

DOSAGE DES FORMES D ET L DE L'ACIDE GLUTAMIQUE DANS LES PROTÉINES DES TISSUS NORMAUX ET NÉOPLASIQUES ET DANS LES CORPS MICROBIENS

par

P. BOULANGER ET R. OSTEUX*

Institut de Recherches sur le Cancer, Lille (France)

A. TECHNIQUES DE DOSAGE

Plusieurs méthodes ont été proposées pour la caractérisation et le dosage des deux isomères optiques d'un amino-acide. C'est d'abord l'isolement de l'acide aminé à l'état pur et la mesure de son pouvoir rotatoire; c'est ensuite l'application récente à ce cas particulier de la technique générale de dosage par dilution isotopique; c'est enfin la détection et l'estimation de la forme D par la D-acidaminodéhydrase rénale.

La première méthode serait parfaite, bien qu'elle nécessite une quantité de substance assez importante, si les sels des deux antipodes optiques possédaient toujours les mêmes solubilités. Or, en ce qui concerne l'acide glutamique, par exemple, KÖGL *et col.*¹ ont pu montrer que le racémate de baryum était beaucoup plus soluble que le L-glutamate et que l'isomère D pouvait ainsi échapper en partie ou même en totalité à l'isolement. Il semble bien que ce comportement particulier soit au moins l'une des causes des discordances que l'on constate dans les résultats d'analyse de protéines tumorales publiés jusqu'à présent. Il est frappant de voir certains auteurs (par exemple CHIBNALL *et col.*²) obtenir de l'acide L-glutamique „optiquement” pur là où KÖGL décèle la présence d'un taux appréciable de forme D. On ne peut s'empêcher de penser que le mode opératoire doit être en défaut dans l'un ou l'autre cas.

La méthode de dosage par dilution isotopique, dont on trouvera des exemples d'application dans les articles de RITTENBERG *et col.*³ et de KÖGL *et col.*⁴, est évidemment très élégante et théoriquement inattaquable: il semble qu'elle doive toujours conduire à des résultats indiscutables et sa mise en œuvre aurait dû permettre en particulier de trancher définitivement la question de la présence d'acide D-glutamique dans les protéines néoplasiques. Or, on sait qu'ici encore, les conclusions auxquelles sont parvenus RITTENBERG et ses collaborateurs³, grâce à des molécules marquées par l'azote N¹⁵, sont entièrement négatives** alors que celles de KÖGL⁴, qui a eu recours à l'acide deutéro-glutamique, sont en parfait accord avec les résultats initiaux de cet auteur.

Quant à la détermination des D-amino-acides par la D-acidaminodéhydrase, elle a l'avantage d'être étroitement spécifique, mais tout d'abord, elle permet seulement un dosage global des D-amino-acides, et ensuite elle ne s'applique pas également à tous les acides aminés. L'acide D-glutamique, notamment, est assez résistant à l'action de la

* Avec la collaboration technique de Mademoiselle CHR. BACHY.

** Il en est ainsi également des déterminations plus récentes de WIELAND ET PAUL⁵.

diastase, et il est nécessaire d'opérer avec des concentrations élevées d'enzyme et de substrat. Nous avons rapporté et discuté dans des publications antérieures⁶ les résultats positifs que nous avons obtenus dans ces conditions en opérant sur des hydrolysats acides et diastasiques de protéines normales et néoplasiques.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de mettre au point une technique qui, tout en échappant aux objections que nous venons de signaler, réunirait les avantages qu'offre l'isolement de l'acide glutamique à l'état pur et ceux que présentent les méthodes qui font appel à une action enzymatique spécifique. La combinaison de la chromatographie selon TH. WIELAND⁷ et de la décarboxylation par la glutamo-décarboxylase bactérienne préconisée par GALE⁸ nous a semblé répondre à ces exigences. Le principe du dosage séparé des formes D et L sera donc le suivant :

1. après isolement de l'acide glutamique, une méthode de dosage chimique donne l'acide glutamique total (formes L, D et DL) ;

2. une méthode enzymatique permet ensuite d'obtenir le taux d'acide L ; si le produit analysé ne contient que de l'acide naturel, les résultats trouvés par les deux méthodes sont identiques ; sinon, la différence entre le taux d'acide total dosé par voie chimique et le taux d'acide L obtenu par la méthode enzymatique correspondra à la teneur de l'acide glutamique en forme D.

