

139. Les strépogénines de *Lactobacillus casei*

I. Leur isolement et leur identification

par Pierre Baudet et Emile Cherbuliez

(8 II 61)

Sur un milieu tel que celui de LANDY-DICKEN¹⁾, le *Lactobacillus casei* ATCC 7469 ne pousse que lentement, mais lorsqu'on y ajoute encore certains peptides originaires d'hydrolysats partiels de protéines, p. ex. d'insuline²⁾ ou de caséine³⁾, on constate un développement très rapide. Les peptides qui agissent comme facteur de croissance, et dont divers sont maintenant bien connus²⁻⁴⁾, ont été appelés strépogénines par WOOLLEY⁵⁾, qui les a découverts.

Or, dans le cas d'une incubation prolongée, le *Lactobacillus casei* ATCC 7469 finit par se développer en absence de peptides exogènes. On pouvait penser que ce micro-organisme produisait peu à peu lui-même des peptides de nature strépogénique, indispensables à sa complète croissance dans le milieu utilisé. Si cela était, les strépogénines exogènes auraient pour effet de stimuler le développement jusqu'au moment où la concentration endocellulaire des strépogénines natives deviendrait suffisamment élevée pour permettre une pleine croissance.

Pour vérifier la formation éventuelle de strépogénines par *Lactobacillus casei* ATCC 7469, nous avons mesuré l'activité strépogénique, d'un côté d'un milieu de culture dans lequel ce microorganisme avait poussé, milieu débarrassé des cellules bactériennes, et de l'autre, d'un extrait obtenu à partir de cellules bactériennes débarrassées du milieu. Le milieu de culture utilisé se compose d'un hydrolysate intégral de caséine et d'un certain nombre de substances organiques et minérales pures; il permet de ce fait une bonne interprétation des résultats obtenus avec des produits ajoutés.

Rappelons que l'activité strépogénique est établie à l'aide de ce même *Lactobacillus casei* et dans le milieu nutritif LANDY-DICKEN¹⁾. La turbidité du milieu (devant contenir 0,05 à 0,300 mg de cellules bactériennes par ml) à la fin de l'incubation (20 à 24 h) est déterminée au néphélomètre. Le standard d'activité strépogénique est constitué par la fraction de foie L de WILSON⁷⁾, dont 1 mg représente l'unité; elle assure la demi-croissance en 20 à 24 h dans des conditions standardisées.

L'arrêt de l'incubation est effectué au moment correspondant à la demi-croissance (0,15 mg de cellules bactériennes par ml) de façon qu'on puisse recueillir des cellules encore jeunes. Jusqu'à présent, tous les peptides strépogéniques isolés^{2) 3) 4)} ou synthétisés⁶⁾ se sont révélés comme thermostables; nous avons donc admis a priori que

¹⁾ M. LANDY & D. M. DICKEN, J. Lab. and clin. Med. 27, 1086 (1942).

²⁾ R. B. MERRYFIELD & D. W. WOOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 78, 358 (1956).

³⁾ P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, Helv. 43, 904 (1960).

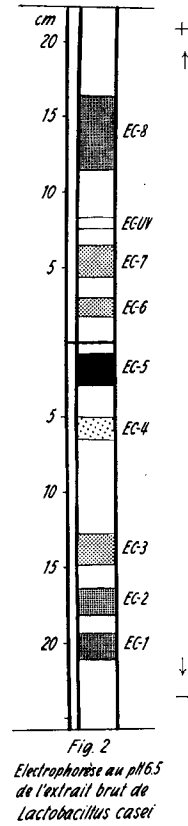
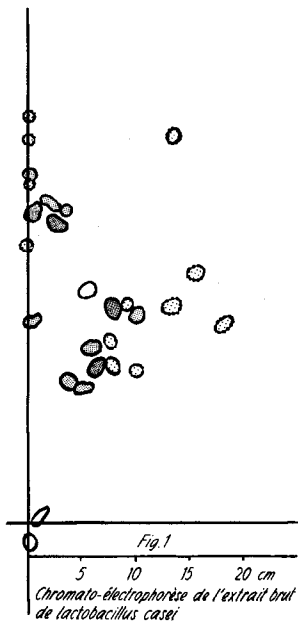
⁴⁾ P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, Helv. 43, 1795 (1960).

⁵⁾ D. W. WOOLLEY, J. Bacteriol. 39, 287 (1940).

⁶⁾ R. B. MERRYFIELD & D. W. WOOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 80, 6635 (1958).

