de l'ARNP.

L'hypothèse proposée pour la régulation de l'opéron *larA-E* par LarR est donc la suivante. En absence de lactate, LarR viendrait se lier sur la Lar-box mais n'activerait pas l'ARNP car la distance entre la Lar-box et le début de la transcription ne permet pas une interaction directe avec celle-ci. En présence de L-lactate, la multimérisation d'un ou de deux dimères de LarR supplémentaires permettrait l'activation de l'ARNP via une interaction directe comme dans un promoteur Crp-dépendant de classe II. En présence de D-lactate, celui-ci viendrait bloquer la reconnaissance par le L-lactate et empêcherait la multimérisation de LarR (III.3 Fig. 6 p. 242). Si cette hypothèse est cohérente avec nos résultats, l'effet du D-lactate n'a cependant pas pu être démontré.

Concernant la régulation de l'opéron *larR-O*, par contre, nous n'avons pas observé de différence du niveau d'expression du promoteur en lien avec le ratio L-/D-lactate (III.3 Fig. 1 p. 224). Les données transcriptomiques, pourtant, ont montré que l'opéron *larR-O* était bien induit par le L-lactate (III.1 Table S1 p. 110). De plus, la présence systématique d'une Lar-box entre les gènes *larA* et *larR* dans tous génomes dans lesquels ceux-ci sont présents suggère que le régulateur soit également responsable de la régulation de l'opéron *larR-O*. Il est néanmoins possible que cette régulation soit moins marquée que la régulation de l'opéron *larA-E*, ce qui explique que nous ne l'ayons pas observée dans notre système rapporteur. En effet, la situation sur un plasmide multicopie n'est pas la même que la situation chromosomique. De plus, si on compare la distance entre la Lar-box et le début de la transcription du côté *larR*, on voit que cette distance est généralement plus courte que la distance entre la Lar-box et le début de la transcription du côté *larA* (III.3 Fig. S6 pp. 243-244). Ceci soutient l'hypothèse que le promoteur de l'opéron *larR-O* soit moins dépendant de la multimérisation de LarR et donc du ratio L-/D-lactate que le promoteur de l'opéron *larA-E*. Le promoteur de l'opéron *larR-O* aurait donc un niveau d'expression basal plus élevé et serait moins régulé que l'opéron *larA-E*.

Ceci est cohérent avec le fait que l'expression du régulateur LarR soit nécessaire en toutes conditions.

IV.5.2. Le rôle de LarR dans la racémisation du lactate

Nous avons montré que LarR était indispensable à la régulation de l'opéron *larA-E*, et donc à la racémisation du lactate, chez *L. plantarum*. Qu'en est-il chez les autres espèces ? Dans la grosse majorité des espèces chez qui un gène *larR* a été trouvé (20 espèces sur 21), un gène *larA* se trouve à côté d'un exemplaire de *larR* en orientation inverse, comme chez *L. plantarum* (III.3 Table S2 sur CD-ROM). Ceci suggère fortement que chez toutes ces espèces, un régulateur LarR est nécessaire afin de réguler la racémisation du lactate. L'exception à la règle, *Weissella Koreensis*, ne possède pas de gène *larA* dans son génome (III.3 Table S2 sur CD-ROM). Cette bactérie lactique pourrait donc utiliser LarR afin de réguler d'autres gènes en fonction du ratio L-/D-lactate, mais nous n'avons aucune indication quant au type de gène serait ainsi régulé. Par ailleurs, toutes les espèces qui possèdent les gènes *larR* et *larA* sont des productrices de lactate. La majorité sont des bactéries lactiques mais on retrouve également quelques espèces des genres *Eubacterium* et *Collinsella* (III.3 Table S2 sur CD-ROM), qui ont comme point commun de fermenter les sucres en divers acides, dont l'acide lactique, dans les intestins des animaux (308). De manière générale, on peut donc dire que la régulation par LarR est spécifique aux espèces produisant de l'acide lactique.

Dans ce cadre, LarR permet d'induire l'expression des gènes de la lactate racémase seulement quand ceux-ci sont nécessaires, c'est-à-dire en présence d'un excès énantiomérique en L-lactate. Il paraît évident que l'activité de racémisation du lactate ne soit utile qu'en présence d'un excès d'un énantiomère de lactate, vu qu'en présence d'un mélange racémique cette activité enzymatique est inutile. Mais pourquoi est-ce seulement l'excès énantiomérique de L-lactate qui induit la racémisation du lactate et non l'excès de D-lactate ? Plusieurs explications sont envisageables. Tout d'abord d'un point de vue mécanistique, la reconnaissance du ratio L-/D-lactate nécessite la reconnaissance de chacun des énantiomères du lactate : le L-lactate comme inducteur et le D-lactate comme répresseur. Afin de reconnaître l'excès énantiomérique de D-lactate, il faudrait que chacun des énantiomères soit reconnu, mais avec un effet contraire : le L-lactate comme

répresseur et le D-lactate comme inducteur. Cela nécessiterait un double système de régulation, avec deux régulateurs différents. Outre le problème mécanistique, la raison physiologique de la lactate racémase se situe peut-être uniquement au niveau de la conversion du L-lactate en D-lactate et pas au niveau de la conversion du D-lactate en L-lactate. Le rôle physiologique de cette conversion chez *L. plantarum* a été abordé au point IV.3.1.

IV.6. Neuf gènes pour une seule fonction ?

Durant cette thèse, le rôle fonctionnel des protéines impliquées dans la racémisation du lactate a été investigué. La Table 8 résume les données obtenues sur le rôle fonctionnel des différentes protéines du locus *lar*.

Table 8. Synthèse des principales caractéristiques des protéines du locus *lar* de *L. plantarum*.

Gène	Produit	# aa	Poids (kDa)	pI	Homologie	Fonction
<i>larR-O operon</i>						
<i>lp_0100</i>	LarO	243	26,5	5,4	Sous-unité O liant l'ATP d'un transporteur ABC de type NikMNQO	Transport de Nickel ATP-dépendant.
<i>lp_0101</i>	LarQ	264	30,3	10,8	Sous-unité Q membranaire d'un transporteur ABC de type NikMNQO	
<i>lp_0102</i>	LarMN	309	33,2	9,1	Sous-unité MN membranaire d'un transporteur ABC de type NikMNQO	
<i>lp_0103</i>	LarR	221	25,7	9,2	Régulateur transcriptionnel de la famille Crp/Fnr.	Régulation du locus <i>lar</i> en fonction de l'excès énantiomérique en L-lactate.
<i>larA-E operon</i>						
<i>lp_0104</i>	LarA	424	46,2	5,5	Similaire au groupe des protéines conservées non caractérisées COG3875	Racémise le lactate. Est chargée en nickel. Nécessite une activation préalable.

Conclusions

<i>lp_0105</i>	LarB	246	25,5	5,6	Partie C-terminale similaire à la N ₅ -carboxyaminoimidazole ribonucléotide mutase PurE (9). Similaire au groupe de protéines conservées non caractérisées COG1691.	Active LarE en vue de l'activation de LarA. Est probablement membranaire .
<i>lp_0106/</i> <i>lp_0107</i>	LarC1 C2	420	46,4	5,4	Similaire au groupe de protéines conservées non caractérisées COG1641	Fortement chargée en nickel. Active LarE en vue de l'activation de LarA. Transport d'acide lactique à travers la membrane. Active LarA. Est chargée en nickel.
<i>lp_0108</i>	GlpF1 (LarD)	238	25,4	7,3	Protéine de canal de la famille des aquaglycéroporines.	(Hydrolyse l'ATP en AMP et pyrophosphate).
<i>lp_0109</i>	LarE	276	30,5	5,9	Similaire aux protéines utilisatrices d'ATP de la superfamille des PP-loop (11). Similaire au groupe de protéines conservées non caractérisées COG1606.	

Toutes ces protéines peuvent être regroupées en 4 entités fonctionnelles, suivant leur fonction et la répartition des gènes au sein des génomes procaryotiques (Fig. 55A et B). La première entité fonctionnelle est celle composée du transporteur à nickel Lar(MN)QO. Le rôle de celui-ci est d'importer le nickel, utilisé par la lactate racémase comme cofacteur. Cette fonction peut néanmoins être réalisée par une large variété de transporteurs différents, dont la spécificité est parfois difficile à déterminer sur base de la séquence primaire. Une analyse bioinformatique a montré la présence de gènes codant pour un transporteur à nickel dans 38% des espèces procaryotiques examinées (7). De plus, la présence de protéines à nickel dans plus de 60% des espèces procaryotiques examinées et la présence de

transporteurs dont la spécificité n'a pas été déterminée suggèrent que de nombreux transporteurs à nickel restent encore à découvrir (Fig. 55B) (7).