La méthode enzymatique utilisée est celle de GALE⁸, qui repose sur l'action décarboxylante de la souche SR 12 de *Clostridium Welchii*. Sa spécificité est très grande, non seulement pour l'acide glutamique parmi les autres acides aminés, mais encore pour la forme L. Voici un exemple numérique des résultats obtenus :

Substrat	CO ₂ dégagé en μ l	Acide L trouvé en mg
Acide L-glutamique 1 mg	152.5	1.00
Acide D-glutamique 2 mg	0	0
Acide DL-glutamique 2 mg	153.5	1.007

C'est le dosage chimique qui nous a donné le plus de difficultés. Il fallait en effet doser uniquement l'acide glutamique et nous avons primitivement essayé d'appliquer directement à des mélanges complexes la méthode décrite par COHEN⁹ et utilisée par cet auteur dans ses études sur la transamination (oxydation en nitrile succinique par la chloramine, hydrolyse du nitrile en acide succinique et dosage par la succinodéshydrase). Nous avons abouti à un échec ; les résultats sont remarquablement précis et constants lorsqu'on opère sur des solutions ne contenant pratiquement que de l'acide glutamique, mais deviennent très infidèles lorsqu'on part d'hydrolysats protéiques ; nos nombreuses tentatives pour diminuer les écarts observés entre plusieurs dosages parallèles n'ont pas été couronnées de succès.

Aussi, nous avons jugé plus simple d'isoler au préalable l'acide glutamique et nous avons porté notre choix sur la méthode la plus rapide et la plus élégante : la séparation chromatographique sur alumine "acide" décrite par WIELAND⁷. La chromatographie de partage sur papier, selon CONSDEN, GORDON ET MARTIN¹⁰, nous permettait en outre de vérifier si l'éluat contenait exclusivement de l'acide glutamique. Nous avons ainsi été amenés à modifier légèrement les conditions expérimentales de WIELAND et à employer comme éluant sélectif de l'acide acétique non pas N/2 mais N/3. En effet, toutes les éluations réalisées avec de l'acide acétique N/2 entraînent des quantités appréciables d'acide aspartique. Or, il était indispensable d'éviter cette contamination, car parmi les dosages que nous effectuons sur l'éluat figure celui de l'azote aminé selon VAN SLYKE et nous risquions d'exprimer en acide glutamique de l'azote appartenant à d'autres amino-acides.

Il restait évidemment à démontrer que les isomères optiques de l'acide glutamique se comportaient identiquement lors de l'adsorption chromatographique et de l'éluat consécutive. Nous avons donc adsorbé sur 20 g d'alumine "acide" une solution contenant 16 mg d'acide L et 4 mg d'acide D-glutamique ; puis, après lavage, nous avons élué avec 200 ml d'acide acétique N/3. Dans l'éluat,

nous avons dosé l'azote aminé par la méthode de VAN SLYKE à l'acide nitreux et nous avons déterminé la proportion d'acide L au moyen de la glutamo-décarboxylase bactérienne. Nous avons obtenu les chiffres suivants:

Acide glutamique total (calculé d'après le taux de $N.NH_2$) 15.45
 Acide L-glutamique 12.09
 le rapport $\frac{\text{acide total}}{\text{acide L}}$ était de $\frac{20}{16} = 1.25$; le rapport trouvé est de $\frac{15.45}{12.09} = 1.27$.

Les deux énantiomorphes se comportent donc bien de la même façon. La proportion d'acide glutamique retrouvée est de 77.2% de l'acide total et 75.6% de la forme L.

On voit que l'élution par l'acide acétique N/3 n'est pas quantitative, mais ce que nous cherchons avant tout c'est à obtenir l'acide glutamique rigoureusement pur; comme le rapport des deux isomères optiques reste constant, il n'est pas nécessaire de récupérer la totalité de l'acide glutamique pour connaître les proportions réelles des formes D et L. La détermination des proportions relatives des deux isomères étant réalisée, il est facile d'en déduire les taux réellement présents dans la solution initiale: il suffit de doser la forme L directement dans celle-ci par la méthode de GALE²; une simple règle de trois donnera ensuite le pourcentage exact de forme D.

Nous avons confirmé nos résultats au moyen d'une deuxième technique qui n'est pas strictement quantitative mais dont la spécificité est très grande pour la mise en évidence de l'acide D-glutamique. Elle repose sur le fait que les corps microbiens de *Clostridium Welchii*, agissant sur l'acide L-glutamique, le transforment quantitativement en acide γ -aminobutyrique, dont le comportement en chromatographie de partage sur papier est tout à fait différent: le R_F dans le phénol- NH_3 3% est égal à 0.76, alors que celui de l'acide glutamique est de 0.25. Si donc, sur un hydrolysats protéique, on fait agir la décarboxylase, de telle façon que son action soit totale, on ne retrouvera plus l'acide glutamique sur le chromatogramme, à moins qu'il n'existe dans l'hydrolysats une certaine quantité de forme D, dont la teneur pourra être estimée d'après l'importance de la tache obtenue par révélation à la ninhydrine.