⁷⁾ P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, non publié.

les peptides strépopogéniques recherchés tant dans le lieu de culture que dans les corps bactériens le seraient aussi. Voilà pourquoi nous avons réalisé l'arrêt de la culture par autoclavage à 115° durant 15 min. L'autoclavage, en même temps qu'il permet l'extraction des produits endocellulaires, a l'avantage d'empêcher une altération enzymatique secondaire des peptides puisqu'il inactive les systèmes enzymatiques endo- et exocellulaires. Nous ne constatons pas d'activité strépopogénique notable dans le



milieu de culture débarrassé du lactobacille par centrifugation à 44000 g. Par contre, l'extrait aqueux obtenu par autoclavage d'une suspension aqueuse de cellules bactériennes préalablement lavées au NaCl 0,9% possède une activité strépopogénique de l'ordre de 2 unités WOOLLEY par mg. En répétant l'extraction sur plusieurs lots de corps bactériens provenant de cultures différentes, nous avons toujours obtenu des activités très semblables, à la condition de travailler rapidement à partir du moment où l'on isole les germes et les lave jusqu'à celui où on les autoclave.

L'extrait bactérien lyophilisé se présente comme une poudre jaune, hygroscopique, contenant en moyenne 4,38% d'azote (KJELDAHL) et 0,14 à 0,17% d'eau (détermination selon K. FISCHER). L'activité strépopogénique de ce lyophilisat se maintient inaltérée en tous cas plusieurs mois si on le conserve à l'abri de l'humidité. Il représente 15 à 17% du poids des cellules bactériennes pesées après lavage et lyophilisation.

L'extrait contient au moins 24 fractions ninhydrine-positives, ainsi que le montre le chromatophérogramme de la fig. 1 (dans toutes les fig. les contours des taches ont été décalqués sur les feuilles originales des chromatogrammes). Ces fractions sont constituées en partie par des acides aminés et en partie par des peptides, car leur traitement *in situ* sur le chromatogramme par la leucine-aminopeptidase⁷⁾ aboutit pour certaines taches à la formation de nouveaux acides aminés. Il est intéressant de signaler que sur ce chromatophérogramme, les leucine, valine, sérine, glycine et phénylalanine sont présents en très petites quantités, que la teneur en proline est faible et qu'à l'emplacement de l'alanine se trouve une tache très prononcée. Deux autres fractions, qui ne réagissent pas à la ninhydrine, sont révélées sur le chromatophérogramme par leur fluorescence jaune en lumière ultraviolette; ce sont les sous-fractions d'une bande séparée par électrophorèse à pH 6,5 de l'extrait brut, bande qui est rendue visible par sa coloration jaune et sa fluorescence en lumière de Wood⁸⁾ (voir fig. 2).

Pour démontrer qu'il s'agit d'une activité stéréogénique, il fallait prouver qu'elle était due à des peptides. Or, après électrophorèse de l'extrait global à pH 6,5 on retrouve l'activité dans les bandes ou se localisent des peptides. L'activité se rencontre encore après une nouvelle électrophorèse à pH 2 dans des fractions constituées de peptides, qui ont été trouvés purs ou très purifiés.

Tableau I. *Fractions retirées de l'extrait brut, éluées après électrophorèse à 30 volts/cm, de 1 h 30, au pH 6,5*

Quantité d'azote total recouvrable théoriquement: 6,5 mg
Azote retrouvé: 2,99 mg, soit 46%

Fraction	basiques			neutre EC-5	acides			UV.
	EC-1	EC-2	EC-3		EC-6	EC-7	EC-8	
N; en μg	175	216	123	707	230	224	856	460
Activité (unités par mg ^{*)}).	5	6	5	8	8	8	5	—
* mg de poids sec calculé sur la base de 16% d'azote pour EC-1, 2 et 3, et de 13% pour EC-5, 6, 7 et 8.								

Pour préparer les stéréogénines endogènes de *Lactobacillus casei*, il y a avantage à fractionner l'extrait brut par électrophorèse sur papier à 29 volts/cm, à pH 6,5. On obtient ainsi 8 fractions ninhydrine-positives (désignées ici par EC...) et 1 fraction jaune (fraction UV.) caractérisée par sa réaction négative avec la ninhydrine et par sa fluorescence (voir fig. 2). Parmi les fractions actives, EC-5 est neutre, EC-6, EC-7, et EC-8 sont acides, alors que EC-4, EC-3, EC-2 et EC-1 sont basiques. Les activités stéréogéniques et la teneur en azote de ces fractions sont indiquées dans le tableau I.

