

mit Bariumsulfat verdünnt eingefüllt wurden. Wegen der vertikalen Lage der Probe und zum Schutz vor Feuchtigkeit musste das eingedrückte Pulver mit einem Quarzglasplättchen von 0,5 mm Dicke abgedeckt werden. Als Weißstandard diente ein ebenso mit Bariumsulfat gefüllter gleicher Messingblock.

LITERATURVERZEICHNIS

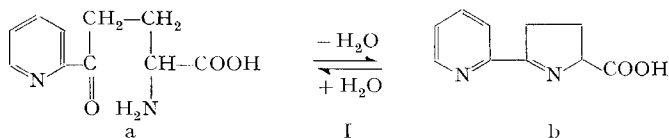
- [1] W. LUDWIG & F. GASSER, *Helv.* 52, 107 (1969).
- [2] C. K. JØRGENSEN, «Electron Transfer Spectra», Kapitel in der Reihe «Technique of Inorganic Chemistry», Band «Chemical Applications of Spectroscopy», herausgegeben von B. G. WYBOURNE, Interscience Publishers (John Wiley), New York 1968.
- [3] H. B. GRAY & C. J. BALLHAUSEN, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 260 (1963); H. B. GRAY, «Electronic Structures of Square Planar Metal Complexes» in «Transition Metal Chemistry», herausgegeben von R. L. CARLIN, Marcel Dekker, Inc., New York 1965.
- [4] C. K. JØRGENSEN, «Halogen and the Noble Gas Complexes», Kapitel in «Halogen Chemistry», herausgegeben von V. GUTMANN, Band 1, Academic Press, London und New York 1967.
- [5] C. K. JØRGENSEN, «Orbitals in Atoms and Molecules», Academic Press, London und New York 1962; «Absorption Spectra and Chemical Bonding in Complexes», Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1962.
- [6] Diss. F. GASSER, Phil. Fakultät II der Universität Zürich (1969).

239. Sur le rôle métabolique de la proferrosamine A produite par *Pseudomonas roseus fluorescens* J. C. MARCHAL 1937¹⁾

par **M. Pouteau-Thouvenot, M. Choussy²⁾, M. Barbier**
Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, F-91 Gif-sur-Yvette
et **M. Viscontini³⁾**
Institut de Chimie Organique de l'Université, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich
(22 VII 69)

Résumé. La biosynthèse de la proferrosamine A produite par *Pseudomonas roseus fluorescens* est inhibée par le tryptophane et cette inhibition est levée par l'acide shikimique. A la suite de l'ensemble des résultats acquis, des hypothèses concernant le rôle métabolique de la proferrosamine A sont formulées et discutées.

Le milieu de culture de *Pseudomonas roseus fluorescens* possède une coloration rouge intense due à la formation d'un complexe, la ferrosamine [2], prenant naissance à partir de Fe²⁺ et d'un acide aminé, la proferrosamine A, pour lequel la structure chimique I (a et b) a été proposée [3] [4].

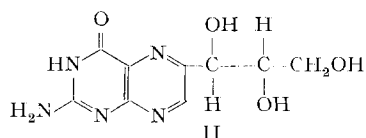


¹⁾ Anciennement décrit comme *Bacillus roseus fluorescens*, ce microorganisme a été identifié comme étant un *Pseudomonas* et doit être désigné comme tel (communication privée du Professeur MARCHAL, Université de Nancy, France).

²⁾ Extrait de la thèse de doctorat de 3^e cycle de Mlle M. CHOUSSY, Paris 1969.

³⁾ Produits naturels chez les microorganismes, 4^e communication [1].

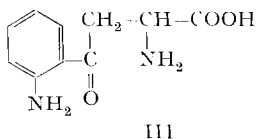
L'acide-amino I est identique à la pyrimidine isolée par SHIMAN & NEILANDS d'une souche de *Pseudomonas* GH [5]; de même, la ferropyrimine de ces auteurs est identique à la ferrosamine de POUTEAU-THOUVENOT *et al.* [3]. Précisons que la proferrosamine (I) est formée en grande quantité dans les cultures de *Ps. roseus fluorescens* en milieux synthétiques dépourvus de fer, que dans ces conditions la production de coproporphyrine III est également exaltée, que *Ps. roseus fluorescens* synthétise un nombre considérable de ptérines et lumazines et que la monaptérine (II) a été isolée pour la première fois comme substance naturelle à partir de cette bactérie [6].