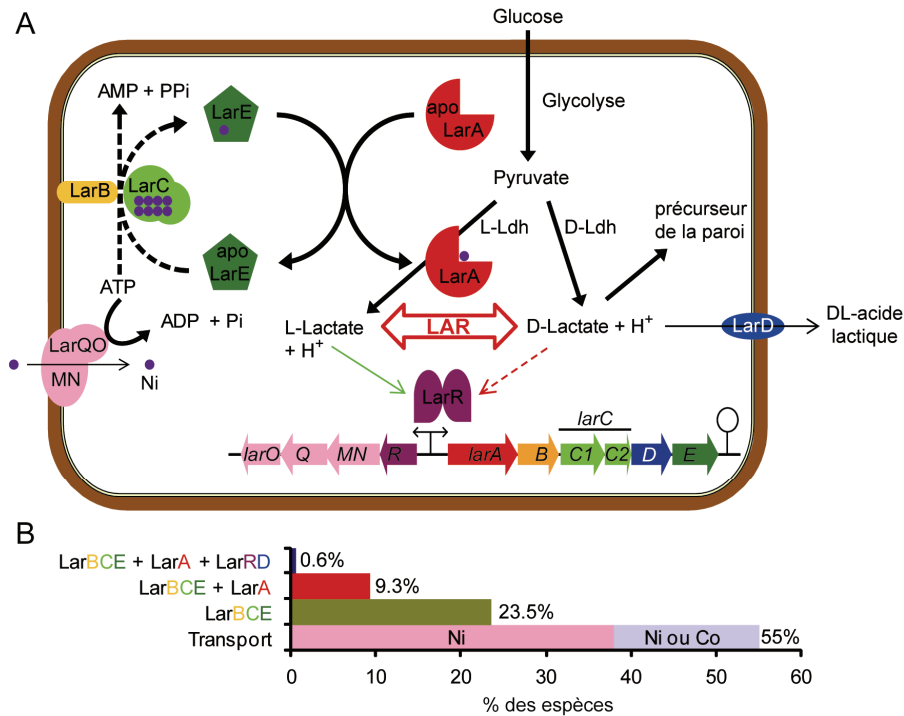


Figure 55. A, Système Lar chez *L. plantarum*. Les flèches épaisses indiquent une réaction enzymatique, les flèches minces indiquent un transport (en noir), une induction (en vert) ou une répression (en rouge). Les flèches en pointillés indiquent une réaction ou interaction supposée sur base de nos résultats mais qui n'a pas été démontrée explicitement. PPi : pyrophosphate, Pi : phosphate. **B**, Occurrence des fonctions liées à l'activité Lar chez les procaryotes. Les données concernant le transport de nickel proviennent de la référence (7). « Ni ou Co » signifie qu'il s'agit d'un transporteur de nickel et/ou de cobalt dont la spécificité est inconnue (7).

La deuxième entité fonctionnelle est celle composée des gènes codant pour les protéines accessoires LarB, LarC et LarE, qui sont fort répandus également puisqu'on les retrouve dans 24 % des espèces procaryotiques que nous avons examinées (Fig. 55B). Les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans l'activité de racémisation du lactate car elles participent à l'activation de la lactate racémase (Fig. 55A). Mais elles possèdent probablement d'autres fonctions, probablement liées au nickel, qui justifient leur large répartition chez les procaryotes.

La troisième entité fonctionnelle est l'activité enzymatique de racémisation du lactate, réalisée par la protéine LarA et qui nécessite la présence des

protéines accessoires LarB, LarC et LarE (Fig. 55A). Le gène *larA* est moins répandu au sein des procaryotes que le sont les gènes des protéines accessoires, mais il est néanmoins bien présent puisqu'on le retrouve dans 9 % espèces procaryotiques que nous avons examinées (Fig. 55B). Le but de la racémisation du lactate chez ces espèces semble généralement lié à l'utilisation d'acide lactique, dont les deux isomères peuvent être consommés indifféremment grâce à la présence d'une lactate racémase. Mais on retrouve également des bactéries qui produisent du lactate par fermentation ou qui l'utilisent autrement que comme source d'électrons ou de carbone.

La quatrième et dernière entité fonctionnelle regroupe les gènes encodant le régulateur LarR et l'aquaglycéroporine LarD. Nous pensons que ces deux protéines participent à une même fonction car on trouve un gène homologue à *larD* dans tous les locus où des homologues à *larR* et à *larA* sont présents (Table 9). Ceci suggère que la régulation de l'activité Lar par LarR soit liée au transport d'acide lactique à travers la membrane plasmique.

Le but de la racémisation du lactate chez ces espèces ne serait donc pas uniquement lié à la consommation de lactate mais aurait surtout comme but de racémiser le lactate extracellulaire. Un mélange racémique de lactate extracellulaire aurait plusieurs fonctions, notamment de permettre de limiter la croissance des consommateurs exclusifs de L-lactate ou encore de s'assurer une réserve de D-lactate pour la synthèse de la paroi.

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, la racémisation du L-lactate en DL-lactate permettrait de diminuer l'inhibition de la L-Ldh par son produit et ainsi de produire plus de lactate. Le transport d'acide lactique hors de la cellule par l'aquaglycéroporine LarD participe à la même fonction puisqu'il permet d'évacuer plus rapidement le lactate produit. Ceci est cohérent avec la présence d'une seule L-Ldh chez *L. sakei*, par exemple, mais est moins cohérent avec la présence des deux Ldhs (L-Ldh et D-Ldh) chez *L. plantarum*. Dans ce cas cependant, il peut y avoir des conditions dans lesquelles seule la L-Ldh est active : en condition de non-croissance ou en condition de stress thermique, par exemple. L'opéron *lar* servirait alors à accélérer la fermentation lactique en racémisant et en excréant le L-lactate produit.

Table 9. Liste des espèces chez qui on retrouve un homologue à *larR*, *larA* et *larD*. Les numéros d'accès des protéines correspondantes sont listés.

Espèce	LarR	LarA	LarD
<i>Clostridiales</i> genomosp. BVAB3 str. UPII9-5	YP_003475460.1	YP_003475461.1	YP_003475462.1
<i>Collinsella intestinalis</i> DSM 13280	ZP_04446027.1	ZP_04446028.1	ZP_04446029
<i>Collinsella tanakaei</i> YIT 12063	ZP_08853122.1	ZP_08853123.1	ZP_08853124.1
<i>Enterococcus faecalis</i> T3	ZP_05503397.1	ZP_05503398.1	ZP_05503401.1
<i>Eubacterium bifforme</i> DSM 3989	ZP_03487930.1	ZP_03487929.1	ZP_03487928.1
<i>Eubacterium hallii</i> DSM 3353	ZP_03715095.1	ZP_03715096.1	ZP_03715097.1
<i>Granulicatella adiacens</i> ATCC 49175	ZP_05738512.1	ZP_05738513.1	ZP_05738516.1
<i>Granulicatella elegans</i> ATCC 700633	ZP_05852068.1	ZP_05852067.1	ZP_05852064.1
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	YP_795942.1	YP_795943.1	YP_795947.1
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> KCTC 3167	ZP_08478609.1	ZP_08478608.1	ZP_08478604.1
<i>Lactobacillus curvatus</i> CRL 705	ZP_09041129.1	ZP_09041121.1	ZP_09041107.1
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	YP_001844550.1	YP_001844549.1	YP_001844546.1
<i>Lactobacillus mali</i> KCTC 3596 = DSM 20444	ZP_09448267.1	ZP_09448266.1	ZP_09448262.1
<i>Lactobacillus pentosus</i> MP-10	CCB81962.1	CCB81961.1	CCB81957.1
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	YP_004888173.1	YP_004888174.1	YP_004888178.1
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	YP_395397.1	YP_395398.1	YP_395402.1
<i>Pediococcus claussenii</i> ATCC BAA-344	YP_005005673.1	YP_005005672.1	YP_005005669.1
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	YP_805158.1	YP_805157.1	YP_805154.1
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> CASD	ZP_09714632.1	ZP_09714633.1	ZP_09714935.1
<i>Streptococcus vestibularis</i> F0396	ZP_07723811.1	ZP_07724144.1	ZP_07723639.1

V. Conclusions et perspectives

Lors de ce travail, nous avons caractérisé le système de racémisation du lactate chez *L. plantarum*. Nous avons analysé chacune des protéines impliquées dans ce système et déterminé la fonction de la plupart d'entre elles.

L'accent a tout d'abord été mis sur les protéines directement impliquées dans la racémisation du lactate. Nous avons montré que la racémisation du lactate était réalisée par une seule enzyme utilisant du nickel comme cofacteur : LarA. LarA est la première racémase à rejoindre le cercle restreint des protéines à nickel (neuf protéines désormais). Nous avons caractérisé LarA de manière biochimique et identifié plusieurs de ses inhibiteurs. Nous avons déterminé sa structure tridimensionnelle, qui montre un nouveau type de repliement. La structure du site catalytique reste cependant toujours une inconnue et le mécanisme catalytique également. Il faudra encore probablement de nombreuses études afin d'arriver à comprendre précisément comme la lactate racémase parvient à inverser la stéréochimie du lactate. Afin de pousser un peu plus loin l'étude de LarA, il faudra aussi parvenir à stabiliser l'enzyme sous sa forme active, ce qui devrait pouvoir être possible en anaérobiose et en présence de vitamine C, comme le suggèrent nos données.

