

NÉCESSITÉ DES ORTHODIPHÉNOLS POUR LA CROISSANCE DE *COCCUS P (SARCINA SP.)*

par

LUIGI GORINI ET RICHARD LORD

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

Au cours de recherches en vue d'établir un milieu synthétique de culture pour *Coccus P (Sarcina sp.)**, nous nous sommes aperçus que la croissance de ces bactéries est d'autant plus facile que le milieu a été plus fortement chauffé pendant la stérilisation à l'autoclave. Après avoir constaté que ce fait est dû à une modification subie, au cours du chauffage, par la tyrosine contenue dans le milieu, nous avons trouvé que *Coccus P* n'a pas besoin de la tyrosine en tant qu'acide aminé, mais seulement en tant que source de dihydroxyphénylalanine. En fait la présence d'un orthodiphénol s'est révélée nécessaire à la croissance de ces bactéries.

Nous étudions ici les conditions d'action de ce type de substance.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques

Souches bactériennes. Nous avons utilisé une souche de *Coccus P* provenant de la collection de l'Institut Pasteur de Bruxelles. Sa culture exige un milieu complexe contenant de l'hydrolysate de caséine et de l'extrait de levure. A partir de cette souche, nous avons isolé deux variants qui sont capables de se développer dans le milieu synthétique décrit ci-dessous: *Coccus PS* (non protéolytique) et *Coccus PSP* (protéolytique).

Milieux de culture. Les substances suivantes, indispensables à la croissance de *Coccus P*, sont contenues dans tous les milieux à la concentration optimum indiquée: KH_2PO_4 10^{-3} M; MgSO_4 $5 \cdot 10^{-4}$ M; FeSO_4 10^{-5} M; CuSO_4 10^{-7} M; guanine (Roche) 10^{-4} M; biotine (Roche) 10^{-9} M. A ces concentrations, ces substances ne limitent pas la croissance jusqu'à une densité bactérienne de 2,000 μg de bactéries (poids sec) par ml de culture.

Les sources de C et de N utilisées, varient suivant les expériences; elles sont indiquées dans chaque cas. Le milieu que nous appelons *standard* contient pour 100 ml: acide L-glutamique** 0.2 g; Na acétate 0.2 g; glucose 0.2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g.

Les dérivés phénoliques ajoutés au milieu sont indiqués dans chaque expérience.

Avant l'addition du glucose et des phénols, les milieux sont ajustés à pH 7.2 par NaOH N et stérilisés à l'autoclave. Le glucose est stérilisé à part et ajouté stérilement. Les solutions des phénols, à une concentration 100 fois plus grande que celle qu'on veut réaliser dans le milieu, sont ajoutées stérilement au moment de l'ensemencement. Elles sont préparées à froid, filtrées sur filtre Seitz stérilisant, conservées à 0° et employées dans les 24 heures qui suivent leur préparation. Le montage du filtre Seitz est en verre et acier inoxydable et la rondelle filtrante est lavée soigneusement avec HCl N.

Conditions de culture. L'inoculum est une culture de 24 heures à 37° dans le milieu standard contenant du catéchol 10^{-6} M et ayant une densité bactérienne de 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ environ. Le volume de l'inoculum est le 1/100 de celui du milieu ensemencé. L'incubation de la culture est faite à 26° ou à 37° avec agitation.

Détermination de la croissance. La densité bactérienne est appréciée par la détermination de

* Il s'agit d'une *Sarcina* très proche de *Micrococcus lysodeikticus*, isolée par BEUMER¹, qu'il a provisoirement dénommée *Coccus P*.