Le comportement extrêmement particulier de *Ps. roseus fluorescens*, la facilité avec laquelle on peut le cultiver en milieu synthétique, la nouveauté de certains de ses métabolites, nous ont donc incités à entreprendre une étude détaillée de son métabolisme et dans ce mémoire nous présentons les premiers résultats obtenus en laboratoire.

Des études préliminaires de POUTEAU-THOUVENOT et MARCHAL [7] avaient déjà montré l'influence du fer sur la production du propigment I et sur la consommation en oxygène du microorganisme. Dans le présent travail nous avons d'abord précisé la relation existant entre la production de proferrosamine et la concentration en ions ferreux. Cette production diminue fortement lorsque la concentration en Fe^{2+} s'accroît. Une production maximum est observée avec des milieux appauvris en fer par traitement avec l'hydroxy-8-quinoléine ($1 \mu\text{g}$ de Fe^{2+} par litre de milieu de culture). Dans ces conditions la croissance bactérienne est lente, mais positive; cette croissance est multipliée par 20 lorsque la teneur en fer augmente de 1 à $1000 \mu\text{g}$ par litre. Comme par ailleurs nous n'avons jamais réussi à isoler des quantités pondérables de proferrosamine A à partir des corps bactériens, il faut admettre que cet acide-amino est rejeté par la cellule dans le milieu de culture, aussitôt effectuée sa biosynthèse.

Si l'on considère la forme ouverte Ia de la proferrosamine on ne manque pas d'être frappé par le fait que sa formule élémentaire $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ est identique à celle de la cynurénine (III), elle-même dérivée du tryptophane, et qu'une certaine parenté rapproche ces deux structures. Deux hypothèses viennent alors à l'esprit:



1) La biosynthèse du tryptophane et de la proferrosamine a lieu selon une chaîne enzymatique commune qu'il faut mettre en évidence, et dans cette chaîne Fe^{2+} joue un rôle important.

2) Le tryptophane étant oxydé *in vitro* — et vraisemblablement *in vivo* — en cynurénine, sous l'action catalytique des tétrahydroptérines et des ions ferreux, il est possible qu'une des ptérines isolées à partir de *Ps. roseus fluorescens*, et plus parti-

culièrement la monaptérine, joue un rôle coenzymatique dans la chaîne précédente. Cette hypothèse semble corroborée par le fait que la tétrahydromonaptérine pourrait fonctionner comme enzyme d'hydroxylation chez *Pseudomonas* ATCC 11299a [8].

Les expériences entreprises en vue de vérifier ces deux hypothèses ont conduit aux résultats suivants:

1) La concentration en fer dont l'influence est si nette sur la formation des corps bactériens en général, de la proferrosamine et de la coproporphyrine III en particulier, ne semble pas influencer la synthèse de la monaptérine. Nous avons simplement noté que pour des cultures jeunes, des concentrations élevées en Fe^{2+} (supérieures à 5 mg/l) favorisent la biosynthèse de la monaptérine (tableau I).

2) Une suspension bactérienne (resting cells), un extrait bactérien obtenu par broyage ou une poudre acétonique de *Ps. roseus fluorescens* ne transforment pas le tryptophane en proferrosamine.

Tableau I. *Formation de monaptérine et de proferrosamine A chez les jeunes cultures de Ps. roseus fluorescens en fonction de la concentration en Fe^{2+} dans le milieu de culture*

Concentration en Fe^{2+} (mg/l)	Densité optique bactérienne (550 nm)	Monaptérine (fluorescence en centièmes du standard)	Fluorescence rapportée à l'unité de densité bact.	Densité optique de proferrosamine (556 nm)	Densité rapportée à l'unité de densité bactérienne
Cultures âgées de 3 jours					
0	0,021	1,2	57	0,41	20
0,1	0,33	17,5	53	1,30	3,9
1	0,35	19	54	1	2,8
5	0,41	24	60	0,91	2,2
10	0,37	42	113	0,64	1,7
Cultures âgées de 4 jours					
0	0,032	2,90	90	0,23	7,6
0,1	0,48	33	68	1,58	3,2
1	0,80	74	92	1,40	1,7
5	0,68	76	111	1,34	1,9
10	0,62	88	141	0,79	1,2