Le mécanisme d'activation de la lactate racémase a également été décrit dans ce travail pour la première fois. Le rôle de la protéine accessoire LarE semble central dans ce processus, puisqu'elle parvient à elle seule d'activer LarA. Le rôle des deux autres protéines accessoires LarB et LarC reste encore à préciser. La nature du cofacteur synthétisé par ces protéines accessoires, s'il existe, reste aussi un mystère. Surtout, il serait intéressant d'investiguer le rôle de ces protéines accessoires dans les nombreux procaryotes ne possédant pas de gène homologue à *larA*. Ceci permettrait peut-être de mieux comprendre certains mécanismes encore mal compris, comme la synthèse du Facteur 430 des méthanogènes ou encore la régulation du rythme circadien des cyanobactéries.

Une recherche bioinformatique des gènes de lactate racémase a montré la large répartition de ces gènes au sein des génomes procaryotiques. La racémisation du lactate semble plus souvent utilisée dans le cadre d'une utilisation de lactate comme substrat que dans le cadre d'une production de lactate, comme chez *L. plantarum*. L'importance de la racémisation du lactate semble majeure, surtout dans les environnements anaérobies

où le lactate est autant un produit de fermentation qu'une source d'électrons et/ou de carbone.

Dans de nombreux opérons *lar* de bactéries produisant du lactate par fermentation, un gène codant pour une aquaglycéroporine a été identifié. L'analyse biochimique des aquaglycéroporines de *L. plantarum* nous a permis de déterminer la spécificité de substrat de plusieurs d'entre elles et de montrer que certaines transportaient de l'acide lactique à travers la membrane plasmique. C'est la première fois que l'implication d'une aquaglycéroporine bactérienne dans le transport d'acide lactique est démontrée. Ce transport aurait comme fonction soit la racémisation du lactate extracellulaire soit l'excrétion de l'acide lactique formé par fermentation. Le retard de croissance du double mutant des transporteurs d'acide lactique de *L. plantarum* indique que la deuxième hypothèse est la plus probable. La présence de transporteurs d'acide lactique chez différentes espèces du genre *Leuconostoc* suggère par ailleurs que les aquaglycéroporines transportant de l'acide lactique puissent être utilisées hors du cadre de la racémisation du lactate, renforçant cette dernière hypothèse. D'un point de vue plus biochimique, la spécificité de ce transport pourrait uniquement dépendre du diamètre du canal, qui serait déterminé par des résidus n'interagissant pas directement avec la molécule transportée.

Finalement, la régulation par le régulateur LarR est une originalité de plus au sein du locus *lar*. En effet, LarR semble parvenir à sentir le ratio L-/D-lactate et à induire l'expression de l'opéron *larA-E* en conséquence. Nous avons montré que le mécanisme de régulation par LarR impliquait la multimérisation de celui-ci sur l'ADN grâce à la présence de sites suboptimaux en aval du site principal de liaison à l'ADN, appelé Lar-box. Le mécanisme utilisé par ce régulateur pour sentir le ratio L-/D-lactate n'a pas pu être mis en évidence, mais nous avons une hypothèse cohérente avec nos résultats. Selon notre hypothèse, la liaison et la multimérisation de LarR sur la région intergénique entre *larR* et *larA* serait favorisée en présence de L-lactate et défavorisée en présence de D-lactate, ce qui permettrait l'expression de l'opéron *larA-E* seulement en présence d'un excès énantiomérique en L-lactate.

VI. Références bibliographiques

1. Tatum EL, Peterson WH, & Fred EB (1936) Enzymic racemization of optically active lactic acid. *Biochem. J.* 30(10):1892-1897.
2. Iino T, Uchimura T, & Komagata K (2002) The effect of sodium acetate on the growth yield, the production of L- and D-lactic acid, and the activity of some enzymes of the glycolytic pathway of *Lactobacillus sakei* NRIC 1071(T) and *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067(T). *J Gen Appl Microbiol* 48(2):91-102.
3. Garvie EI (1980) Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* 44(1):106-139.
4. Hiyama T, Fukui S, & Kitahara K (1968) Purification and properties of lactate racemase from *Lactobacillus sakei*. *J Biochem* 64(1):99-107.
5. Dennis D & Kaplan NO (1963) Lactic Acid Racemization in *Clostridium Butylicum*. *Biochem. Z.* 338:485-495.
6. Goffin P, *et al.* (2005) Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 187(19):6750-6761.
7. Zhang Y, Rodionov DA, Gelfand MS, & Gladyshev VN (2009) Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization. *BMC Genomics* 10:78.
8. Li Y & Zamble DB (2009) Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. *Chem. Rev.* 109(10):4617-4643.
9. Mathews, II, Kappock TJ, Stubbe J, & Ealick SE (1999) Crystal structure of *Escherichia coli* PurE, an unusual mutase in the purine biosynthetic pathway. *Structure* 7(11):1395-1406.
10. Giedroc DP & Cornish PV (2009) Frameshifting RNA pseudoknots: structure and mechanism. *Virus Res.* 139(2):193-208.
11. Aravind L, Anantharaman V, & Koonin EV (2002) Monophyly of class I aminoacyl tRNA synthetase, USPA, ETPP, photolyase, and PP-ATPase nucleotide-binding domains: implications for protein evolution in the RNA. *Proteins* 48(1):1-14.
12. Brin M, Alpert NR, Dunlop RH, & Sciences NYAo (1965) *Chemistry and Metabolism of L- and D-lactic Acids* (New York Academy of Sciences).
13. Gao C, Ma C, & Xu P (2011) Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnol Adv* 29(6):930-939.
14. Lim LT, Auras R, & Rubino M (2008) Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science* 33(8):820-852.
15. L Nattrass DAH (2010) NNFCC Renewable Chemicals Factsheet: Lactic Acid. <http://www.nnfcc.co.uk/publications/nnfcc-renewable-chemicals-factsheet-lactic-acid>.
16. Jose S (2012) Global Lactic Acid Market to Reach 367.3 Thousand Metric Tons by 2017, According to New Report by Global Industry Analysts, Inc.

http://www.prweb.com/releases/lactic_acid/polylactic_acid/prweb9369473.htm.

17. Zhang ZG, Ye ZQ, Yu L, & Shi P (2011) Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. *BMC Evol. Biol.* 11:1.
18. Oren A & Shilo M (1979) Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*: Sulfur respiration and lactate fermentation. *Arch. Microbiol.* 122(1):77-84.
19. Manome A, Okada S, Uchimura T, & Komagata K (1998) The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 44(6):371-374.
20. Bernard N, *et al.* (1994) NAD(+)-dependent D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Gene cloning and enzyme characterization. *Eur. J. Biochem.* 224(2):439-446.
21. Kandler O (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49(3):209-224.
22. Coccagn-Bousquet M, Garrigues C, Loubiere P, & Lindley ND (1996) Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70(2-4):253-267.
23. Moat AG, Foster JW, & Spector MP (2003) Fermentation Pathways. *Microbial Physiology*, (John Wiley & Sons, Inc.), pp 412-433.
24. Thauer RK, Jungermann K, & Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41(1):100-180.
25. Lindgren SE, Axelsson LT, & McFeeters RF (1990) Anaerobic l-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 66(1-3):209-213.
26. Werner S, Diekert G, & Schuster S (2010) Revisiting the thermodynamic theory of optimal ATP stoichiometries by analysis of various ATP-producing metabolic pathways. *J. Mol. Evol.* 71(5-6):346-355.
27. Schlegel H & Jannasch H (2006) Prokaryotes and Their Habitats. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer, New York), pp 137-184.
28. Ganesh R, Robinson KG, Chu L, Kucsmas D, & Reed GD (1999) Reductive precipitation of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*: evaluation of cocontaminant effects and selective removal. *Water Res.* 33(16):3447-3458.
29. Laanbroek HJ, Geerligs HJ, Peijnenburg AACM, & Siesling J (1983) Competition for L-lactate between *Desulfovibrio*, *Veillonella*, and *Acetobacterium* species isolated from anaerobic intertidal sediments. *Microb. Ecol.* 9(4):341-354.
30. Hua Q, Joyce AR, Palsson BO, & Fong SS (2007) Metabolic characterization of *Escherichia coli* strains adapted to growth on lactate. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(14):4639-4647.