On fait agir pendant une heure les corps bactériens sur une partie aliquote de l'hydrolysats protéique, contenant environ 1 mg d'acide L-glutamique; on traite ensuite par un volume égal d'acétone, qui précipite la suspension microbienne; on centrifuge et on distille sous pression réduite à la température de 40° C. Le résidu est repris par une quantité calculée d'eau bi-distillée telle que 100 μ l sont répartis en quatre "spots" de départ sur la feuille de papier-filtre. La même opération est répétée avec les témoins, dont l'un correspond à un essai avec les microbes seuls, et l'autre à un essai avec les microbes ayant agi sur 1 mg d'acide L-glutamique. Enfin, en partant d'une solution pure d'acide L-glutamique, on fait 4 spots contenant en tout 10 μ g d'acide glutamique. Pour vérifier si la récupération ultérieure est bien complète, on double les essais sur les hydrolysats par une seconde série de quatre "spots" à laquelle on ajoute, sur le papier même, une quantité totale de 10 μ g d'acide glutamique. Le schéma 1 reproduit la disposition d'un chromatogramme au départ.

SCHÉMA 1

DISPOSITION DES SPOTS SUR LES FEUILLES POUR LA PREMIÈRE CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

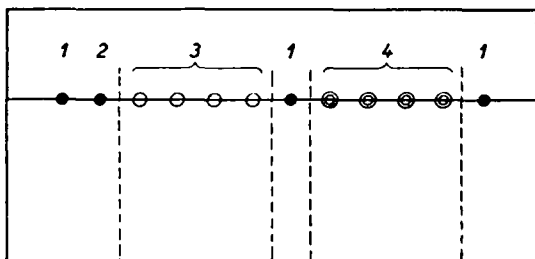
Les bandes portant les spots représentés par un disque noir sont après chromatographie séparées et révélées à la ninhydrine pour permettre de situer la hauteur de migration de l'acide glutamique sur le chromatogramme.

Spots 1: Solution d'acide glutamique pur (R_F théorique 0.25; pouvant varier avec la température).

Spots 2: Hydrolysats traité par les *Clostridium*. Son chromatogramme développé fixera la hauteur de la bande transversale à découper pour ne pas entraîner d'acide aspartique ni de glyco-colle.

Spots 3: Ensemble de 4 spots contenant en tout 100 μ l de la solution obtenue de la façon décrite dans le texte et correspondant à 200 μ g d'acide L-glutamique décarboxylé.

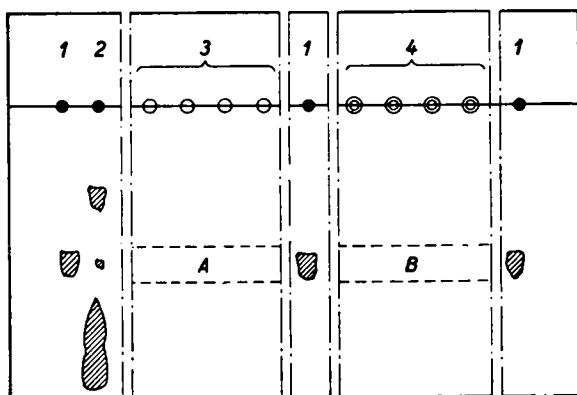
Spots 4: Ensemble de 4 spots identiques, mais auxquels on a ajouté sur papier 10 μ g d'acide glutamique.



La chromatographie de partage est réalisée avec le solvant phénol- NH_3 ; après développement et séchage, on découpe les bandes *longitudinales* correspondant à chaque série de spots; les témoins qui les encadrent sont révélés à la ninhydrine et permettent de situer très exactement la position de l'acide glutamique sur le chromatogramme.

SCHÉMA 2
DÉCOUPAGE DES PREMIERS
CHROMATOGRAMMES

Les 5 bandes longitudinales sont replacées en position primitive, ce qui permet de déterminer l'emplacement des bandes transversales A et B qui ne contiennent pratiquement que de l'acide glutamique. Chacune des bandes sera éluee et la solution, après concentration, sera disposée en un seul spot sur un deuxième chromatogramme qui comportera lui aussi un témoin contenant exactement 10 μg d'acide glutamique; on pourra ainsi juger si les récupérations ont été quantitatives.