** Cet acide est introduit sous forme d'acide DL-glutamique synthétique.

la densité optique et donnée en μg de bactéries (poids sec) par ml de culture. Pour tout détail voir². Suivant le cas on exprime la croissance soit par le taux de croissance (nombre μ de divisions par heure, pendant la phase exponentielle de croissance), soit par la densité bactérienne atteinte après un temps donné.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS

I. Les composés phénoliques nécessaires à la croissance dans le milieu standard

a. *Activité des diphénols en fonction de leur structure, état d'oxydation et concentration dans le milieu.* Dans une série d'expériences, nous avons comparé l'action sur la croissance de *Coccus PS* d'un certain nombre d'*ortho*, *méta* et *paradiphénols* et de quelques uns de leurs dérivés de substitution. Le Tableau I montre que: (a) seuls les isomères *ortho* sont actifs; (b) l'activité n'est pas liée à un potentiel d'oxydo-réduction (E_o) particulier des isomères *ortho*; (c) certains *orthodiphénols* substitués en position 4 (cyano ou méthylcarbonyle) sont environ 10 fois plus actifs que le catéchol non substitué; (d) l'absence d'activité des *méta* et *paradiphénols* n'est pas due à une toxicité de ces produits pour la culture de *Coccus PS*; en effet les cultures contenant ces diphénols se développent normalement après addition de catéchol.

TABLEAU I
ACTION DES DIPHÉNOLS

Souche *Coccus PS*; milieu standard. R = 1,2-dihydroxyphényle; cat = catéchol $5 \cdot 10^{-6} M$.
Les chiffres représentent le rendement de la culture (μg bactéries/ml) après 24 heures à 37° .

E_o	Diphénols	Formules	Concentration (moles/l)			
			$5 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$ + cat.
0.792	catéchol	R-H	510	1430	1520	
	4-fluorocatéchol	R-(4)F	120	1380	1500	
	4-chlorocatéchol	R-(4)Cl	70	1440	1240	
	4-aminocatéchol	R-(4)NH ₂	50	1440	1370	
	4-cyanocatéchol	R-(4)CN	1360	1320	1380	
	dihydroxy- acétophénone	R-(4)COCH ₃	1470	1500	1480	
0.800	dopa	R-(4)CH ₂ -CHNH ₂ -COOH		210	1490	
0.883	ac. protocatéchique	R-(4)COOH		1050	1530	
0.809	adrénaline	R-(4)CHOH-CH ₂ -NHCH ₃		1360	1500	
	artérénol	R-(4)CHOH-CH ₂ NH ₂		1040		
0.713	pyrogallol	R-(6)OH		330	1540	
0.799	ac. gallique	R- $\begin{cases} (4)\text{COOH} \\ (6)\text{OH} \end{cases}$		230	1520	
	résorcine	1,3-dihydroxyphénol		0	0	1430
0.696	hydroquinone	1,4-dihydroxyphénol		0	0	1180
0.793	ac. gentisique	1,4-dihydroxyphénol-(2)COOH		0	0	1350
	Aucune addition				0	

Les milieux contenant le catéchol à 10^{-7} ou à $10^{-6} M$ conservés pendant quelques semaines à la température ambiante, ne sont plus capables de supporter la croissance de *Coccus PS* et *PSP* et nécessitent l'addition d'une nouvelle quantité de catéchol. Nous avons donc étudié l'influence de l'oxydation sur l'action des *orthodiphénols* en comparant d'une part l'activité de l'adrénaline à celle de l'adrénochrome*, et d'autre part l'activité de trois échantillons d'une même solution conservés (a) à 0° , (b) à 37°

* La présence de l'adrénochrome pendant les premières heures d'incubation est aisément contrôlable par sa coloration.

avec agitation à l'air et (c) à 100° (2 minutes après avoir porté le pH à 9). Le Tableau II montre que l'oxydation d'un orthodiphénol en l'orthoquinone correspondante (adrénaline-adrénochrome) ne supprime pas son activité comme facteur de croissance, tandis qu'une oxydation plus poussée (catéchol oxydé à pH 9) l'annule complètement. Le tableau montre encore que les produits d'oxydation ne sont pas toxiques pour la culture.

TABLEAU II

DEGRÉS D'OXYDATION DE L'ORTHODIPHÉNOI.