31. Courvalin P (2006) Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* 42 Suppl 1:S25-34.
32. Nocek B, *et al.* (2007) Structure of an amide bond forming F(420):gamma-glutamyl ligase from *Archaeoglobus fulgidus* -- a member of a new family of non-ribosomal peptide synthases. *J. Mol. Biol.* 372(2):456-469.
33. Tong H, *et al.* (2007) *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H₂O₂: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition. *Mol. Microbiol.* 63(3):872-880.
34. Hackenberg C, *et al.* (2011) Cyanobacterial lactate oxidases serve as essential partners in N₂ fixation and evolved into photorespiratory glycolate oxidases in plants. *Plant Cell* 23(8):2978-2990.
35. Lehninger A, Nelson D, & Cox M (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry* (W. H. Freeman).
36. Thomas MT, *et al.* (2011) Two respiratory enzyme systems in *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 contribute to growth on L-lactate. *Environ. Microbiol.* 13(1):48-61.
37. Maeda-Yorita K, Aki K, Sagai H, Misaki H, & Massey V (1995) L-lactate oxidase and L-lactate monooxygenase: mechanistic variations on a common structural theme. *Biochimie* 77(7-8):631-642.
38. Aguilera L, *et al.* (2008) Dual role of LldR in regulation of the lldPRD operon, involved in L-lactate metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190(8):2997-3005.
39. Dym O, Pratt EA, Ho C, & Eisenberg D (2000) The crystal structure of D-lactate dehydrogenase, a peripheral membrane respiratory enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(17):9413-9418.
40. Lorquet F, *et al.* (2004) Characterization and functional analysis of the *poxB* gene, which encodes pyruvate oxidase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 186(12):3749-3759.
41. Goffin P, Lorquet F, Kleerebezem M, & Hols P (2004) Major role of NAD-dependent lactate dehydrogenases in aerobic lactate utilization in *Lactobacillus plantarum* during early stationary phase. *J. Bacteriol.* 186(19):6661-6666.
42. Quatravaux S, Remize F, Bryckaert E, Colavizza D, & Guzzo J (2006) Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *J. Appl. Microbiol.* 101(4):903-912.
43. Brooijmans RJ, Poolman B, Schuurman-Wolters GK, de Vos WM, & Hugenholtz J (2007) Generation of a membrane potential by *Lactococcus lactis* through aerobic electron transport. *J. Bacteriol.* 189(14):5203-5209.

44. Brooijmans RJ, de Vos WM, & Hugenholtz J (2009) *Lactobacillus plantarum* WCFS1 electron transport chains. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(11):3580-3585.
45. Brooijmans R, *et al.* (2009) Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microbial cell factories* 8:28.
46. Pascal MC, Pichinoty F, & Bruno V (1965) [On the lactate dehydrogenases of a denitrifying bacterium]. *Biochim. Biophys. Acta* 99(3):543-546.
47. Carlson HK, *et al.* (2012) Surface multiheme c-type cytochromes from *Thermincola potens* and implications for respiratory metal reduction by Gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(5):1702-1707.
48. Lovley D (2007) Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-Reducing Prokaryotes. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer New York), pp 635-658.
49. Moser DP & Nealson KH (1996) Growth of the facultative anaerobe *Shewanella putrefaciens* by elemental sulfur reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6):2100-2105.
50. Pinchuk GE, *et al.* (2009) Genomic reconstruction of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism reveals a previously uncharacterized machinery for lactate utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(8):2874-2879.
51. Call DF & Logan BE (2011) Lactate oxidation coupled to iron or electrode reduction by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(24):8791-8794.
52. Ryu HW, Kang KH, Pan JG, & Chang HN (2001) Characteristics and glycerol metabolism of fumarate-reducing *Enterococcus faecalis* RKY1. *Biotechnol. Bioeng.* 72(1):119-124.
53. Pinchuk GE, *et al.* (2011) Pyruvate and lactate metabolism by *Shewanella oneidensis* MR-1 under fermentation, oxygen limitation, and fumarate respiration conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(23):8234-8240.
54. Rabus R, Hansen T, & Widdel F (2007) Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer, New York), pp 659-768.
55. Möller-Zinkhan D & Thauer R (1990) Anaerobic lactate oxidation to 3 CO₂ by *Archaeoglobus fulgidus* via the carbon monoxide dehydrogenase pathway: demonstration of the acetyl-CoA carbon-carbon cleavage reaction in cell extracts. *Arch. Microbiol.* 153(3):215-218.
56. Ogata M, Arihara K, & Yagi T (1981) D-lactate dehydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris*. *J Biochem* 89(5):1423-1431.

57. Reed DW & Hartzell PL (1999) The *Archaeoglobus fulgidus* D-lactate dehydrogenase is a Zn(2+) flavoprotein. *J. Bacteriol.* 181(24):7580-7587.
58. Stams AJM & Hansen TA (1982) Oxygen-labile l(+) lactate dehydrogenase activity in *Desulfovibrio desulfuricans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 13(4):389-394.
59. Drake H, Küsel K, & Matthies C (2006) Acetogenic Prokaryotes. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer, New York), pp 354-420.
60. Zinder S & Dworkin M (2006) Morphological and Physiological Diversity. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer New York), pp 185-220.
61. Whitman W, Bowen T, & Boone D (2007) The Methanogenic Bacteria. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer New York), pp 165-207.
62. Schmitz R, Daniel R, Deppenmeier U, & Gottschalk G (2006) The Anaerobic Way of Life. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer New York), pp 86-101.
63. McInerney MJ & Bryant MP (1981) Anaerobic Degradation of Lactate by Syntrophic Associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* Species and Effect of H₂ on Acetate Degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(2):346-354.
64. Counotte GH, Prins RA, Janssen RH, & Debie MJ (1981) Role of *Megasphaera elsdenii* in the Fermentation of dl-[2-C]lactate in the Rumen of Dairy Cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 42(4):649-655.
65. Stevani J, Grivet JP, Hannequart G, & Durand M (1991) Glucose and lactate catabolism by bacteria of the pig large intestine and sheep rumen as assessed by ¹³C nuclear magnetic resonance. *J. Appl. Bacteriol.* 71(6):524-530.
66. Prins RA & Van Der Meer P (1976) On the contribution of the acrylate pathway to the formation of propionate from lactate in the rumen of cattle. *Antonie van Leeuwenhoek* 42(1-2):25-31.
67. Melville SB, Michel TA, & Macy JM (1988) Pathway and sites for energy conservation in the metabolism of glucose by *Selenomonas ruminantium*. *J. Bacteriol.* 170(11):5298-5304.
68. Hino T & Kuroda S (1993) Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(1):255-259.
69. Counotte GHM, Lankhorst A, & Prins RA (1983) Role of DL-Lactic Acid as an Intermediate in Rumen Metabolism of Dairy Cows. *J. Anim. Sci.* 56(5):1222-1235.

70. Schultz JE & Breznak JA (1979) Cross-Feeding of Lactate Between *Streptococcus lactis* and *Bacteroides* sp. Isolated from Termite Hindguts. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(6):1206-1210.
71. Thierry A, *et al.* (2011) New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* 149(1):19-27.
72. Duncan SH, Louis P, & Flint HJ (2004) Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10):5810-5817.
73. Shockman GD & Barrett JF (1983) Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:501-527.
74. Walsh CT (1993) Vancomycin resistance: decoding the molecular logic. *Science* 261(5119):308-309.
75. Cetinkaya Y, Falk P, & Mayhall CG (2000) Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(4):686-707.
76. Casadewall B & Courvalin P (1999) Characterization of the vanD glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J. Bacteriol.* 181(12):3644-3648.
77. Swenson JM, Facklam RR, & Thornsberry C (1990) Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34(4):543-549.
78. Billot-Klein D, Gutmann L, Sable S, Guittet E, & van Heijenoort J (1994) Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J. Bacteriol.* 176(8):2398-2405.
79. Ferain T, *et al.* (1996) Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178(18):5431-5437.
80. Park IS & Walsh CT (1997) D-Alanyl-D-lactate and D-alanyl-D-alanine synthesis by D-alanyl-D-alanine ligase from vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides*. Effects of a phenylalanine 261 to tyrosine mutation. *J. Biol. Chem.* 272(14):9210-9214.
81. Seki M, Iida K, Saito M, Nakayama H, & Yoshida S (2004) Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. *J. Bacteriol.* 186(7):2046-2051.
82. Miller RA & Britigan BE (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(1):1-18.
83. Liu L, Tong H, & Dong X (2012) Function of the pyruvate oxidase-lactate oxidase cascade in interspecies competition between

- Streptococcus oligofermentans* and *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(7):2120-2127.
84. Pascual LM, Daniele MB, Pajaro C, & Barberis L (2006) *Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance. *Contraception* 73(1):78-81.
85. Zheng HY, Alcorn TM, & Cohen MS (1994) Effects of H₂O₂-producing lactobacilli on *Neisseria gonorrhoeae* growth and catalase activity. *J. Infect. Dis.* 170(5):1209-1215.
86. Marty-Teyssset C, de la Torre F, & Garel J (2000) Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(1):262-267.
87. Fay P (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56(2):340-373.
88. Oren A & Shilo M (1979) Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica* : Sulfur respiration and lactate fermentation. *Arch. Microbiol.* 122(1):77-84.
89. Sanchez JJ, Palleroni NJ, Doudoroff M, & Duong J (1975) Lactate dehydrogenases in cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 104(1):57-65.
90. Graupner M, Xu H, & White RH (2000) Identification of an archaeal 2-hydroxy acid dehydrogenase catalyzing reactions involved in coenzyme biosynthesis in methanoarchaea. *J. Bacteriol.* 182(13):3688-3692.
91. Grochowski LL, Xu H, & White RH (2006) Identification of lactaldehyde dehydrogenase in *Methanocaldococcus jannaschii* and its involvement in production of lactate for F420 biosynthesis. *J. Bacteriol.* 188(8):2836-2844.
92. White RH (2008) Biochemical origins of lactaldehyde and hydroxyacetone in *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochemistry (Mosc.)* 47(17):5037-5046.
93. Anonymous (1969) Data for Biochemical Research. *Ann. Intern. Med.* 71(6):1232-1232.
94. Booth IR (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* 49(4):359-378.
95. Pieterse B, Leer RJ, Schuren FH, & van der Werf MJ (2005) Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology* 151(Pt 12):3881-3894.
96. Konings WN & Otto R (1983) Energy transduction and solute transport in streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 49(3):247-257.
97. ten Brink B & Konings WN (1982) Electrochemical proton gradient and lactate concentration gradient in *Streptococcus cremoris* cells grown in batch culture. *J. Bacteriol.* 152(2):682-686.