On peut alors tracer les limites d'une bande *transversale* que l'on découpe et qui doit contenir la totalité de l'acide glutamique présent dans chaque essai (Schéma 2). Les bandes transversales sont éluées par de l'eau bidistillée selon la technique de DENT¹¹ et l'on obtient une solution qui ne contient pratiquement que de l'acide glutamique; on s'est ainsi débarrassé des autres acides aminés et surtout des ions Na^+ (provenant du tampon acétate $M/5$ utilisé pour la décarboxylation), qui constituent une gêne sérieuse dans la chromatographie de partage sur papier. La solution récupérée est évaporée à siccité sous pression réduite à la température du laboratoire*; le résidu est repris quantitativement par quelques microlitres d'eau qui seront concentrés cette fois en un seul spot pour un nouveau chromatogramme. Les taches d'acide glutamique obtenus après révélation à la ninhydrine sont estimées par comparaison avec les taches des témoins de 10 μg .

En général, les témoins "microbes" et "L-glutamique décarboxylé" ne contiennent pas la moindre trace d'acide glutamique. Dans les hydrolysats traités par la glutamo-décarboxylase l'acide L-glutamique a disparu et la tache que l'on obtient est due uniquement à l'isomère D. Cette tache est très discrète dans le cas des protéines normales, mais peut néanmoins être facilement repérée. Etant donné la marche des opérations et en particulier les dilutions et concentrations effectuées, si l'on trouve pour un hydrolysat une tache correspondant à environ 3 μg d'acide glutamique, on peut dire que la teneur en forme D par rapport à l'acide glutamique total contenu dans l'hydrolysat est de 1.5%. Comme on peut très facilement apprécier une tache de 1 μg , on décèle une teneur en acide D aussi faible que 0.5%. L'estimation est naturellement plus aisée lorsque le taux d'acide D-glutamique est plus important.

La chromatographie de partage sur papier permet donc une vérification des résultats fournis par notre première technique. Elle permet d'affirmer avec certitude l'absence ou la présence de forme D dans les hydrolysats protéiques.

La méthode générale que nous proposons nous paraît offrir toutes les garanties indispensables pour la caractérisation et le dosage de l'acide D-glutamique dans les produits naturels. Son application aux protéines nécessite des opérations préliminaires que nous résumerons brièvement.

1. La *préparation des protéines sèches* s'effectue selon le mode opératoire décrit par KÖGL¹²; après dessiccation et pulvérisation, les protéines solubles et insolubles dans la solution de chlorure de sodium à 6 g p. 1000 sont de nouveau intimement mélangées; la poudre obtenue constitue le produit de départ pour l'analyse.

2. L'*hydrolyse* est réalisée au moyen d'un excès d'acide chlorhydrique pur concentré ($D = 1.18$), par chauffage à reflux pendant sept heures au bain d'huile à 135°C**. On chasse sous pression réduite,

* On évite ainsi une transformation en acide pyrrolidone-carboxylique, qui ne donne plus la réaction de la ninhydrine.

** Voir l'Addendum en fin d'article page 423.

à 40° C, la plus grande partie de l'acide chlorhydrique du liquide d'hydrolyse; on évapore à sec, reprend par l'eau et neutralise par la soude. Après 12 heures de repos, les matières humiques et la cystine sont séparées par filtration; le précipité est lavé abondamment et le filtrat complété à un volume de 50 à 100 ml par gramme de protéine traité.

3. *Le dosage de l'acide L-glutamique dans l'hydrolysate* se fait selon la méthode de GALE⁸, en opérant dans des fioles manométriques de WARBURG à un appendice, sous atmosphère d'azote. La disposition est la suivante:

	Témoin "microbes"	Témoin acide glutamique	Dosage
Espace principal	2.5 ml tampon acétate M/5 pH 4.5	1 ml sol. ac. glut. (= 1 mg) 1.5 ml tampon id.	0.5 ml hydrolysate 2 ml tampon id.
Appendice latéral	0.5 ml de suspension de <i>Cl. Welchii</i>		

La suspension de corps microbiens contient environ 50 mg de substance sèche par fiole, c'est-à-dire le produit de 50 ml environ d'une culture de quinze heures. La quantité d'hydrolysate mise en jeu doit correspondre à un poids d'acide glutamique de l'ordre de 1 mg. Le temps d'action est de 1 heure, temps largement suffisant puisque le dégagement de CO₂ est généralement terminé au bout de 15 minutes.

Exemple numérique

Prise initiale: 2 g de protéines totales de muscle de boeuf; volume final complété à 100 ml. Le dosage est effectué sur 0.5 ml.

CO₂ dégagé: 214.5 µl

Acide L-glutamique calculé: $\frac{214.5 \cdot 1.47}{224} = 1.406$ mg dans la prise d'essai;

Acide L-glutamique par g de protéine: 0.1406 g, soit 14.06%.