Tableau II. *Inhibition de la formation de la proferrosamine A par le tryptophane*

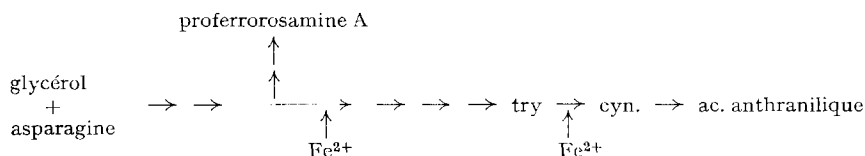
Composition du milieu de LASSEUR L ₁ en g/l												
Asparagine	2	0	0	0	7,2	5,4	5,4	3,6	3,6	1,8	1,8	0
Tryptophane	0	2	10,1	4	0	2,5	0	5	0	7,5	0	11
[Asp]/[Tyr]		0	0	0		3		1		$\frac{1}{3}$		0
Glycérol	0	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Proferrosamine A	+++	0	0	0	+++	++	+++	\pm	+++	0	+++	0
Acide anthranilique	0	0	0	0	+	++	+	+++	+	+++	+	+++

+++ concentration maximum en produit formé; ++ concentration moyenne; + concentration faible; \pm traces; 0 absence totale

3) Ajouté en proportions croissantes au milieu de culture synthétique contenant de l'asparagine comme source azotée, le tryptophane inhibe la biosynthèse de la proferrosamine A. Cette inhibition est totale pour un rapport tryptophane/asparagine égal ou supérieur à l'unité (tableau II). Signalons que l'influence de divers amino-acides et autres substances sur la production de pigment par *Ps. roseus fluorescens* a déjà été mentionnée par MARCHAL *et al.* [9]. Une inhibition a été notée avec la xanthine et la guanine; à notre connaissance le tryptophane n'a pas été essayé.

4) Lorsque le tryptophane est utilisé comme seule source azotée organique en présence ou en absence de fer, les cultures obtenues sont dépourvues de proferrosamine A; en présence de fer il se forme des quantités importantes d'acide anthranilique et de cynurénine que nous avons isolés et identifiés.

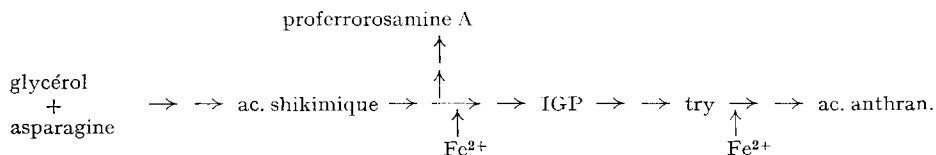
A la suite des ces résultats, l'on peut admettre en première approximation que l'effet du tryptophane est régulateur et que l'action du fer porte sur un précurseur commun à cet amino-acide et à la proferrosamine A selon le schéma suivant:



Dans l'affirmative, l'introduction d'un des précurseurs du tryptophane situé avant l'action du fer dans la chaîne enzymatique devrait lever cette inhibition. Les essais effectués utilisant l'indole et la sérine ou l'acide anthranilique comme précurseurs ont donné les résultats suivants:

Indole: pas de croissance (essais jusqu'à un minimum de 20 mg/l); acide anthranilique: croissance jusqu'à un maximum de 5 mg/l, sans formation de proferrosamine; indole-glycérophosphate (IGP): croissance normale avec des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l, sans formation de proferrosamine.

Par contre l'introduction d'acide shikimique lève l'inhibition due au tryptophane soit dans les cultures où le tryptophane est la seule source d'azote, soit dans des milieux contenant tryptophane plus asparagine; cette levée de l'inhibition atteint environ 30% par rapport aux témoins (voir tableau III). A la suite de ce résultat, nous pouvons compléter le schéma précédent de la manière suivante.



Bien entendu, ce schéma n'est pas le seul imaginable, et nous le proposons simplement comme hypothèse de travail. On peut tout aussi bien supposer que la proferrosamine agit comme cofacteur coordonnant Fe^{2+} nécessaire à la biosynthèse du tryptophane chez *Ps. roseus fluorescens*. La pénurie de Fe^{2+} produirait alors un accroissement de la biosynthèse de la proferrosamine, et l'excès de tryptophane, l'inhibition de cette biosynthèse.

Les expériences en cours permettront, nous l'espérons, de préciser ces hypothèses.