98. Harold FM & Levin E (1974) Lactic acid translocation: terminal step in glycolysis by *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 117(3):1141-1148.
99. Gätje G, Müller V, & Gottschalk G (1991) Lactic acid excretion via carrier-mediated facilitated diffusion in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34(6):778-782.
100. van Maris AJ, Konings WN, van Dijken JP, & Pronk JT (2004) Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes. *Metab. Eng.* 6(4):245-255.
101. Salema M, Poolman B, Lolkema JS, Dias MC, & Konings WN (1994) Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *Eur. J. Biochem.* 225(1):289-295.
102. Poolman B, *et al.* (1991) Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.* 173(19):6030-6037.
103. Konings WN (2006) Microbial transport: adaptations to natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek* 90(4):325-342.
104. Marty-Teyssset C, *et al.* (1996) Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 178(8):2178-2185.
105. Nunez MF, *et al.* (2002) Transport of L-Lactate, D-Lactate, and glycolate by the LldP and GlcA membrane carriers of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290(2):824-829.
106. Nunez MF, Pellicer MT, Badia J, Aguilar J, & Baldoma L (2001) The gene *yghK* linked to the *glc* operon of *Escherichia coli* encodes a permease for glycolate that is structurally and functionally similar to L-lactate permease. *Microbiology* 147(Pt 4):1069-1077.
107. Pellicer MT, *et al.* (1999) Cross-induction of *glc* and *ace* operons of *Escherichia coli* attributable to pathway intersection. Characterization of the *glc* promoter. *J. Biol. Chem.* 274(3):1745-1752.
108. Casal M, Paiva S, Andrade RP, Gancedo C, & Leao C (1999) The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J. Bacteriol.* 181(8):2620-2623.
109. Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, & Hediger MA (1999) Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am. J. Physiol.* 277(5 Pt 2):F685-696.
110. Choi WG & Roberts DM (2007) *Arabidopsis* NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *J. Biol. Chem.* 282(33):24209-24218.
111. Faghiri Z, *et al.* (2010) The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ: the surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter. *PLoS ONE* 5(5):e10451.

112. Badaut J (2010) Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies. *Neuroscience* 168(4):1047-1057.
113. Fonseca A, Spencer-Martins I, & van Uden N (1991) Transport of lactic acid in *Kluyveromyces marxianus*: evidence for a monocarboxylate uniport. *Yeast* 7(8):775-780.
114. Engel A & Stahlberg H (2002) Aquaglyceroporins: channel proteins with a conserved core, multiple functions, and variable surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 215:75-104.
115. Zardoya R (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol. Cell.* 97(6):397-414.
116. Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, & Kjellbom P (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim. Biophys. Acta* 1465(1-2):324-342.
117. Ishibashi K, Hara S, & Kondo S (2009) Aquaporin water channels in mammals. *Clinical and experimental nephrology* 13(2):107-117.
118. Calamita G (2000) The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel. *Mol. Microbiol.* 37(2):254-262.
119. Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ, & Saier MH, Jr. (1994) Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 269(16):11869-11872.
120. Calamita G, Bishai WR, Preston GM, Guggino WB, & Agre P (1995) Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270(49):29063-29066.
121. Froger A, *et al.* (2001) Functional characterization of a microbial aquaglyceroporin. *Microbiology* 147(Pt 5):1129-1135.
122. Rodriguez MC, *et al.* (2000) A functional water channel protein in the pathogenic bacterium *Brucella abortus*. *Microbiology* 146 Pt 12:3251-3257.
123. Zardoya R (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol. Cell.* 97(6):397-414.
124. Tanghe A, Van Dijck P, & Thevelein JM (2006) Why do microorganisms have aquaporins? *Trends Microbiol.* 14(2):78-85.
125. Hohmann I, Bill RM, Kayingo I, & Prior BA (2000) Microbial MIP channels. *Trends Microbiol.* 8(1):33-38.
126. Lorca GL, *et al.* (2007) Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. *Biochim. Biophys. Acta* 1768(6):1342-1366.
127. Georgi T, Engels V, & Wendisch VF (2008) Regulation of L-lactate utilization by the FadR-type regulator LldR of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190(3):963-971.
128. Toyoda K, Teramoto H, Inui M, & Yukawa H (2009) The *ldhA* gene, encoding fermentative L-lactate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*, is under the control of positive

- feedback regulation mediated by LldR. *J. Bacteriol.* 191(13):4251-4258.
129. Pratt EA, Fung LW, Flowers JA, & Ho C (1979) Membrane-bound D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *Biochemistry (Mosc.)* 18(2):312-316.
 130. Gao C, *et al.* (2012) Lactate utilization is regulated by the FadR-type regulator LldR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 194(10):2687-2692.
 131. Brutinel ED & Gralnick JA (2012) Preferential Utilization of D-Lactate by *Shewanella oneidensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(23):8474-8476.
 132. Jorgensen BB (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed-the role of sulphate reduction. *Nature* 296(5858):643-645.
 133. Muyzer G & Stams AJ (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(6):441-454.
 134. Glueck SM, *et al.* (2005) Biocatalytic racemization of aliphatic, arylaliphatic, and aromatic alpha-hydroxycarboxylic acids. *J. Org. Chem.* 70(10):4028-4032.
 135. Steinreiber J, Faber K, & Griengl H (2008) De-racemization of enantiomers versus de-epimerization of diastereomers--classification of dynamic kinetic asymmetric transformations (DYKAT). *Chemistry* 14(27):8060-8072.
 136. Tanner ME (2002) Understanding nature's strategies for enzyme-catalyzed racemization and epimerization. *Accounts of chemical research* 35(4):237-246.
 137. Halvorson HO & Spiegelman S (1952) The inhibition of enzyme formation by amino acid analogues. *J. Bacteriol.* 64(2):207-221.
 138. Cava F, Lam H, de Pedro MA, & Waldor MK (2011) Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* 68(5):817-831.
 139. Im H, Sharpe ML, Strych U, Davlieva M, & Krause KL (2011) The crystal structure of alanine racemase from *Streptococcus pneumoniae*, a target for structure-based drug design. *BMC Microbiol.* 11:116.
 140. Adams E (1972) 13 Amino Acid Racemases and Epimerases. *The Enzymes*, ed Paul DB (Academic Press), Vol Volume 6, pp 479-507.
 141. Fonknechten N, *et al.* (2009) A conserved gene cluster rules anaerobic oxidative degradation of L-ornithine. *J. Bacteriol.* 191(9):3162-3167.
 142. Abe K, Takahashi S, Muroki Y, Kera Y, & Yamada RH (2006) Cloning and expression of the pyridoxal 5'-phosphate-dependent aspartate racemase gene from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii* and characterization of the recombinant enzyme. *J Biochem* 139(2):235-244.

143. Goto M, *et al.* (2009) Crystal structure of a homolog of mammalian serine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 284(38):25944-25952.
144. Asano Y & Endo K (1988) Amino acid racemase with broad substrate specificity, its properties and use in phenylalanine racemization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29(6):523-527.
145. Lim YH, Yokoigawa K, Esaki N, & Soda K (1993) A new amino acid racemase with threonine alpha-epimerase activity from *Pseudomonas putida*: purification and characterization. *J. Bacteriol.* 175(13):4213-4217.
146. Matsui D & Oikawa T (2010) Detection and function of the intramolecular disulfide bond in arginine racemase: an enzyme with broad substrate specificity. *Chemistry & biodiversity* 7(6):1591-1602.
147. Yoshimura T & Goto M (2008) D-amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases. *FEBS J.* 275(14):3527-3537.
148. Rubinstein A & Major DT (2010) Understanding catalytic specificity in alanine racemase from quantum mechanical and molecular mechanical simulations of the arginine 219 mutant. *Biochemistry (Mosc.)* 49(18):3957-3964.
149. Spies MA, *et al.* (2009) Determinants of catalytic power and ligand binding in glutamate racemase. *J. Am. Chem. Soc.* 131(14):5274-5284.
150. Rubinstein A & Major DT (2009) Catalyzing racemizations in the absence of a cofactor: the reaction mechanism in proline racemase. *J. Am. Chem. Soc.* 131(24):8513-8521.
151. Ohtaki A, *et al.* (2008) Structure of aspartate racemase complexed with a dual substrate analogue, citric acid, and implications for the reaction mechanism. *Proteins* 70(4):1167-1174.
152. Chen IC, Lin WD, Hsu SK, Thiruvengadam V, & Hsu WH (2009) Isolation and characterization of a novel lysine racemase from a soil metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(15):5161-5166.
153. Glavas S & Tanner ME (2001) Active site residues of glutamate racemase. *Biochemistry (Mosc.)* 40(21):6199-6204.
154. May M, *et al.* (2007) Structural and functional analysis of two glutamate racemase isozymes from *Bacillus anthracis* and implications for inhibitor design. *J. Mol. Biol.* 371(5):1219-1237.
155. Hwang KY, *et al.* (1999) Structure and mechanism of glutamate racemase from *Aquifex pyrophilus*. *Nat. Struct. Biol.* 6(5):422-426.
156. Liu L, Iwata K, Yohda M, & Miki K (2002) Structural insight into gene duplication, gene fusion and domain swapping in the evolution of PLP-independent amino acid racemases. *FEBS Lett.* 528(1-3):114-118.