Souche *Coccus PS*; milieu standard; μ = Taux de croissance; Rendement = μg bactéries/ml

Substances	Concentr. moles/l	Traitement	Croissance à 37°			
			sans autre addition		après addition de catéchol 10^{-6} M	
			μ	Rendement après 24 h	μ	Rendement après 24 h
Adrénaline	$5 \cdot 10^{-5}$		0.30	990		
Adrénochrome	$5 \cdot 10^{-5}$		0.31	1010		
Catéchol	10^{-6}	87 heures à 0°	0.53	1370	0.52	1390
Catéchol	10^{-6}	87 h agité à 37°	0.20	450	0.52	1240
Catéchol	10^{-6}	2 min à 100° à pH 9	0	0	0.53	1380

Les courbes de la Fig. 1 donnent la croissance de *Coccus PS* en fonction de la concentration en catéchol dans le milieu. On obtient une croissance optimum (courbe 2 et 3) avec une concentration en catéchol comprise entre 10^{-5} et 10^{-6} M. Avec le catéchol 10^{-7} M (courbe 4) le taux de croissance est le même mais la culture est limitée en diphenol. Sa croissance s'arrête plus tôt que dans les cas 2 et 3 et ne reprend qu'après un certain temps. Nous avons observé qu'une nouvelle addition de catéchol ne change pas sensiblement ce comportement. Les cultures contenant une quantité de catéchol encore plus petite (10^{-8} M) ne se développent pas. La culture (courbe 1) contenant du catéchol à une concentration élevée (10^{-3} M) a un comportement particulier. Sa croissance démarre lentement et dans les 2 à 4 premières heures d'incubation le milieu brunit visiblement. Le même milieu stérile ne présente pas une teinte aussi foncée, même après 24 heures de conservation dans les mêmes conditions. *Coccus PS* doit donc produire une phénoloxydase catalysant l'oxydation du catéchol. Ainsi la concentration de ce dernier, toxique au début, baisse progressivement et le taux de croissance de la culture augmente jusqu'à atteindre celui des autres cultures de la Fig. 1. Ceci montre également que les mélanines dérivées de l'oxydation enzymatique du catéchol ne sont pas toxiques pour la culture.

Bibliographie p. 90.

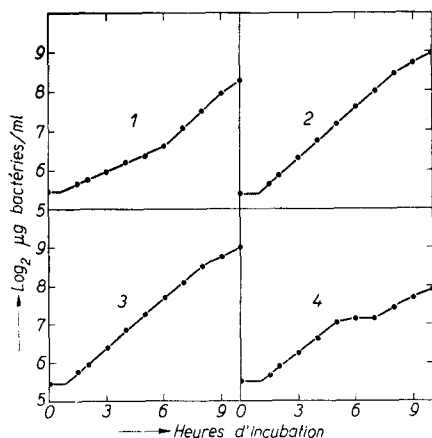


Fig. 1. Souche *Coccus PS*; milieu standard; incubation à 37°. Courbe 1, catéchol 10^{-3} M; courbe 2, catéchol 10^{-5} M; courbe 3, catéchol 10^{-6} M; courbe 4, catéchol 10^{-7} M.


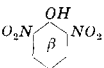
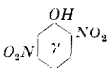
b. *Les monophénols comme source d'orthodiphénols.* Le point de départ de nos recherches a été l'observation que les cultures de *Coccus PS* et *PSP* ne contenant pas de diphénols mais de la tyrosine, se développent normalement si cette substance est relativement concentrée (10^{-3} M) et si elle se trouve dans le milieu (pH 7.2) pendant la stérilisation à l'autoclave. Mais si la tyrosine est ajoutée après la stérilisation (solution dans HCl N, filtrée par Seitz), la croissance ne survient qu'après un temps d'induction considérable (≈ 15 heures). Nous avons observé un comportement analogue avec des cultures de *Coccus PS* contenant du *paracrésol*. On n'observe une croissance que si la concentration du *paracrésol* est voisine de 10^{-3} M. La croissance, après un temps de latence d'une trentaine d'heures, a alors lieu à une vitesse comparable à celle des cultures effectuées en présence de catéchol. Toutes les cultures contenant de la tyrosine ou du *paracrésol* à une concentration de l'ordre de 10^{-3} M, brunissent d'une façon évidente. Le Tableau III montre que la tyrosine ou le *paracrésol* à une concentration inférieure à 10^{-3} M ne permettent la croissance de *Coccus PS* qu'en présence d'une trace de catéchol. Ce tableau montre aussi qu'à la concentration utilisée, aucune des trois substances n'est capable, à elle seule, de stimuler la croissance.