Tableau III. Réversion de l'action du tryptophane sur la formation de proferrerosamine A par l'acide shikimique

Composition du milieu de LASSEUR L ₁ en g/l							
Asparagine	0	0	0	1,8	1,8		
Tryptophane	10	10	10	7,5	7,5		
Acide shikimique	0	0,8	0,5	0	0,5		
Croissance bactérienne	+	++	++	+++	+++		
Proferrerosamine A							
formée en 5 jours	0	0	0	0	0		
formée en 8 jours	0	0	0	0	+		
formée en 15 jours	0	0	0	0	++		
formée en 20 jours	0	+	+	0	++		
Coloration des cultures							
Composition du milieu en g/l	rose vif	jaune pâle	jaune pâle	légèrement rosée	rose	rose	rose
Asparagine	9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Tryptophane	0	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Acide shikimique	0	0	0,04 · 10 ⁻³	0,6 · 10 ⁻³	1 · 10 ⁻³	0,1	0,5
Densité optique à $\lambda = 556$ nm	0,92	0,17	0,16	0,19	0,28	0,32	0,27

Nous remercions le Professeur J. G. MARCHAL, Université de Nancy, du *Pseudomonas* qu'il a bien voulu nous confier, le Docteur J. R. TURNER, Richmond USA, d'un échantillon d'IGP, et le Professeur E. LEDERER, Gif-sur-Yvette, de l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Partie expérimentale

1. *Propriétés générales du bacille.* – *Ps. roseus fluorescens* est un bacille mobile de 0,9 à 1,9 μ de longueur et de 0,6 μ de largeur; il est très résistant et ne produit pas de spores; il est GRAM négatif et se colore par les colorants usuels.

Pendant les cultures, on observe les phénomènes suivants: dès le deuxième jour, il y a apparition d'une vive fluorescence bleu-vert à la surface des cultures; dans les milieux renfermant du fer, le pigment rouge se forme et devient visible à partir du 4^e ou 5^e jour dans la partie inférieure des cultures, et gagne ensuite toute la masse. Les milieux privés de fer ne sont pas colorés en rouge.

Milieux de culture. – a) *Milieu de LASSEUR L₁*: pour 100 ml d'eau distillée: asparagine: 0,9 g; glycérol: 2,5 g; phosphate dipotassique: 0,25 g; sulfate de magnésium · 7 aq.: 0,5 g; chlorure de calcium: 0,04 g; sulfate ferreux · 7 aq.: 0,01 g. On dissout les sels de Ca, de Fe et de Mg à part dans beaucoup d'eau afin d'éviter la formation des phosphates insolubles. Le pH final est ajusté à 6,7 par HCl (environ 1 ml 0,1N HCl).

b) Pour l'étude du rôle des divers amino-acides, nous avons utilisé le milieu L₁ en remplaçant l'asparagine totalement ou en partie par l'acide-amino choisi et en conservant la proportion d'environ 6 · 10³ μ moles par 100 ml de milieu.

c) *Milieu appauvri en fer.* Nous avons utilisé la technique de WARING & WERKMAN [10]. On prépare un milieu L₁ avec asparagine, glycérol et phosphate seulement. A 150 ml de la solution, on ajoute 5 mg d'hydroxy-8-quinoléine dans 1 ml de chloroforme bidistillé et on agite vigoureusement; on ajoute encore 3 ml de chloroforme et continue l'agitation; la couche chloroformique contient l'oxine et ses complexes colorés (en noir avec Fe²⁺, vert avec Fe³⁺, etc.). On doit poursuivre les lavages par le chloroforme jusqu'à ce qu'il soit totalement incolore. L'efficacité de la méthode est contrôlée par la technique de STOUT & AMON [11] (colorimétrie par le dithizone) ou celle de PAPENHEIMER & SHASKAN [12] ($\alpha\alpha'$ -dipyridyle; sensibilité limite: environ 1 μ g de métal par litre). Le traitement à l'oxine conduit à des milieux contenant de 0,7 à 3 μ g de fer par litre (valeur détec-

minée après l'addition des autres sels minéraux de Mg et Ca). Toute la verrerie utilisée (Pyrex) est lavée plusieurs fois à l'eau régale et l'eau bidistillée. Les milieux de culture sont stérilisés en autoclave humide (20 min. à 115°).