157. Buschiazzo A, *et al.* (2006) Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of *Trypanosoma cruzi* proline racemase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(6):1705-1710.
158. Puig E, Mixcoha E, Garcia-Viloca M, Gonzalez-Lafont A, & Lluch JM (2009) How the substrate D-glutamate drives the catalytic action of *Bacillus subtilis* glutamate racemase. *J. Am. Chem. Soc.* 131(10):3509-3521.
159. Richard JP & Amyes TL (2004) On the importance of being zwitterionic: enzymatic catalysis of decarboxylation and deprotonation of cationic carbon. *Bioorganic chemistry* 32(5):354-366.
160. Kenyon GL & Hegeman GD (1977) Mandelate racemase. *Methods Enzymol.* 46:541-548.
161. Siddiqi F, *et al.* (2005) Perturbing the hydrophobic pocket of mandelate racemase to probe phenyl motion during catalysis. *Biochemistry (Mosc.)* 44(25):9013-9021.
162. Prat-Resina X, Gonzalez-Lafont A, & Lluch JM (2005) Reaction mechanism of the mandelate anion racemization catalyzed by mandelate racemase enzyme: a QM/MM molecular dynamics free energy study. *J. Phys. Chem. B* 109(44):21089-21101.
163. St Maurice M & Bearne SL (2000) Reaction intermediate analogues for mandelate racemase: interaction between Asn 197 and the alpha-hydroxyl of the substrate promotes catalysis. *Biochemistry (Mosc.)* 39(44):13324-13335.
164. Nagar M, Narmandakh A, Khalak Y, & Bearne SL (2011) Redefining the minimal substrate tolerance of mandelate racemase. Racemization of trifluorolactate. *Biochemistry (Mosc.)* 50(41):8846-8852.
165. Landro JA, *et al.* (1991) Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase. 3. Asymmetry in reactions catalyzed by the H297N mutant. *Biochemistry (Mosc.)* 30(38):9274-9281.
166. Neidhart DJ, *et al.* (1991) Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase. 2. Crystal structure of mandelate racemase at 2.5-A resolution: identification of the active site and possible catalytic residues. *Biochemistry (Mosc.)* 30(38):9264-9273.
167. Mitra B, *et al.* (1995) Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase: importance of electrophilic catalysis by glutamic acid 317. *Biochemistry (Mosc.)* 34(9):2777-2787.
168. Kallarakal AT, *et al.* (1995) Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase: structure and mechanistic properties of the K166R mutant. *Biochemistry (Mosc.)* 34(9):2788-2797.
169. Bourque JR & Bearne SL (2008) Mutational analysis of the active site flap (20s loop) of mandelate racemase. *Biochemistry (Mosc.)* 47(2):566-578.

170. Gerlt JA, Babbitt PC, Jacobson MP, & Almo SC (2012) Divergent evolution in enolase superfamily: strategies for assigning functions. *J. Biol. Chem.* 287(1):29-34.
171. Katagiri H, Imai K, & Sugimori T (1960) On the Metabolism of Organic Acids by *Clostridium acetobutylicum* Part I. Formation of Lactic Acid and Racemase. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 24(2):163-172.
172. Stetter KO & Kandler O (1973) [Formation of DL-lactic acid by lactobacilli and characterization of a lactic acid racemase from several streptobacteria (author's transl)]. *Arch. Mikrobiol.* 94(3):221-247.
173. Stockland AE & San Clemente CL (1969) Multiple forms of lactate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 100(1):347-353.
174. Oren A & Gurevich P (1995) Diversity of lactate metabolism in halophilic archaea. *Can. J. Microbiol.* 41(3):302-307.
175. Malleret C, Lauret R, Ehrlich SD, Morel-Deville F, & Zagorec M (1998) Disruption of the sole *ldhL* gene in *Lactobacillus sakei* prevents the production of both L- and D-lactate. *Microbiology* 144 (Pt 12):3327-3333.
176. Melville SB, Michel TA, & Macy JM (1987) Involvement of d-lactate and lactic acid racemase in the metabolism of glucose by *Selenomonas ruminantium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 40(2-3):289-293.
177. Katagiri H, Sugimori T, & Imai K (1960) On the Metabolism of Organic Acids by *Clostridium acetobutylicum* Part II. Lactic Acid Metabolism and Relating Role of Racemase. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 24(2):173-181.
178. Katagiri H, Sugimori T, & Imai K (1961) On the Metabolism of Organic Acids by *Clostridium acetobutylicum* Part III. Purification and Properties of Racemase. *Agric. Biol. Chem.* 25(4):281-289.
179. Cantwell A & Dennis D (1974) Lactate racemase. Direct evidence for an alpha-carbonyl intermediate. *Biochemistry (Mosc.)* 13(2):287-291.
180. Shapiro SS & Dennis D (1965) Lactic Acid Racemization in *Clostridium butylicum*. Evidence for a Direct Internal Hydride Shift*. *Biochemistry (Mosc.)* 4(11):2283-2288.
181. Pepple JS & Dennis D (1976) Lactate racemase. Hydroxylamine-dependent ¹⁸O exchange of the alpha-hydroxyl of lactic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 429(3):1036-1040.
182. Chari RV & Kozarich JW (1981) Deuterium isotope effects on the product partitioning of fluoromethylglyoxal by glyoxalase I. Proof of a proton transfer mechanism. *J. Biol. Chem.* 256(19):9785-9788.
183. Hall SS, Doweyko AM, & Jordan F (1976) Glyoxalase I enzyme studies. 2. Nuclear magnetic resonance evidence for an enediol-proton transfer mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 98(23):7460-7461.

184. Gerlt JA, Kozarich JW, Kenyon GL, & Gassman PG (1991) Electrophilic catalysis can explain the unexpected acidity of carbon acids in enzyme-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 113(25):9667-9669.
185. Fewson CA, *et al.* (1993) Relationships amongst some bacterial and yeast lactate and mandelate dehydrogenases. *J. Gen. Microbiol.* 139 Pt 6:1345-1352.
186. Mowat CG, Gazur B, Campbell LP, & Chapman SK (2010) Flavin-containing heme enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 493(1):37-52.
187. Tabacchi G, *et al.* (2009) L-lactate dehydrogenation in flavocytochrome b2: a first principles molecular dynamics study. *FEBS J.* 276(8):2368-2380.
188. Rao KS & Lederer F (1998) About the pKa of the active-site histidine in flavocytochrome b2 (yeast L-lactate dehydrogenase). *Protein Sci.* 7(7):1531-1537.
189. Gondry M & Lederer F (1996) Functional properties of the histidine-aspartate ion pair of flavocytochrome b2 (L-lactate dehydrogenase): substitution of Asp282 with asparagine. *Biochemistry (Mosc.)* 35(26):8587-8594.
190. Averill BA, Schonbrunn A, & Abeles RH (1975) Studies on the mechanism of *Mycobacterium smegmatis* L-lactate oxidase. 5-Deazaflavin mononucleotide as a coenzyme analogue. *J. Biol. Chem.* 250(4):1603-1605.
191. Fitzpatrick PF (2004) Carbanion versus hydride transfer mechanisms in flavoprotein-catalyzed dehydrogenations. *Bioorganic chemistry* 32(3):125-139.
192. Mowat CG, *et al.* (2004) Altered substrate specificity in flavocytochrome b2: structural insights into the mechanism of L-lactate dehydrogenation. *Biochemistry (Mosc.)* 43(29):9519-9526.
193. Mertz W (1981) The essential trace elements. *Science* 213(4514):1332-1338.
194. Zhang Y & Gladyshev VN (2009) Comparative genomics of trace elements: emerging dynamic view of trace element utilization and function. *Chem. Rev.* 109(10):4828-4861.
195. Hausinger R & Zamble D (2007) Microbial Physiology of Nickel and Cobalt. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, Microbiology Monographs, eds Nies D & Silver S (Springer Berlin Heidelberg), Vol 6, pp 287-320.
196. Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, & Thornton JM (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13(8):1205-1218.
197. Nies D (2007) Bacterial Transition Metal Homeostasis. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, Microbiology Monographs, eds Nies D & Silver S (Springer Berlin Heidelberg), Vol 6, pp 117-142.