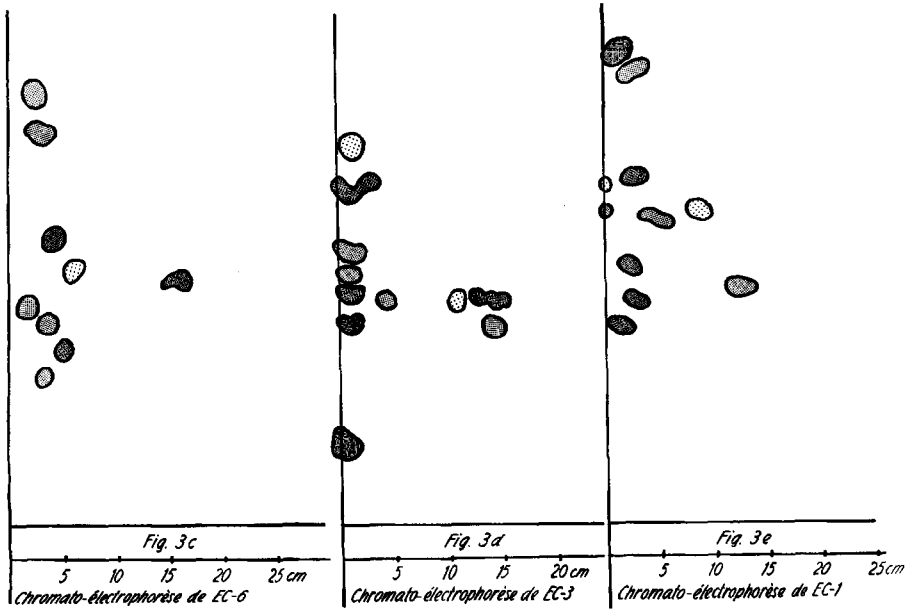
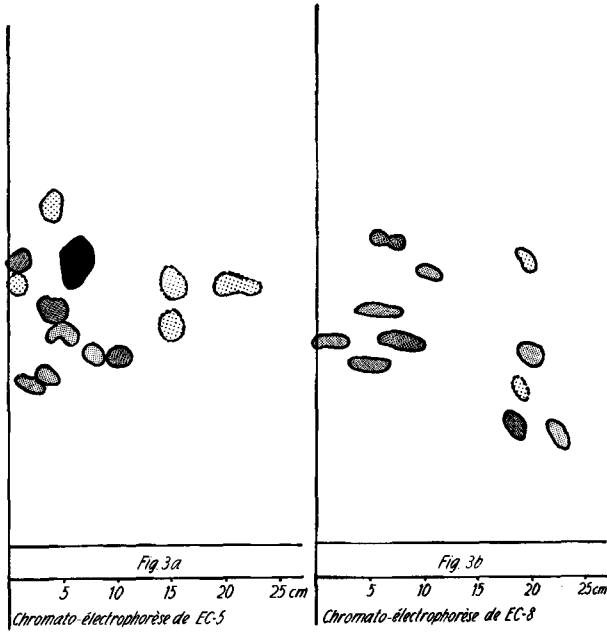
Aucune de ces fractions n'est homogène, comme le montre leur chromato-électrophorèse (voir fig. 3a, 3b, 3c, 3d et 3e).

Pour l'isolement préparatif de ces 8 fractions de l'extrait, nous soumettons simultanément à l'électrophorèse, à pH 6,5, 6 fois 20 mg de l'extrait sur autant de feuilles de papier. En répétant ces opérations un certain nombre de fois, on obtient des quan-

⁸⁾ P. BAUDET, *Chimia* 15, 321 (1961).

tités suffisantes de fractions actives pour pouvoir purifier les peptides strépogéniques qu'elles contiennent (voir tableau I).

La purification est poursuivie par électrophorèse à haut voltage sur papier, mais cette fois-ci à pH 2. EC-5 (neutre) montre alors 8 composants (voir fig. 4a et ta-



bleau II) dont 5 sont actifs. Remarquons les activités déjà considérables des fractions EC-5/2 et EC-5/4. L'ensemble des sous-fractions actives ne contient que le 30% de l'azote du EC-5 engagé, tout en possédant 95% de son activité. Cela signifie que EC-5 contenait encore passablement de substance inactive.