Conditions de cultures. Les cultures sont effectuées en étuve à 25°. Suivant les essais, elles sont réalisées soit en boîtes de ROUX (200 ml de milieu), soit en erlenmeyers de 50 ml contenant 20 ml de milieu, soit encore en tubes contenant de 5 à 7 ml de milieu. Lorsque des conditions standard d'ensemencement sont nécessaires, on prépare une pré-culture et ensemence avec 0,1 ml de cette culture homogénéisée.

2. *Techniques de dosages.* — a) *Densité bactérienne.* La culture est centrifugée 30 min à 4000 t/min et le culot est repris par environ 15 fois son volume d'eau distillée. On centrifuge de nouveau; les cellules sont remises en suspension dans un volume déterminé d'une solution de 4,7 g de citrate diammonique dans 300 ml d'acide acétique à 3,3% afin de redissoudre les phosphates ayant pu précipiter et se trouver avec les corps bactériens. L'ensemble est soigneusement homogénéisé et les lectures sont faites au spectrophotomètre de JOBIN & YVON en transmission à 550 nm.

b) *Dosage de la proferrosamine.* On sépare les corps bactériens par centrifugation et ajuste les solutions surnageantes à des volumes appropriés. On ajoute 4 à 5 gouttes d'une solution saturée de sulfate de fer (II) (si les cultures ont été obtenues avec milieu sans fer). L'intensité de la coloration rouge est déterminée par lecture à 556 nm.

c) *Isolement de la monaptérine pour les dosages.* Les cultures sont centrifugées, et le surnageant, réduit à quelques ml par concentration sous vide. On isole la monaptérine par chromatographies préparatives sur papier dans les systèmes suivants: isoPr-MeOH-H₂O (2:1:1); H₂O; isoPr-NH₄OH 1% (2:1). Nous indiquons ci-dessous les Rf de la monaptérine observés dans divers solvants:

NH ₄ Cl	0,68	BuOH-AcOH-H ₂ O (20:3:7)	0,08
Pr-AcONH ₄ 2% (1:1)	0,66	H ₂ O	0,65
isoPr-NH ₄ OH 1% (2:1)	0,62	isoPr-MeOH-H ₂ O (2:1:1)	0,21

d) *Dosage des substances fluorescentes.* Les mesures sont faites par fluorimétrie sur les substances isolées et purifiées par chromatographie sur papier. La lumière excitatrice a une longueur d'onde de 360 nm pour la monaptérine et de 348 nm pour l'acide anthranilique (les filtres correspondants, étant utilisés dans l'appareil de JOBIN & YVON). Pour la monaptérine, l'appareil est réglé de telle sorte qu'une solution de monaptérine synthétique à la concentration de 17,15 µg/100 ml donne 20% de lumière transmise à 360 nm.

e) *Identification de l'acide anthranilique et de la cynurénine dans les cultures avec fer et tryptophane.* Le milieu de culture est acidifié à pH 3 puis extrait plusieurs fois par l'éther. La chromatographie sur papier montre l'apparition de deux substances fluorescentes, l'une dans l'extrait éthéré et l'autre restant dans la partie aqueuse. La première (fluorescence violette) a été identifiée à l'acide anthranilique; et la seconde (fluorescence bleu-vert), à la cynurénine. Les identifications reposent sur la comparaison des propriétés des produits, isolés par chromatographies préparatives, avec celles d'échantillons authentiques (Rf, spectres UV. et IR., et pour la cynurénine spectres de masse).

3. *Techniques des essais enzymatiques.* — a) *Suspensions bactériennes* (technique dite des «resting cells»). Les bactéries sont prélevées dans des cultures en phase exponentielle (3 à 4 jours d'âge) centrifugées, lavées à l'eau physiologique (NaCl à 8%). Le culot est pesé («wet cells») et remis en suspension dans un tampon aux phosphates M/15, pH 7.

b) *Poudre acétonique.* Les bactéries centrifugées sont remises en suspension dans le minimum d'eau physiologique et versées lentement dans dix fois le volume d'acétone à -20° (sous agitation vigoureuse). La suspension est filtrée sur BÜCHNER, lavée aussitôt par 5 volumes d'acétone à -20°, puis 3 volumes d'éther à -20°C et séchée en dessiccateur sous vide.