198. Rodionov DA, Hebbeln P, Gelfand MS, & Eitinger T (2006) Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *J. Bacteriol.* 188(1):317-327.
199. Stoof J, Kuipers EJ, Klaver G, & van Vliet AH (2010) An ABC transporter and a TonB ortholog contribute to *Helicobacter mustelae* nickel and cobalt acquisition. *Infect. Immun.* 78(10):4261-4267.
200. Eitinger T, Suhr J, Moore L, & Smith JA (2005) Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations. *Biomaterials* 18(4):399-405.
201. Wattt RK & Ludden PW (1999) Nickel-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 56(7-8):604-625.
202. Fu C, Olson JW, & Maier RJ (1995) HypB protein of *Bradyrhizobium japonicum* is a metal-binding GTPase capable of binding 18 divalent nickel ions per dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(6):2333-2337.
203. Kaluarachchi H, Zhang JW, & Zamble DB (2011) *Escherichia coli* SlyD, more than a Ni(II) reservoir. *Biochemistry (Mosc.)* 50(50):10761-10763.
204. Schauer K, *et al.* (2010) The *Helicobacter pylori* GroES cochaperonin HspA functions as a specialized nickel chaperone and sequestration protein through its unique C-terminal extension. *J. Bacteriol.* 192(5):1231-1237.
205. Maier RJ, Benoit SL, & Seshadri S (2007) Nickel-binding and accessory proteins facilitating Ni-enzyme maturation in *Helicobacter pylori*. *Biomaterials* 20(3-4):655-664.
206. Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27(2-3):313-339.
207. Rodrigue A, Effantin G, & Mandrand-Berthelot MA (2005) Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187(8):2912-2916.
208. Bleriot C, Effantin G, Lagarde F, Mandrand-Berthelot MA, & Rodrigue A (2011) RcnB is a periplasmic protein essential for maintaining intracellular Ni and Co concentrations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 193(15):3785-3793.
209. Higgins KA, Carr CE, & Maroney MJ (2012) Specific metal recognition in nickel trafficking. *Biochemistry (Mosc.)* 51(40):7816-7832.
210. Kim JS, Kang SO, & Lee JK (2003) The protein complex composed of nickel-binding SrnQ and DNA binding motif-bearing SrnR of *Streptomyces griseus* represses *sodF* transcription in the presence of nickel. *J. Biol. Chem.* 278(20):18455-18463.
211. Benoit SL & Maier RJ (2011) Mua (HP0868) is a nickel-binding protein that modulates urease activity in *Helicobacter pylori*. *mBio* 2(2):e00039-00011.

212. Helmann J, Soonsanga S, & Gabriel S (2007) Metalloregulators: Arbiters of Metal Sufficiency. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, Microbiology Monographs, eds Nies D & Silver S (Springer Berlin Heidelberg), Vol 6, pp 37-71.
213. An YJ, *et al.* (2009) Structural basis for the specialization of Nur, a nickel-specific Fur homolog, in metal sensing and DNA recognition. *Nucleic Acids Res.* 37(10):3442-3451.
214. Schreiter ER, Wang SC, Zamble DB, & Drennan CL (2006) NikR-operator complex structure and the mechanism of repressor activation by metal ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(37):13676-13681.
215. Campbell DR, *et al.* (2007) Mycobacterial cells have dual nickel-cobalt sensors: sequence relationships and metal sites of metal-responsive repressors are not congruent. *J. Biol. Chem.* 282(44):32298-32310.
216. Higgins KA, Chivers PT, & Maroney MJ (2012) Role of the N-terminus in determining metal-specific responses in the *E. coli* Ni- and Co-responsive metalloregulator, RcnR. *J. Am. Chem. Soc.* 134(16):7081-7093.
217. Zhu T, Tian J, Zhang S, Wu N, & Fan Y (2011) Identification of the transcriptional regulator NcrB in the nickel resistance determinant of *Leptospirillum ferriphilum* UBK03. *PLoS ONE* 6(2):e17367.
218. Foster AW, Patterson CJ, Pernil R, Hess CR, & Robinson NJ (2012) Cytosolic Ni(II) sensor in cyanobacterium: nickel detection follows nickel affinity across four families of metal sensors. *J. Biol. Chem.* 287(15):12142-12151.
219. Irving H & Williams RJP (1953) 637. The stability of transition-metal complexes. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*:3192-3210.
220. Waldron KJ & Robinson NJ (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* 7(1):25-35.
221. Reyes-Caballero H, Campanello GC, & Giedroc DP (2011) Metalloregulatory proteins: metal selectivity and allosteric switching. *Biophys. Chem.* 156(2-3):103-114.
222. Dokmanic I, Sikic M, & Tomic S (2008) Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 64(Pt 3):257-263.
223. Rulisek L & Vondrasek J (1998) Coordination geometries of selected transition metal ions (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺) in metalloproteins. *J. Inorg. Biochem.* 71(3-4):115-127.
224. Ma Z, Jacobsen FE, & Giedroc DP (2009) Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem. Rev.* 109(10):4644-4681.

225. Cherrier MV, Cavazza C, Bochot C, Lemaire D, & Fontecilla-Camps JC (2008) Structural characterization of a putative endogenous metal chelator in the periplasmic nickel transporter NikA. *Biochemistry (Mosc.)* 47(38):9937-9943.
226. Mulrooney SB & Hausinger RP (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 27(2-3):239-261.
227. Vignais PM & Billoud B (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem. Rev.* 107(10):4206-4272.
228. Sumner I & Voth GA (2012) Proton transport pathways in [NiFe]-hydrogenase. *J. Phys. Chem. B* 116(9):2917-2926.
229. Lill SO & Siegbahn PE (2009) An autocatalytic mechanism for NiFe-hydrogenase: reduction to Ni(I) followed by oxidative addition. *Biochemistry (Mosc.)* 48(5):1056-1066.
230. Siegbahn PE, Tye JW, & Hall MB (2007) Computational studies of [NiFe] and [FeFe] hydrogenases. *Chem. Rev.* 107(10):4414-4435.
231. Leach MR & Zamble DB (2007) Metallocenter assembly of the hydrogenase enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11(2):159-165.
232. Mulder DW, *et al.* (2010) Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydA(DeltaEFG). *Nature* 465(7295):248-251.
233. McGlynn SE, *et al.* (2007) *In vitro* activation of [FeFe] hydrogenase: new insights into hydrogenase maturation. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12(4):443-447.
234. McGlynn SE, *et al.* (2008) HydF as a scaffold protein in [FeFe] hydrogenase H-cluster biosynthesis. *FEBS Lett.* 582(15):2183-2187.
235. Kuchenreuther JM, Britt RD, & Swartz JR (2012) New Insights into [FeFe] Hydrogenase Activation and Maturase Function. *PLoS ONE* 7(9):e45850.
236. Vallese F, *et al.* (2012) Biochemical Analysis of the Interactions between the Proteins Involved in the [FeFe]-Hydrogenase Maturation Process. *J. Biol. Chem.* 287(43):36544-36555.
237. Carter EL, Flugge N, Boer JL, Mulrooney SB, & Hausinger RP (2009) Interplay of metal ions and urease. *Metallomics* 1(3):207-221.
238. Zambelli B, Musiani F, Benini S, & Ciurli S (2011) Chemistry of Ni²⁺ in urease: sensing, trafficking, and catalysis. *Accounts of chemical research* 44(7):520-530.
239. Warren M, Deery E, & Rose R-S (2009) Biosynthesis of Siroheme and Coenzyme F430. *Tetrapyrroles*, Molecular Biology Intelligence Unit, (Springer New York), pp 344-351.
240. Cedervall PE, *et al.* (2011) Structural analysis of a Ni-methyl species in methyl-coenzyme M reductase from *Methanothermobacter marburgensis*. *J. Am. Chem. Soc.* 133(15):5626-5628.

241. Harmer J, *et al.* (2008) A nickel hydride complex in the active site of methyl-coenzyme m reductase: implications for the catalytic cycle. *J. Am. Chem. Soc.* 130(33):10907-10920.
242. Amara P, Mouesca JM, Volbeda A, & Fontecilla-Camps JC (2011) Carbon monoxide dehydrogenase reaction mechanism: a likely case of abnormal CO₂ insertion to a Ni-H(-) bond. *Inorg. Chem.* 50(5):1868-1878.
243. Horn B, Limberg C, Herwig C, & Mebs S (2011) The conversion of nickel-bound CO into an acetyl thioester: organometallic chemistry relevant to the acetyl coenzyme A synthase active site. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50(52):12621-12625.
244. Lindahl PA & Graham DE (2007) Acetyl-coenzyme A Synthases and Nickel-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenases. *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp 357-415.
245. Mulrooney SB & Hausinger RP (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 27(2-3):239-261.
246. Loke HK & Lindahl PA (2003) Identification and preliminary characterization of AcsF, a putative Ni-insertase used in the biosynthesis of acetyl-CoA synthase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Inorg. Biochem.* 93(1-2):33-40.
247. Bryngelson PA & Maroney MJ (2007) Nickel Superoxide Dismutase. *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp 417-443.
248. Sukdeo N, Daub E, & Honek JF (2007) Biochemistry of the Nickel-Dependent Glyoxalase I Enzymes. *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp 445-471.
249. Thornalley PJ (2003) Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem. Soc. Trans.* 31(Pt 6):1343-1348.
250. Albers E (2009) Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. *IUBMB Life* 61(12):1132-1142.
251. Pochapsky TC, *et al.* (2007) Nickel in Acireductone Dioxygenase. *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp 473-500.
252. Ju T, *et al.* (2006) One protein, two enzymes revisited: a structural entropy switch interconverts the two isoforms of acireductone dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 363(4):823-834.
253. Valdez CE & Alexandrova AN (2012) Why urease is a di-nickel enzyme whereas the CcrA beta-lactamase is a di-zinc enzyme. *J. Phys. Chem. B* 116(35):10649-10656.
254. Lindahl PA (2012) Metal-metal bonds in biology. *J. Inorg. Biochem.* 106(1):172-178.