TABLEAU III
ACTION DES MONOPHÉNOLS
Souche *Coccus PS*; milieu standard. Rendement = μg bactéries/ml.

Monophénols	Concentration moles/l	Rendement après 48 heures à 37°	
		sans autre addition	présence de catéchol $5 \cdot 10^{-8}$ M
Rien		0	50
Tyrosine	10^{-4}	10	330
Tyrosine	$5 \cdot 10^{-4}$	30	1650
Tyrosine	10^{-3}	1470	
<i>Paracrésol</i>	$4 \cdot 10^{-5}$	0	1770
<i>Paracrésol</i>	10^{-3}	1530	

Dans une série d'expériences préliminaires, nous avons constaté que l'addition de α , β ou γ dinitrophénol (10^{-3} M) n'influence pas le taux de croissance exponentielle d'une culture de *Coccus PS* ou *PSP* à 26° dans le milieu standard contenant du catéchol (10^{-5} M). Nous avons alors étudié l'influence de ces substances à 10^{-4} M sur une culture de *Coccus PS* ne contenant pas de catéchol. Après un temps d'induction de

TABLEAU IV
ACTION DES MONOPHÉNOLS SUBSTITUÉS
Souche *Coccus PS*; milieu standard; phénols à 10^{-4} M.
Les chiffres représentent la densité bactérienne en μg bactéries/ml.

Temps d'incubation à 26° (heures)	Incubation en présence de				
	rien				catéchol
40	41	67	45	53	1560
85	45	820	169	930	1480
100	57	1330	285	1430	1450

40 heures environ, nous avons obtenu le développement des cultures dans le cas seulement des isomères α et γ dont la position *ortho* par rapport à l'OH phénolique est libre (Tableau IV). Ces cultures présentent en fin de croissance une teinte très brune, tandis que celle effectuées en présence de l'isomère β reste jaune. Il est donc évident que grâce à la phénoloxydase de *Coccus PS* les monophénols sont en mesure de fonctionner comme facteurs de croissance en donnant naissance aux diphénols correspondants. La présence d'une trace de diphénol servant d'amorce est vraisemblablement toujours nécessaire.

II. Nécessité du catéchol et conditions métaboliques de *Coccus PS* et *PSP*

Nous avons constaté que la culture de *Coccus PS* et *PSP* donne le meilleur rendement et le taux de croissance exponentielle le plus élevé ($\mu = 0.5$ à 37°) dans le milieu standard additionné de catéchol. Cependant, il est possible d'obtenir des cultures de *Coccus PS* et *PSP* dans des milieux plus simples ou différents. Nous avons donc recherché systématiquement les métabolites permettant la croissance de *Coccus PS* et *PSP* et nous avons étudié l'exigence en catéchol dans ces diverses conditions.

Coccus PS et *PSP* ne sont pas exigeants en glutamate. Le Tableau V montre la croissance de *Coccus PS* en fonction de la concentration en catéchol dans un milieu sans glutamate, contenant comme source de N le sulfate d'ammonium et comme source de C les substances indiquées dans le tableau. On voit que lorsque la croissance est possible, elle est toujours subordonnée à la présence de catéchol.

TABLEAU V

INFLUENCE DU CATÉCHOL LORS DE L'UTILISATION DE DIFFÉRENTES SOURCES DE CARBONE
Souche *Coccus PS*; milieu: sels minéraux, biotine, guanine, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 % + source de carbone à 0.6 %; incubation: 3 jours à 26° .
Les chiffres représentent la densité bactérienne en μg bactéries/ml.

Sources de carbone	Concentrations en catéchol (moles/l)					
	0	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Acétate	0	560	625	650	630	660
Pyruvate*	0	0	0	355	370	390
Succinate	0	50	112	660	720	550
Malate*	0	0	0	220	295	0
Fumarate	0	0	44	70	54	0
Lactate ou cétoglutarate* ou citrate ou glucose	0	0	0	0	0	0

* La solution de ces substances est stérilisée par filtration Seitz et ajoutée au milieu stérile.