Après la lecture manométrique finale, le contenu des fioles est transvasé dans des tubes à centrifuger coniques et additionné de 3 ml d'acétone. On centrifuge après 10 minutes de contact et on distille sous pression réduite, à 45° C, le liquide limpide surnageant. Le résidu de chacun des deux témoins est repris par 0.5 ml d'eau distillée et le résidu du dosage proprement dit par 0.7 ml, de telle sorte que 100 µl de solution correspondront à environ 200 µg d'acide L-glutamique (décarboxylé). On procède avec ces solutions aux essais de chromatographie de partage décrits plus haut: le chromatogramme final est complètement exempt d'acide glutamique pour les deux témoins et la tache correspondant à l'hydrolysate est estimée par comparaison avec la tache donnée par une solution titrée d'acide glutamique: on trouve 2 µg d'acide glutamique, ce qui correspond à une teneur de 1% en forme D par rapport à l'acide total.

4. *La chromatographie sur alumine* s'effectue selon les prescriptions de WIELAND⁷, avec les légères modifications que nous leur avons apportées. En général, nous opérons avec 25 ou 30 g d'alumine* et un volume d'hydrolysate contenant un peu moins de 25 mg d'acide glutamique. L'éluat est distillé sous pression réduite à 45° C et le résidu est repris par une quantité d'acide acétique N/2 exactement mesurée et telle que la teneur en acide glutamique soit au moins de 3 mg par ml. Cette solution sert au dosage de l'acide glutamique total par la méthode gazométrique de VAN SLYKE et au dosage de la forme L par le procédé de GALE. Auparavant, on s'assure par une chromatographie de partage sur papier de la pureté de l'éluat; on rejette ou on repasse sur colonne d'alumine tout éluat souillé d'acide aspartique.

Voici la suite des opérations pour l'exemple déjà décrit:

Alumine 30 g; hydrolysate 10 ml; éluat distillé et résidu repris par 5 ml de CH₃CO₂H N/2.

Dosage de l'azote aminé: Prise d'essai: 2 ml; température: 18°; pression: 764 mm; temps de réaction: 5 minutes.

Volume d'azote 1.205 ml

Volume d'azote du témoin 0.110 ml

Volume d'azote de l'acide glutamique 1.095 ml

Acide glutamique contenu dans l'éluat: $1.095 \cdot 0.578 \cdot \frac{147}{14} \cdot \frac{5}{2} = 16.62$ mg.

* Alumine R.P. pour chromatographie.

Dosage de l'acide L-glutamique: L'éluat est dilué au quart et le dosage est effectué sur une prise d'essai de 1 ml.

CO₂ dégagé: 125.8 μ l

Ac. L-glutamique dans la prise d'essai: $125.8 \cdot \frac{1.47}{224} = 0.825$ mg

Ac. L-glutamique dans l'éluat: $0.825 \cdot 20 = 16.50$ mg.

Si l'on calculait à partir de ces chiffres, obtenus avec le liquide d'élution, le pourcentage d'acide glutamique contenu dans les protéines initiales, on trouverait respectivement:

- pour l'acide glutamique total: 8.31 %
- pour l'acide L-glutamique: 8.25 %

Or, le taux d'acide L-glutamique dosé directement dans l'hydrolysate, avant chromatographie, est de 14.06%. En effet, la façon dont nous opérons ne conduit pas à une récupération quantitative de l'acide glutamique, dont une partie reste adsorbée sur l'alumine (voir plus haut). Mais ce qui nous intéresse, c'est de connaître exactement le rapport de l'acide glutamique total à l'acide L-glutamique, qui nous permettra, par une simple règle de trois, de calculer les teneurs réelles de l'hydrolysate initial et par suite de la protéine. Dans l'exemple qui nous occupe, nous avons:

Acide glutamique total: $\frac{14.06 \cdot 16.62}{16.50} = 14.16\%$ du poids de protéines sèches.

Il y a donc $14.16 - 14.06 = 0.10\%$ d'acide D-glutamique et le pourcentage de forme D par rapport à l'acide total est de 0.7%. Ce chiffre est évidemment inférieur à la limite de précision de la méthode; on peut néanmoins considérer qu'il indique un léger degré de racémisation, tel qu'on l'observe toujours à la suite d'une hydrolyse acide.

B. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Nous avons étudié des protéines tissulaires normales qui nous ont servi en quelque sorte de témoins et nous avons ensuite soumis à l'analyse une série de mélanges protéiques provenant de tumeurs expérimentales provoquées ou greffées. Enfin, nous avons traité des hydrolysats totaux de corps microbiens de plusieurs espèces; parmi celles-ci figure *Bacillus anthracis*, chez lequel on a décelé pour la première fois l'acide D-glutamique à l'état naturel (BRUCKNER ET IVANOVICZ¹³).