255. Ragsdale SW (2009) Nickel-based Enzyme Systems. *J. Biol. Chem.* 284(28):18571-18575.
256. Korner H, Sofia HJ, & Zumft WG (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* 27(5):559-592.
257. Lawson CL, *et al.* (2004) Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14(1):10-20.
258. Busby S & Ebright RH (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293(2):199-213.
259. Moreno-Campuzano S, Janga SC, & Perez-Rueda E (2006) Identification and analysis of DNA-binding transcription factors in *Bacillus subtilis* and other Firmicutes--a genomic approach. *BMC Genomics* 7:147.
260. Scortti M, Monzo HJ, Lacharme-Lora L, Lewis DA, & Vazquez-Boland JA (2007) The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect.* 9(10):1196-1207.
261. Xayarath B, Volz KW, Smart JI, & Freitag NE (2011) Probing the role of protein surface charge in the activation of PrfA, the central regulator of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *PLoS ONE* 6(8):e23502.
262. Doern CD, Holder RC, & Reid SD (2008) Point mutations within the streptococcal regulator of virulence (Srv) alter protein-DNA interactions and Srv function. *Microbiology* 154(Pt 7):1998-2007.
263. Riboulet-Bisson E, *et al.* (2009) Ers a Crp/Fnr-like transcriptional regulator of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* 131(1):71-74.
264. Reid SD, Montgomery AG, & Musser JM (2004) Identification of srv, a PrfA-like regulator of group A *streptococcus* that influences virulence. *Infect. Immun.* 72(3):1799-1803.
265. Riboulet-Bisson E, *et al.* (2008) Characterization of the Ers regulon of *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 76(7):3064-3074.
266. Madsen SM, Hindre T, Le Pennec JP, Israelsen H, & Dufour A (2005) Two acid-inducible promoters from *Lactococcus lactis* require the cis-acting ACiD-box and the transcription regulator RctB. *Mol. Microbiol.* 56(3):735-746.
267. Cruz Ramos H, *et al.* (1995) Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *EMBO J.* 14(23):5984-5994.
268. Siezen RJ & van Hylckama Vlieg JE (2011) Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial cell factories* 10 Suppl 1:S3.
269. Lietzan AD, *et al.* (2012) Structure of mandelate racemase with bound intermediate analogues benzohydroxamate and cupferron. *Biochemistry (Mosc.)* 51(6):1160-1170.

270. Ghosh A, Wondimagegn T, & Ryeng H (2001) Deconstructing F(430): quantum chemical perspectives of biological methanogenesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5(6):744-750.
271. Benini S, Ciurli S, Nolting HF, & Mangani S (1996) X-ray absorption spectroscopy study of native and phenylphosphorodiamidate-inhibited *Bacillus pasteurii* urease. *Eur. J. Biochem.* 239(1):61-66.
272. Babbitt PC & Gerlt JA (1997) Understanding enzyme superfamilies. Chemistry As the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities. *J. Biol. Chem.* 272(49):30591-30594.
273. Silva AM, Kong X, & Hider RC (2009) Determination of the pKa value of the hydroxyl group in the alpha-hydroxycarboxylates citrate, malate and lactate by ¹³C NMR: implications for metal coordination in biological systems. *Biometals* 22(5):771-778.
274. Barton BE & Rauchfuss TB (2010) Hydride-containing models for the active site of the nickel-iron hydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* 132(42):14877-14885.
275. Gunsalus RP & Wolfe RS (1980) Methyl coenzyme M reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Resolution and properties of the components. *J. Biol. Chem.* 255(5):1891-1895.
276. Buhrke T, Lenz O, Krauss N, & Friedrich B (2005) Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J. Biol. Chem.* 280(25):23791-23796.
277. Ensign SA & Ludden PW (1991) Characterization of the CO oxidation/H₂ evolution system of *Rhodospirillum rubrum*. Role of a 22-kDa iron-sulfur protein in mediating electron transfer between carbon monoxide dehydrogenase and hydrogenase. *J. Biol. Chem.* 266(27):18395-18403.
278. Mahlert F, Bauer C, Jaun B, Thauer RK, & Duin EC (2002) The nickel enzyme methyl-coenzyme M reductase from methanogenic archaea: *In vitro* induction of the nickel-based MCR-ox EPR signals from MCR-red2. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7(4-5):500-513.
279. Frey PA (2001) Radical mechanisms of enzymatic catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 70:121-148.
280. Massey V, *et al.* (1969) The reactivity of flavoproteins with sulfite. Possible relevance to the problem of oxygen reactivity. *J. Biol. Chem.* 244(15):3999-4006.
281. Lugina LN, Davidenko NK, & Gavrish SP (1985) Quenching of the fluorescence of riboflavin by the histidines and alanines of nickel, copper, and zinc. *Theor Exp Chem* 21(4):466-470.
282. Gibrat JF, Madej T, & Bryant SH (1996) Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6(3):377-385.

283. Lim LW, *et al.* (1986) Three-dimensional structure of the iron-sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase at 2.4-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 261(32):15140-15146.
284. Lee JH, *et al.* (2010) Characterization and structure of DhpI, a phosphonate O-methyltransferase involved in dehydrophos biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(41):17557-17562.
285. Kozbial PZ & Mushegian AR (2005) Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Struct. Biol.* 5:19.
286. Swapna LS, Srikeerthana K, & Srinivasan N (2012) Extent of structural asymmetry in homodimeric proteins: prevalence and relevance. *PLoS ONE* 7(5):e36688.
287. Hennig M, Grimm B, Contestabile R, John RA, & Jansonius JN (1997) Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: an alpha2-dimeric vitamin B6-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(10):4866-4871.
288. Teusink B, *et al.* (2006) Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. *J. Biol. Chem.* 281(52):40041-40048.
289. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, & Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(10):5752-5756.
290. Nicolet Y, Fontecilla-Camps JC, & Fontecave M (2010) Maturation of [FeFe]-hydrogenases: Structures and mechanisms. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(19):10750-10760.
291. Katayama M, Tsinoremas NF, Kondo T, & Golden SS (1999) *cpmA*, a gene involved in an output pathway of the cyanobacterial circadian system. *J. Bacteriol.* 181(11):3516-3524.
292. Dvornyk V & Jahan AS (2012) Extreme conservation and non-neutral evolution of the *cpmA* Circadian locus in a globally distributed *Chroococcidiopsis* sp. from naturally stressful habitats. *Mol. Biol. Evol.* 29(12):3899-3907.
293. Sings HL, Bible KC, & Rinehart KL (1996) Acyl tunichlorins: a new class of nickel chlorins isolated from the Caribbean tunicate *Trididemnum solidum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(20):10560-10565.
294. McDonald LC, Fleming HP, & Hassan HM (1990) Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(7):2120-2124.
295. Goffin P, *et al.* (2010) Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. *Mol. Syst. Biol.* 6:413.
296. Bandell M & Lolkema JS (1999) Stereoselectivity of the membrane potential-generating citrate and malate transporters of lactic acid bacteria. *Biochemistry (Mosc.)* 38(32):10352-10360.

297. Altaras NE, Etzel MR, & Cameron DC (2001) Conversion of sugars to 1,2-propanediol by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8. *Biotechnol. Prog.* 17(1):52-56.
298. Desai SG, Gueriot ML, & Lynd LR (2004) Cloning of L-lactate dehydrogenase and elimination of lactic acid production via gene knockout in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(5):600-605.
299. Lee CK & Ordal ZJ (1967) Regulatory effect of pyruvate on the glucose metabolism of *Clostridium thermosaccharolyticum*. *J. Bacteriol.* 94(3):530-536.
300. Diez-Gonzalez F, Russell JB, & Hunter JB (1997) NAD-independent lactate and butyryl-CoA dehydrogenases of *Clostridium acetobutylicum* P262. *Curr. Microbiol.* 34(3):162-166.
301. Hartman AL, *et al.* (2010) The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon. *PLoS ONE* 5(3):e9605.
302. Benson DR & Silvester WB (1993) Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57(2):293-319.
303. Kappler U, *et al.* (2012) Complete genome sequence of the facultatively chemolithoautotrophic and methylotrophic alpha Proteobacterium *Starkeya novella* type strain (ATCC 8093(T)). *Standards in genomic sciences* 7(1):44-58.
304. Chakrabarti N, Roux B, & Pomes R (2004) Structural determinants of proton blockage in aquaporins. *J. Mol. Biol.* 343(2):493-510.
305. Savage DF, O'Connell JD, 3rd, Miercke LJ, Finer-Moore J, & Stroud RM (2010) Structural context shapes the aquaporin selectivity filter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(40):17164-17169.
306. Ishibashi K (2006) Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochim. Biophys. Acta* 1758(8):989-993.
307. Fu D, *et al.* (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 290(5491):481-486.
308. Wade W (2006) The Genus *Eubacterium* and Related Genera. *The Prokaryotes*, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (Springer US), pp 823-835.