D'autre part, *Coccus PS* et *PSP* se cultivent aussi sur un milieu ne contenant que du glutamate comme source à la fois de C et de N. On peut remplacer cet acide aminé par l'histidine mais non par un quelconque des autres acides aminés contenus dans la caséine. Le Tableau VI montre que lorsque la croissance est possible, elle dépend de la présence du catéchol.

Comme source de N (en présence d'une source de C indépendante) *Coccus PS* et *PSP* utilisent indifféremment N α -aminé ou N ammoniacal (moins bien l'urée), la présence du catéchol étant indispensable à la croissance dans tous les cas (Tableau VII).

Bibliographie p. 90.

TABLEAU VI

INFLUENCE DU CATÉCHOL LORS DE L'UTILISATION D'UN ACIDE AMINÉ COMME SEULE SOURCE À LA FOIS DE CARBONE ET D'AZOTE

Souche *Coccus PS*; milieu: sels minéraux, biotine, guanine + 0.6 % de l'acide aminé indiqué; Incubation: 2 jours à 37°. Les chiffres représentent la densité bactérienne en μg bactéries/ml.

Acide aminé	Concentrations en catéchol (moles/l)	
	0	10^{-5}
Glutamate	0	1340
Histidine	0	520
Glycine et les autres acides aminés de la caséine	0	0

TABLEAU VII

INFLUENCE DU CATÉCHOL LORS DE L'UTILISATION DE DIFFÉRENTES SOURCES D'AZOTE

Souche *Coccus PS*; milieu: sels minéraux, biotine, guanine, succinate 0.6 % + sources d'azote; incubation: 2 jours à 37°. Les chiffres représentent la densité bactérienne en μg bactéries/ml.

Sources d'azote	Concentrations en catéchol (moles/l)	
	0	10^{-5}
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$1.5 \cdot 10^{-2} M$	0
Glycine	$3 \cdot 10^{-2} M$	0
Urée	$1.5 \cdot 10^{-2} M$	0
		1190
		970
		350

CONCLUSIONS

Les variants *Coccus PS* et *PSP* exigent un orthodiphénol pour leur croissance. Le groupement orthodiphénol est la structure nécessaire, celle du reste de la molécule n'ayant pas une importance essentielle. Les produits d'oxydation (mélanine) au delà de la quinone, ne sont pas actifs. L'exigence en diphénol est très stricte. Ainsi *Coccus PS* et *PSP* ensemencés en l'absence de diphénol, ne donnent aucune croissance appréciable même après 48 heures d'incubation à 37°; mais si on ajoute alors du catéchol, la croissance se déclenche et atteint son maximum au cours des 15 heures suivantes.

Certains monophénols peuvent aussi provoquer la croissance de *Coccus PS* et *PSP*, mais seulement ceux dont la structure permet l'oxydation en orthodiphénol. En outre, leur action ne se manifeste qu'en présence d'une trace de diphénol et après un certain temps d'incubation. D'autre part, nos résultats indiquent que *Coccus P* doit posséder un système enzymatique catalysant l'oxydation des phénols. Ce qu'on connaît sur le fonctionnement des phénoloxydases³ permet de conclure que l'action sur la croissance observée avec les monophénols est due aux diphénols dont ils sont les précurseurs. Ceci explique le comportement de la tyrosine qui provoque la croissance de *Coccus PS* et *PSP* en tant que précurseur de dopa. Ces bactéries, bien qu'elles soient capables de synthétiser la tyrosine, ne se développent pas en l'absence d'une source extérieure de diphénol. Donc la tyrosine endogène ne constitue pas une telle source: à l'intérieur des cellules cet acide aminé est tout de suite incorporé dans les protéines ou protégé d'une autre façon contre l'oxydation. Au contraire la tyrosine exogène assure la croissance et de façon plus constante même que le catéchol: elle constitue en effet une réserve de diphénol en puissance, moins soumise que le catéchol à une oxydation destructive.