Nous avons rassemblé nos résultats dans le tableau ci-contre (Tableau I). Les chiffres appellent quelques brefs commentaires.

Tout d'abord, nous retrouvons dans *B. anthracis* la proportion élevée d'acide D-glutamique précédemment signalée; les corps microbiens contiennent de l'acide glutamique presque complètement racémisé, puisque l'acide L-glutamique en excès ne représente que 17 % du total. Une autre espèce microbienne, *Streptococcus faecalis*, renferme également de l'acide D-glutamique, mais à un taux considérablement plus faible. Cette constatation, déjà intéressante en elle-même, possède à nos yeux l'avantage de justifier la méthode que nous avons proposée; nous avons pu en effet déceler et doser très facilement un taux de forme D de 7.6 % (par rapport à l'acide glutamique total).

Aussi, les chiffres pratiquement normaux que nous ont donnés les tumeurs expérimentales apparaissent-ils, par contraste, encore plus convaincants. Il n'y a aucune différence sensible entre les protéines des tissus normaux et celles des tissus néoplasiques. Les taux de 1 à 2 % sont généralement considérés comme résultant de la racémisation de l'acide glutamique au cours de l'hydrolyse et on ne peut leur attribuer de signification biologique.

Il ne nous a donc pas été possible, jusqu'à présent, de confirmer les conclusions de KÖGL, que cet auteur vient de reprendre récemment¹⁴ en les appuyant sur une expérimentation apparemment inattaquable. Les causes du désaccord qui persiste entre KÖGL

TABLEAU I

Protéines	Acide glutamique trouvé (en g pour 100 g de protéines sèches)					% de D par rapport à l'acide total	Chromatographie sur papier	
	L et DL dans l'éluat (VAN SLYKE)	L dans l'éluat (GALE)	L total (GALE)	L et DL total	D total		Esti- mation de la tache (en µg)	% de D
I. ANIMALES								
Muscle de bœuf	8.33	8.25	14.06	14.20	0.14	1	2	1
Coeur de porc	9.22	9.08	12.32	12.51	0.19	1.5	3	1.5
Rein de porc	7.52	7.41	9.25	9.38	0.13	1.5	3	1.5
Rein de porc 1 g + ac. D-glut. 10 mg (D théor.: 10.9% par rap- port à l'A. Gl. total)	6.27	5.60	9.32	10.43	1.11	10.6	20	10
Rein de porc 1 g + ac. D-glut. 5 mg (D théor.: 6.37%)	7.09	6.63	9.27	9.92	0.65	6.55	15	7.5
II. NÉOPLASIQUES								
Benzopyrène (rat)	6.95	6.80	10.15	10.37	0.22	2.1	2.5	1.2
Epithélioma de Guérin (rat)	7.51	7.24	11.37	11.50	0.13	1.2	2	1
Sarcome de Jensen (rat)	6.79	6.67	8.76	8.92	0.16	1.8	3	1.5
Carcinome de Walker (rat)	6.52	6.36	8.10	8.30	0.20	2.4	3	1.5
Liposarcome de Dael (cobaye)	7.09	7.05	8.82	8.87	0.05	0.6	1	0.5
III. MICROBIENNES								
<i>Bacillus Anthracis</i> (I.P. Lille no 44)	4.77	2.80	7.40	12.60	5.2	41.3	70	40
<i>Cholera Ogawa</i> (I.P. Lille no 41)	3.92	3.87	7.10	7.19	0.09	1.2	2	1
<i>Clostridium</i> <i>Welchii</i> SR 12 (NCTC no 6784)	6.04	5.96	11.90	12.06	0.16	1.3	4	2
<i>Clostridium</i> <i>Welchii</i> BW 21 (NCTC no 6785)	5.83	5.70	9.21	9.42	0.21	2.2	5	2.5
<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i> (NCTC no 6783)	7.15	6.61	7.94	8.59	0.65	7.64	15	7.5

et ses contradicteurs restent mystérieuses. Nous avons peine à croire, pour notre part, qu'elles résident uniquement dans des différences d'importance secondaire entre les modes opératoires suivis de part et d'autre, et nous pensons que l'explication des discordances permettrait peut-être de faire des progrès sensibles vers la solution du problème fondamental de la structure des protéines cancéreuses. C'est dans cet esprit, — et sans aucun désir de polémique, — que nous avons tenu à rapporter nos résultats. Ils ont été obtenus grâce à une méthode qui nous paraît éviter la plupart des objections présentées à tous les procédés auxquels on a eu recours jusqu'à présent.