c) *Extrait bactérien préparé par broyage avec de la poudre d'alumine* [13]. Les bactéries séparées par centrifugation et lavées à l'eau physiologique sont pesées et mélangées à 3 fois leur poids humide d'alumine (lavée à l'eau distillée et séchée à 100°). Le mélange est malaxé en mortier à 0° pendant une dizaine de minutes. La masse, friable au début, devient progressivement visqueuse. On ajoute à 0° un tampon aux phosphates M/50, pH 7 (5 ml par g de corps bactériens en poids humide). On centrifuge 20 min à 4000 t/min et à 0°. Le surnageant est jaune limpide et constitue l'extrait bactérien.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] 3^e Communication: M. VISCONTINI & M. FRATER-SCHROEDER, *Helv.* **51**, 1554 (1968).
- [2] J. G. MARCHAL, *Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy* **10**, 90 (1937); J. G. MARCHAL & R. A. ADAMS, *ibid.* **18**, 32 (1956); M. POUTEAU-THOUVENOT & M. BOUSSARD, *Bull. Assoc. Dipl. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy* **69**, 29 (1957); M. POUTEAU-THOUVENOT, *Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy* **19**, 1 (1959).
- [3] M. POUTEAU-THOUVENOT, A. GAUDEMER & M. BARBIER, *Bull. Soc. Chim. biol.* **47**, 2085 (1965).
- [4] M. POUTEAU-THOUVENOT & M. BARBIER, *Bull. Soc. chim. France* **1965**, 3238; M. POUTEAU-THOUVENOT, A. GAUDEMER & M. BARBIER, *Bull. Soc. Chim. biol.* **50**, 222 (1968).
- [5] R. SHIMAN & J. B. NEILANDS, *Biochemistry* **4**, 2233 (1965).
- [6] M. VISCONTINI, M. POUTEAU-THOUVENOT, R. BÜHLER-MOOR & M. SCHROEDER, *Helv.* **47**, 1948 (1964); M. VISCONTINI & R. BÜHLER-MOOR, *Helv.* **51**, 1548 (1968).
- [7] M. POUTEAU-THOUVENOT, *Bull. Assoc. Dipl.-Microbiol. Fac. Pharm. Nancy* **64**, 24 (1956); J. G. MARCHAL & M. POUTEAU-THOUVENOT, *Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy* **18**, 92 (1956).
- [8] G. GUROFF & C. A. RHODES, *J. biol. Chemistry* **244**, 142 (1969).
- [9] J. G. MARCHAL & A. DUPAIX-LASSEUR, *Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy* **16**, 24 (1948).
- [10] W. S. WARING & C. H. WERKMAN, *Arch. Biochemistry* **1**, 425 (1943).
- [11] P. R. STOUT & D. I. AMON, *Amer. J. Botan.* **26**, 144 (1939).
- [12] A. M. PAPPENHEIMER, *J. biol. Chemistry* **167**, 251 (1947).
- [13] H. MCILWAIN, *J. gen. Microbiol.* **2**, 288 (1948).

240. Differences between Organic Chemistry of Silicon and some other Group IV Elements

by Václav Chvalovský and Vladimír Bažant¹⁾

Institute of Chemical Process Fundamentals,
Czechoslovak Academy of Sciences, Prague – Suchbát

(30. V. 69)

The difference in physical and chemical properties of the first three members of the group IVb are mostly accounted for by the structure of the valence shell of the respective elements. The common feature of all three elements to be discussed is sp^3 hybridisation in organic compounds. Differences between carbon chemistry and the chemistry of silicon [1] and germanium are determined by

- 1) the availability of vacant d -orbitals in the valence shell,
- 2) electronegativity, where the most pronounced difference is between carbon and silicon (according to the PAULING scale 2.5 for C and about 1.8 for Si and Ge),
- 3) the covalent radius of the elements discussed – the only pronounced difference is between carbon (0.77 Å) and silicon (1.17 Å), whereas the covalent radius of germanium differs only slightly (1.22 Å) from that of silicon. This is connected with the differences in polarizability, which increases with increasing covalent radius.

How these three effects determine the properties of the corresponding organic compounds can be illustrated by typical examples.

¹⁾ Eingeladener Vortrag, gehalten von Prof. V. BAŽANT an der Wintersitzung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft, Neuchâtel, 22. Februar 1969, veröffentlicht gemäss besonderem Beschluss des Redaktionskomitees.