La concentration nécessaire de diphénol est très faible: de l'ordre de $10^{-7} M$ pour le catéchol et même de $10^{-8} M$ pour certains dérivés de substitution en *para*. Leur action paraît être un phénomène de tout ou rien. Nous n'avons pu établir une relation constante entre le rendement total de la culture et la concentration de catéchol. Avec du catéchol à $10^{-7} M$, le taux de croissance moyen est toujours plus faible qu'avec une concentration plus grande, mais une fois la croissance déclenchée, la culture finit toujours par atteindre son niveau maximum. Il est possible qu'à la suite de la

lyse d'une certaine proportion de cellules, la tyrosine endogène devienne source de diphénol. D'autre part, au cours de la croissance le catéchol s'oxyde et il est difficile de décider si la limite en catéchol est due à son utilisation par les cellules ou à sa destruction par oxydation. Finalement parmi les métabolites pouvant dériver de l'ouverture du noyau benzénique, nous avons constaté que ni l'acide cis-cis-muconique, ni l'acide β -cétoadipique^{4 5} (20 $\mu\text{g/ml}$) n'éliminent l'exigence en diphénol. On doit conclure que la structure *orthodiphénol* se comporte comme un facteur de croissance pour les variants *PS* et *PSP* de *Coccus P.* Ce cas n'est pas unique et une exigence analogue en catéchol a été déjà signalée⁶ dans le cas de mutants de *E. coli*. La possibilité de remplacer le catéchol par un sel minéral de fer observée pour *E. coli*, ne semble pas exister pour *Coccus P* puisque nous n'avons pas obtenu de croissance même en présence de Fe^{++} à 10^{-3} *M*. D'autre part, aucune des conditions métaboliques que nous avons étudiées ne nous a fourni jusqu'à présent une indication quelconque sur le mode d'action des *orthodiphénols*.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Dr. B. D. DAVIS (Dept. Pharmacology, New York University) et Dr. R. STANIER (Dept. Microbiology, Berkeley) qui nous ont donné certains des produits utilisés dans ce travail.

RÉSUMÉ

Nous avons isolé deux variants de *Coccus P* (*Sarcina* sp.) capables d'être cultivés en milieu synthétique. La croissance de ces deux variants n'est possible qu'en présence de catéchol ou d'un *orthodiphénol* substitué ou d'une *orthoquinone*. La tyrosine et les monophénols dont une des positions *ortho* est libre, ont la même action, en tant que précurseurs des *orthodiphénols*. La concentration d'*orthodiphénol* nécessaire à la croissance est de l'ordre de 10^{-7} *M*.

SUMMARY

The authors have isolated two variants of *Coccus P* (*Sarcina* sp.) which can be cultivated on synthetic media. Both variants grow only in the presence of catechol or a substituted *orthodiphenol* or an *orthoquinone*. Tyrosine and monophenols with one free *ortho* position act as precursors of the *ortho-diphenols* and as such support growth. The *ortho-diphenol* concentration required for growth is of an order of magnitude of 10^{-7} *M*.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir haben zwei Varianten von *Coccus P* (*Sarcina* sp.) isoliert, welche man auf synthetischem Medium züchten kann. Das Wachstum dieser beiden Varianten ist nur in Gegenwart von Katechin oder eines substituierten *orthoDiphenols* oder eines *orthochinons* möglich. Tyrosin und Monophenole mit einer unbesetzten *orthoPosition* üben in ihrer Eigenschaft als Vorgänger der *orthoDiphenole* dieselbe Wirkung aus. Die für das Wachstum notwendige *orthoDiphenolkonzentration* ist in der Grössenordnung von 10^{-7} *M*.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BEUMER, *Acta biol. Belg.*, 2 (1941) 273.
- ² L. GORINI ET G. LANZAVECCHIA, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 399.
- ³ J. M. NELSON ET C. R. DAWSON, *Advances in Enzymol.*, 4 (1944) 99.
- ⁴ W. C. EVANS ET B. S. W. SMITH, *Biochem. J.*, 49 (1951) x.
- ⁵ W. R. SISTROM ET R. Y. STANIER, *J. Bact.*, 66 (1953) 404.
- ⁶ B. D. DAVIS, *VIème Congrès Intern. de Microbiol.*, Rome, 1953, Symposium du métabolisme microbien, p. 23.

Reçu le 15 juin 1955