ADDENDUM

Alors que ce travail était près d'être achevé, nous avons eu connaissance du dernier mémoire de F. KÖGL¹⁴, dans lequel l'auteur insiste sur l'importance fondamentale des conditions d'hydrolyse des protéines pour l'isolement de l'acide glutamique et en particulier de la forme D. KÖGL préconise en effet une hydrolyse de 20 heures à reflux, au bain d'huile à 135°–160° C, avec 3 volumes d'acide chlorhydrique concentré. Or, dans nos recherches, nous nous sommes contentés d'une durée de 7 heures dans les mêmes conditions de température et de concentration en acide. Pour prévenir toute objection de ce côté, nous avons appliqué notre méthode de caractérisation et de dosage de l'acide D-glutamique à des hydrolysats de 20 heures et de 7 heures, obtenus à partir de protéines tissulaires normales et néoplasiques. Voici le résultat de la comparaison des degrés d'hydrolyse.

Prise d'essai: 1 g de protéines tissulaires séchées; addition de 3 ml de HCl concentré pur; chauffage à reflux à 145° C. L'hydrolysate dilué est filtré et le filtre lavé avec de l'eau chaude jusqu'à ce que les eaux de lavage passent incolores. Le filtrat est complété à 50 ml et on procède au dosage de l'azote total, de l'azote aminé (méthode à l'acide nitreux de VAN SLYKE), de l'acide L-glutamique (méthode de GALÈ), et à une chromatographie sur alumine "acide" après neutralisation préalable sous contrôle électrométrique.

TABLEAU II

	N total en mg par ml	N.NH ₂ en mg par ml	$\frac{N.NH_2}{N \text{ total}}$	Acide L-glutamique	
				en mg par ml	% de la protéine
<i>Reins de porc</i>					
Hydrolyse de 20 heures	2.42	1.96	81%	1.88	9.40
Hydrolyse de 7 heures	2.42	1.92	79%	1.77	8.85
<i>Tumeur au benzopyrène (rat)</i>					
Hydrolyse de 20 heures	2.63	2.09	79.5%	2.08	10.40
Hydrolyse de 7 heures	2.42	1.92	79%	2.00	10.00

On voit donc (Tableau II) qu'après une hydrolyse de 20 h le taux d'azote aminé libéré est très légèrement supérieur; mais la différence reste minime. Il en est de même pour la teneur en acide glutamique et les écarts sont, ici encore, peu significatifs. Les dosages donnent évidemment la teneur en acide L-glutamique et si l'on devait admettre

que l'hydrolyse prolongée libre, dans le cas des protéines tumorales, l'acide D-glutamique, engagé dans des liaisons plus difficiles à briser, la différence n'apparaît pas dans les chiffres du tableau ci-dessus. Mais c'est ici que la chromatographie de partage nous est d'un secours précieux. En effet, les hydrolysats "décarboxylés" ne contiennent pratiquement plus d'acide glutamique, ce que viennent encore confirmer les chiffres du Tableau III, qui sont particulièrement démonstratifs. Le chauffage prolongé dans les conditions exactes que recommande KÖGL nous a donc conduits à des résultats qui confirment entièrement nos conclusions.

TABLEAU III

Protéines	Acide glutamique trouvé (en g pour 100 g de protéines sèches)					% de D par rapport à l'acide total	Chromatographie sur papier	
	L et DL dans l'éluat (VAN SLYKE)	L dans l'éluat (GALE)	L total (GALE)	L et DL total	D total		Esti- mation de la tache (en µg)	% de D
<i>Reins de porc</i>								
Hydrolyse de 20 h	5.65	5.55	9.40	9.55	0.15	1.5	2	1
Hydrolyse de 7 h	5.50	5.45	8.85	8.93	0.08	0.9	2	1
<i>Tumeur au benzopyrene</i>								
Hydrolyse de 20 h	6.76	6.65	10.40	10.57	0.17	1.6	2	1
Hydrolyse de 7 h	7.31	7.20	10.00	10.15	0.15	1.5	2	1

RÉSUMÉ

Une méthode de caractérisation et de dosage des deux formes D et L de l'acide glutamique est décrite; elle repose à la fois sur la décarboxylation élective de l'acide L-glutamique par la glutamodécarboxylase de *Clostridium Welchii* SR 12 suivant GALE et sur la séparation de l'acide glutamique par chromatographie sur alumine acide selon WIELAND. La chromatographie de partage sur papier permet en outre de contrôler et de confirmer d'une façon rigoureuse les résultats obtenus. L'application à des protéines tissulaires normales et néoplasiques et à des corps microbiens de diverses espèces montre que le taux d'acide D-glutamique est de l'ordre de 1 à 2% (par rapport à l'acide glutamique total) aussi bien dans les protéines de tumeurs expérimentales (tumeurs au benzopyrène, épithélioma de GUÉRIN, carcinome de WALKER, sarcome de JENSEN, liposarcome de DAEL) que dans celles des tissus normaux. On retrouve au contraire une proportion importante de forme D dans *Bacillus anthracis*, — ce qui confirme les données antérieurement publiées, — et un taux appréciable dans *Streptococcus faecalis*. Nous avons donc la preuve que notre méthode est bien adaptée au but poursuivi, ce qui ne peut manquer d'augmenter la portée des résultats négatifs obtenus avec les protéines néoplasiques.