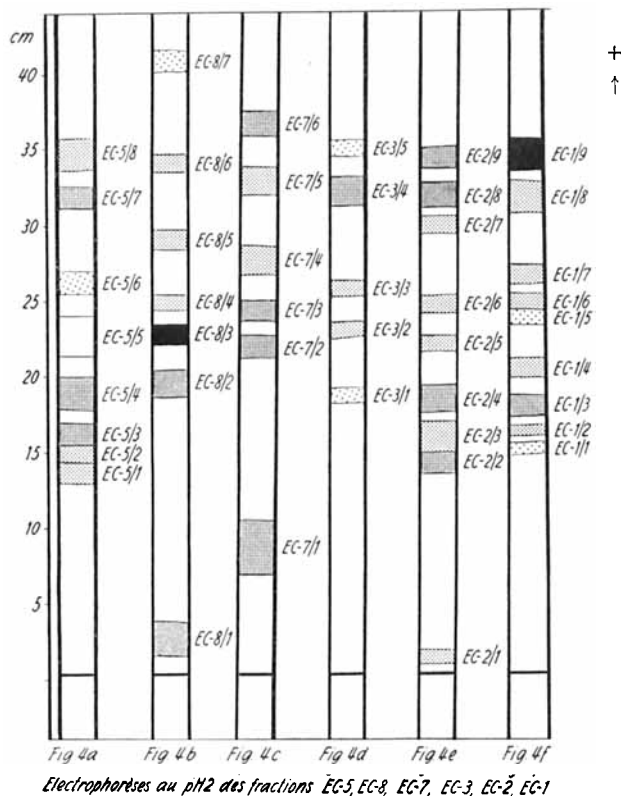


Tableau II. Fractions de EC-5, éluées après électrophorèse à 34,4 volts/cm de 3 h 30, au pH 2

Fraction	EC-5/1	EC-5/2	EC-5/3	EC-5/4	EC-5/5	EC-5/6	EC-5/7	EC-5/8
N; en μg	482	660	120	180	75	—	—	—
Activité (unités par mg*)	10	50	20	50	29	0	0	0

*) mg de poids sec calculé sur la base de 13% d'azote.

La fraction EC-8 (acide) se partage par électrophorèse à pH 2 (voir fig. 4b) en 7 sous-fractions dont seule la dernière a une activité stéréogénique notable (tableau III). La fraction EC-7, également acide, livre 6 sous-fractions (voir fig. 4c) dont les 4^e et 5^e sont actives (voir tableau IV), tandis que les fractions basiques, EC-2 et EC-1 se partagent resp. en 9 sous-fractions (voir fig. 4e et 4f) dont certaines seulement ont une activité (tableau IV).

Tableau III. *Fractions de EC-8, éluées après électrophorèse à 34,4 volts/cm de 3 h 30, au pH 2*

Fraction	EC-8/1	EC-8/2	EC-8/3	EC-8/4	EC-8/5	EC-8/6	EC-8/7
N; en μg	590	795	1000	190	80	115	40
Activité (unités par mg*) . . .	0	4	4	0	8	0	60
*) mg de poids sec calculé sur la base de 13% d'azote.							

Tableau IV. *Fraction de EC-1, EC-2 et EC-7, éluées après électrophorèse de 31 volts/cm, au pH 2*

Fraction active	EC-7/4	EC-7/5	EC-1/1	EC-1/2	EC-1/3	EC-2/8	EC-2/9
Activité (unités par mg*) . . .	66	80	42	58	58	34	15
*) mg de poids sec calculé sur la base de 13% d'azote pour EC-7 et de 16% d'azote pour EC-1 et EC-2.							

L'hydrolyse intégrale par HCl 5,7N de certaines des stéréogénines ainsi isolées, suivie d'un fractionnement chromato-électrophorétique des hydrolysats, révèle une composition assez variable en acides aminés (voir tableau V). Dans EC-5/1 et EC-5/5 la deuxième fonction acide des amino-acides dicarboxyliques doit être présente sous forme d'amide, puisque les peptides ont un caractère neutre et qu'il n'y a pas de restes d'acides diaminés.

