

O-Déméthylation et métabolisme du groupe méthoxyle de l'acide vanillique, monomère modèle de la lignine, par la bactérie du rumen *Syntrophococcus sucromutans*

J Doré¹, MP Bryant²

¹ Laboratoire de Microbiologie, INRA, Theix, 63122 Ceyrat, France;

² University of Illinois at Urbana-Champaign, Dept of Animal Sciences, Urbana, IL 61801, USA

Summary — *The O-demethylation of a lignin monomer by washed cells of the rumen bacterium S sucromutans was studied using chemically synthesized O-[methyl-¹⁴C]vanillate. During cometabolism of pyruvate and vanillate, the label from the methoxyl group was incorporated into acetate, the sole product, which was singly labeled in the methyl group.*

Introduction — *S sucromutans* (10⁷ cellules/ml de liquide ruminal sur un animal nourri de foin) représente l'espèce prédominante capable d'assurer une des premières étapes de la dégradation des monomères aromatiques dérivés de la lignine : la O-déméthylation. L'étude de la culture pure sur des milieux non définis a suggéré par ailleurs un métabolisme original caractérisé par l'exigence d'un système accepteur d'électrons pour permettre la dégradation des mono- et disaccharides (Krumholz et Bryant, 1986). La O-déméthylation interviendrait comme système accepteur d'électrons. Les monomères aromatiques ne sont pas dégradés plus avant et l'acétate et le CO₂ sont dans ce cas les seuls produits du métabolisme. Le développement récent de conditions de culture mieux définies (Doré et Bryant, 1989) et l'utilisation de suspensions cellulaires non proliférantes ont permis d'étudier plus en détail la O-déméthylation. L'acide vanillique (acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque) marqué spécifiquement dans le groupe méthoxyle (O-CH₃) a été utilisé pour cette étude.

Matériel et Méthodes — Deux expériences ont été réalisées. Dans la première, le métabolisme du vanillate radioactif (25 µmol) a été étudié dans les conditions suivantes : seul ou associé avec le pyruvate (50 µmol) soit sous une atmosphère d'azote pur, soit en présence de bicarbonate (50 µmol) sous une atmosphère de N₂/CO₂ (4:1). Dans la seconde expérience, du pyruvate radioactif dans le groupement carboxyle a été utilisé avec du vanillate froid, dans un milieu contenant du bicarbonate sous atmosphère de N₂/CO₂ (4:1). Les incubations ont été conduites à 39°C, à l'obscurité dans des flacons de Balch de 12 ml contenant 4,5 ml de milieu réactionnel répartis sous un flux de gaz stérile anaérobie. Les suspensions cellulaires de *S sucromutans* ont été obtenues après culture des bactéries sur 3 l de milieu contenant du cellobiose (10 mM) et de la vanilline (5 mM). Les cellules bactériennes ont été collectées en début de phase stationnaire, par centrifugation (10 000 x g, 10 min, 20°C) et remises en suspension du culot dans 20 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 6,8) contenant de la cystéine (5 mM). L'addition de 0,5 ml de suspension cellulaire était réalisée après équilibre à 39°C, 20 min. L'acide vanillique marqué spécifiquement dans le groupe méthoxyle selon Haider et Lijn (1965) a été synthétisé par voie chimique. Son activité spécifique était de 217 000 dpm/µmol. Les acides organiques ont

été analysés par HPLC après 1 et 3 h d'incubation. Le marquage a été suivi dans le CO_2 et dans les carbones de l'acétate, qui était dégradé par la méthode de Phares, selon Abraham et Hassid (1957), après purification par chromatographie d'échange isoionique suivant la méthode de Diekert *et al* (1984).

Résultats et Discussion — La *O*-déméthylation du vanillate en protocatéchuate après 3 h d'incubation passe de 33% en l'absence de bicarbonate et de pyruvate à 72 et 79% en présence de bicarbonate et de pyruvate, respectivement. La présence simultanée de ces deux composés accroît la dégradation à 87%. La *O*-déméthylation du vanillate radioactif conduit à la production d'acétate exclusivement marqué dans le groupe méthyle (96%) et d'activité spécifique environ 7 fois inférieure à celle du substrat. Pas de $^{14}\text{CO}_2$ n'apparaît. Le marquage issu du groupe carboxyle du pyruvate s'échange rapidement avec le CO_2 et, dans l'acétate produit, il se retrouve principalement dans le groupe carboxyle (84%).

En conclusion, ces résultats ainsi que la cinétique de réaction indiquée par la figure 1 et l'activité spécifique de l'acétate produit après 3 h d'incubation indiquent une synthèse complète de l'acétate à partir du groupe carboxyle du pyruvate et du méthoxyle du vanillate. Si le rôle du composé méthoxyaromatique comme accepteur d'électrons reste encore à clarifier, les résultats présentés indiquent un métabolisme de type homoacétogène. Bien que la bactérie ne puisse utiliser H_2 et CO_2

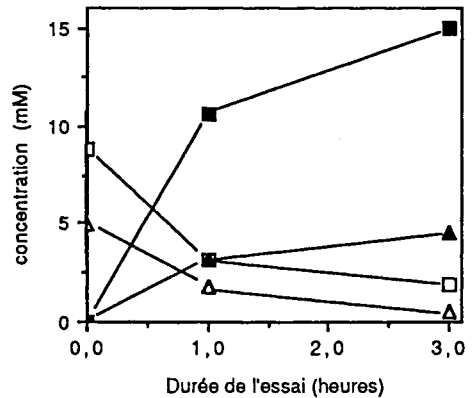


Fig 1. Catabolisme du vanillate en présence de pyruvate et de bicarbonate sous N_2/CO_2 (4:1) par des suspensions cellulaires de *S. succromutans* (■ acétate; □ pyruvate; Δ vanillate; ▲ protocatéchuate).

comme seules sources de carbone et d'énergie, il est concevable que *S. succromutans* transfère le carbone du groupe méthoxyle *via* le méthyletétrahydrofolate ou un corrinnoïde, pour la synthèse de l'acétate par la voie de l'acétyl-CoA.

- Abraham S, Hassid WZ (1957) *Methods Enzymol* 4, 489-560
 Diekert G, Hansch M, Conrad R (1984) *Arch Microbiol* 138, 224-228
 Doré J, Bryant MP (1989) *Appl Environ Microbiol* 55, 927-933
 Haider K, Lim S (1965) *J Labelled Compd* 1, 294-299
 Krumholz LR, Bryant MP (1986) *Arch Microbiol* 143, 313-318