SUMMARY

A method is described for the identification and the estimation of the two forms, D and L, of glutamic acid; the principles are: 1. the specific decarboxylation of L-glutamic acid by the glutamodécarboxylase of *Clostridium Welchii* SR 12 (GALE) and 2. the isolation of glutamic acid by adsorption on acid alumina (WIELAND). The paper partition chromatography gives the possibility of a strict

control and affords a confirmation of the results. The application to normal, cancerous and bacterial proteins shows that in proteins of experimental tumors (benzpyrene-tumors, GUERIN epithelioma, WALKER carcinoma, JENSEN sarcoma, DAEL liposarcoma) and in proteins of normal tissues the proportion of D-glutamic acid does not exceed 1 to 2% of the total glutamic acid. However, a great proportion of D form is found in *Bacillus anthracis* and this fact affords a confirmation of the results already obtained by other authors. *Streptococcus faecalis* also contains a definite but smaller proportion of D-glutamic acid. So the method has proved to be reliable, and the significance of the negative results obtained with cancerous proteins is strengthened.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Methode zur Identifizierung und Bestimmung der D- und L-Glutaminsäure wird beschrieben; sie gründet sich auf die selektive Decarboxylierung der L-Glutaminsäure durch die Glutamodecarboxylase von *Clostridium Welchii* SR 12 (GALE) und auf die Isolierung der Glutaminsäure durch Adsorption an saurem Aluminiumoxyd (WIELAND). Die Verteilungschromatographie an Papier erlaubt ausserdem eine genaue Kontrolle und Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse. Die Anwendung dieser Methode auf Eiweisstoffe aus normalen und aus Krebsgeweben sowie aus verschiedenen Bakterienarten zeigt, dass in den Proteinen aus experimentellen Tumoren (Benzpyren-Tumor, GUERIN-Epitheliom, WALKER-Carcinom, JENSEN-Sarcom, DAEL-Liposarcom) und in den Proteinen aus normalen Geweben die D-Glutaminsäure 1-2% der Gesamtglutaminsäure nicht übersteigt. Man findet dagegen eine grosse Menge D-Form in *Bacillus anthracis*, was die Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigt, und auch *Streptococcus faecalis* enthält eine nicht unbedeutende Menge D-Form. Dies beweist die Verlässlichkeit unserer Methode und erhöht dadurch die Bedeutung der mit den Krebsproteinen erhaltenen negativen Ergebnisse.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. KÖGL ET H. ERXLEBEN, *Z. physiol. Chem.*, 261 (1939) 154.
- ² A. C. CHIBNALL, M. W. REES, E. F. WILLIAMS ET E. BOYLAND, *Biochem. J.*, 34 (1940) 285.
- ³ S. GRAFF, D. RITTENBERG ET G. L. FOSTER, *J. Biol. Chem.*, 133 (1940) 745; D. RITTENBERG, *Ann. Rev. Biochem.*, 15 (1946) 260.
- ⁴ F. KÖGL, H. ERXLEBEN ET G. J. VAN VEERSEN, *Z. physiol. Chem.*, 277 (1942) 251.
- ⁵ TH. WIELAND ET W. PAUL, *Ber.*, 77B (1944) 34.
- ⁶ P. BOULANGER, *Compt. rend. soc. biol.*, 137 (1943) 521; 138 (1944) 686.
- ⁷ TH. WIELAND ET L. WIRTH, *Ber.*, 76 (1943) 823.
- ⁸ E. P. GALE, *Biochem. J.*, 39 (1945) 46.
- ⁹ P. P. COHEN, *Biochem. J.*, 33 (1939) 551.
- ¹⁰ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- ¹¹ C. E. DENT, *Biochem. J.*, 41 (1947) 240.
- ¹² F. KÖGL ET H. ERXLEBEN, *Z. physiol. Chemie*, 258 (1939) 57.
- ¹³ G. IVANOWICZ ET V. BRUCKNER, *Z. Immunitätsforsch.*, 90 (1937) 304.
- ¹⁴ F. KÖGL, *Experientia*, 5 (1949) 173.

Reçu le 14 septembre 1949