Tableau V. *Acides aminés trouvés après hydrolyse intégrale de certaines fractions actives (les proportions trouvées sont indiquées entre parenthèses)*

Fractions	Acides aminés
EC-5/1	glu(1), asp(1), leu(1), val(1), pro(x), ala(1), gly(1), ser(1), lys(1)
EC-5/2	glu(1), asp(1), leu(1), val(2), ala(5 à 7), gly(1)
EC-5/4	glu, leu, val, phe, gly, ser, thr, arg
EC-7/5	glu(1), leu(1), val(1), phe(1)
EC-1/2	glu, val, ala, ser, lys

Il est peu probable que les activités de tous ces peptides soient dues à une séquence particulière qui leur serait commune. En effet, l'analyse des peptides stéréogéniques originaires d'hydrolysats partiels de protéines^{2) 4)} ou synthétisés⁶⁾, démontre qu'une spécificité de structure n'existe pas.

Le fait que *Lactobacillus casei* produit lui-même des stéréogénines sera peut-être à retenir lorsqu'il s'agira d'interpréter le mode d'action de ces peptides. Ce mode est encore très peu connu; rappelons⁹⁾ toutefois que nous avons pu rendre probable que l'acide folique est nécessaire pour que l'activité des stéréogénines exogènes puisse se manifester, et que la présence de stéréogénines l'est également pour que l'action de l'acide folique sur la croissance de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 puisse avoir lieu. Il pourrait en être de même pour les stéréogénines endogènes.

⁹⁾ P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, Actes Soc. helv. Sci. nat. 1959, 229.

La croissance normale du *Lactobacillus casei* ATCC 7469 en l'absence de strépopgénines exogènes s'explique maintenant par la présence de strépopgénines endocellulaires formées au cours du développement du lactobacille. Soulignons le fait que ces peptides ne diffusent pas dans le milieu extérieur.

Partie expérimentale

I. *Production des strépopgénines par Lactobacillus casei.* — Une prise de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 conservé sur milieu agarisé et peptoné, contenant un jus de tomate¹⁰⁾, est cultivée 20 h dans 10 ml d'un milieu liquide de même composition, à $38^\circ \pm 0,1^\circ$. Après centrifugation stérile, l'organisme est lavé 3 fois par 5 ml d'une solution stérile de NaCl 0,9%. La turbidité de la suspension de ces bactéries dans 10 ml de NaCl 0,9% stérile est mesurée au néphélomètre KLETT SUMMERSON, avec le filtre S 54. 2,5 ml de la suspension, d'une densité optique de 240, sont dilués dans 160 ml de NaCl 0,9% stérile (ou $2,5 \times$ la densité optique/240 ml, si la densité optique est différente). Cette nouvelle suspension constitue l'inoculum. A 10 l du milieu nutritif de LANDY-DICKEN¹⁾, on ajoute 10 ml de l'inoculum. Ce mélange est homogénéisé et incubé à $38^\circ \pm 0,1^\circ$, jusqu'à ce que la densité optique du milieu atteigne une valeur comprise entre 180 et 190. Cette turbidité correspond à 0,15 mg de bactéries par ml.

II. *Extraction des strépopgénines des cellules bactériennes.* — Les cellules de *Lactobacillus casei* sont isolées du milieu (env. 20 l) par centrifugation à la Sharpless à 44000 g, et le culot, lavé 2 fois par 100 ml de NaCl 0,9%, puis 1 fois par 200 ml d'eau distillée. La séparation des cellules s'effectue chaque fois par centrifugation à 3000 t/min durant 30 min. Les bactéries ainsi lavées sont suspendues dans 200 ml d'eau distillée. Cette nouvelle suspension est aussitôt autoclavée à 115° durant 30 min. Après refroidissement, l'extrait est séparé par centrifugation à 3000 t/min durant 30 min. L'extrait est concentré à env. 20 ml sous pression réduite à 45° dans un évaporateur rotatif¹¹⁾, puis lyophilisé. On obtient ainsi en moyenne 630 mg de poudre, ce qui représente le 17% du poids des cellules mises en œuvre.

III. Fractionnement. — 1. *Electrophorèse à haut potentiel* (voir ⁵⁾, I, 1, p. 1813).

Tampon pH 6,5: pyridine, ac. acétique et eau (en vol. 10/0,4/89,6).

Tampon pH 2: ac. acétique, ac. formique et eau (en vol. 30/23/94,7).

Tableau VI. *Electrophorèses des fractions EC retirées de l'extrait brut*

Fraction	Quantité mg	papier	pH	volts/cm	durée min
Extrait brut . . .	20	W3*	6,5	30	1 h 30
EC-1	1,5	W3	2	31	2 h 30
EC-2	1,8	W3	2	31	2 h 30
EC-5	5,8	W3	2	34,4	3 h 30
EC-7	2	W3	2	31	3 h 45
EC-8	7,9	W3	2	34,4	3 h 30
*) WHATMAN N° 3.					

2. *Chromato-électrophorèse* (voir ⁵⁾, II, 5, p. 1815). Papier: SCHLEICHER et SCHUELL 2043 A, lavé.

1^{re} direction: chromatographie, n-butanol, ac. acétique, H₂O (en vol. 40/10/50).

2^e direction: électrophorèse à pH 2, à 1800 volts, 2 h.

3. *Elution* (voir ⁵⁾, I, 2, p. 1811).

IV. *Méthodes analytiques.* — 1. *Dosage bactériologique des strépopgénines* (voir ⁴⁾).

2. *Réactifs pour colorimétrie:* ninhydrine puriss. 0,4%; 1 g de ninhydrine, 222 ml butanol secondaire, 2,5 ml ac. acétique et 25 ml eau.

¹⁰⁾ Tryptone DIFCO 10 g, extrait de levure DIFCO 10 g, jus de tomate (fraîchement préparé) 200 ml à pH 7,0, eau distillée 800 ml. Pour agariser le milieu on ajoute 13 g d'agar DIFCO.

¹¹⁾ L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, *Analyt. Chemistry* 22, 1462 (1950).

Ninhydrine *puriss.* 0,025%; 25 mg de ninhydrine dans 100 ml d'acétone.

3. *Hydrolyse intégrale* (voir ⁵⁾, II, 3, p. 1815).

4. *Dosages des acides aminés* (dosages avec la ninhydrine, voir ⁵⁾, II, 5, p. 1815) (v. tableau V).

Ce travail a bénéficié d'une subvention de la part de la FONDATION FRITZ HOFFMANN-LA ROCHE à laquelle nous exprimons ici encore nos très vifs remerciements.

SUMMARY

In the course of its development *Lactobacillus casei* ATCC 7469 produces peptides which exert a streptogenic activity upon its own growth. The purification of some of these peptides by paper electrophoresis at high voltage is described.

Laboratoires de chimie organique
et pharmaceutique de l'Université de Genève

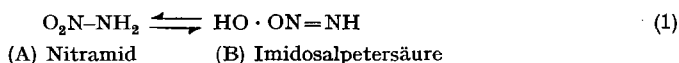
140. Reaktionen mit ¹⁵N

XXXVI. Konstitution und Zerfall des Nitramids O₂N·¹⁵NH₂¹⁾

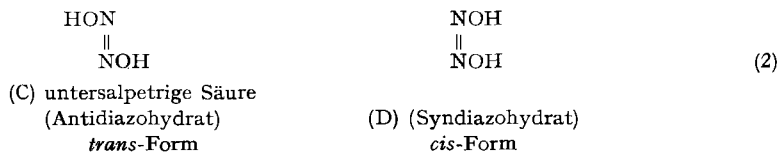
von K. Clusius

(6. V. 61)

1. THIELE & LACHMANN, die Entdecker des Nitramids, leiteten die Konstitution des Körpers von seiner Entstehung aus Nitrourethanderivaten ab²⁾. Wegen der sauren Reaktion der wässrigen Lösung zogen sie noch die Umlagerung in die tautomere Imidosalpetersäure in Betracht:



Diese Auffassung wurde von HANTZSCH lebhaft kritisiert, der mit KAUFMANN eine vergleichende Untersuchung des Nitramids und der isomeren untersalpetrigen Säure durchgeführt hatte³⁾. Für letztere nahm man schon damals eine symmetrische Konstitution an, woran sich bis heute nichts geändert hat. Prinzipiell sind zwei Stereoisomere denkbar:



Die Anschauungen von HANTZSCH waren weitgehend von seinen Vorstellungen über die Konstitution aromatischer Diazoverbindungen beherrscht. Ihn beunruhigte ausserdem die Konsequenz, dass nach der THIELE'schen Deutung Nitramid und

¹⁾ Reaktionen mit ¹⁵N, XXXV: Helv. 43, 2063 (1960).

²⁾ J. THIELE & A. LACHMANN, Ber. deutsch. chem. Ges. 27, 1909 (1894); Ann. 288, 297 (1895).

³⁾ A. HANTZSCH & L. KAUFMANN, Liebigs Ann. Chem. 292, 339 (1896); A. HANTZSCH, *ibid.* 292, 340 (1896); 296, 111 (1897); A. HANTZSCH & A. SAUER, *ibid.* 299, 67 (1897).