

SUR LA PRÉSENCE DE L'ACIDE *a, ε*-DIAMINO-PIMÉLIQUE
DANS DIVERSES SOUCHES DE MYCOBACTÉRIES*

par

THÉRÈSE GENDRE ET EDGAR LEDERER

*Institut de Biologie Physico-chimique,
Paris (France)*

En étudiant un hydrolysat de Bacilles diptériques par chromatographie sur papier, WORK^{1, 2, 3} a découvert un nouvel acide aminé qu'elle a ensuite obtenu à l'état cristallisé et identifié avec l'acide *a, ε*-diamino-pimélique (HOOC-CH(NH₂)-CH₂-CH₂-CH₂-CH(NH₂)-COOH)^{4, 15} déjà synthétisé en 1908 par SØRENSEN ET ANDERSEN⁵.

Entre temps, ASSELINEAU, CHOUCROUN ET LEDERER⁶ ont trouvé le même acide aminé dans l'hydrolysat d'un lipopolysaccharide extrait d'une souche humaine virulente de *Mycobacterium tuberculosis*. Il se trouve là accompagné d'*alanine* et d'*acide glutamique*. ASSELINEAU ET LEDERER⁷ ont montré ensuite que ces trois mêmes acides aminés se trouvent dans des lipopolysaccharides de souches humaines virulentes, (H₃₇-Rv, Test, R₁) mais pas dans ceux d'une souche humaine avirulente (H₃₇-Ra) ou de souches bovines (B.C.G., Vallée)**.

WORK¹⁵ a confirmé la présence de l'acide *a, ε*-diamino-pimélique dans des hydrolysats de Bacilles de quatre souches de Mycobactéries (humaine, bovine, aviaire, B.C.G.), et l'a également trouvé dans *Bacillus proteus*, mais pas dans *Staphylococcus aureus*. SYNGE⁹ l'a aussi trouvé dans un Bacille du rumen de mouton. Sa présence est jusqu'ici circonscrite aux Bactéries. Récemment, BREMNER¹⁰ a trouvé le même acide aminé dans des protéines du sol; là aussi l'origine bactérienne semble hors de doute.

Il nous a paru intéressant de rechercher l'acide *a, ε*-diamino-pimélique dans différentes souches de Mycobactéries et d'en préciser la distribution dans les différentes fractions isolées de ces Bacilles.

La méthode chromatographique d'isolement de l'acide *a, ε*-diamino-pimélique que nous décrivons dans la partie expérimentale est assez spécifique et permet des dosages semi-quantitatifs à l'échelle de quelques μg .

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Hydrolyse

Les bacilles entiers ou partiellement délipidés ont été hydrolysés pendant 20 heures par 200 parties de HCl 6 N, bidistillé, en tube scellé, sous CO₂, à 105-110°. Après filtration des matières humiques, on évapore à sec sous vide en présence de KOH et de P₂O₅. On reprend le résidu plusieurs fois par l'eau et l'évapore à sec.

* 10ème Communication sur les constituants du Bacille Tuberculeux. 9ème Communication, voir: J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 126.

** Pour plus de détails sur cette question, voir ASSELINEAU ET LEDERER⁸.

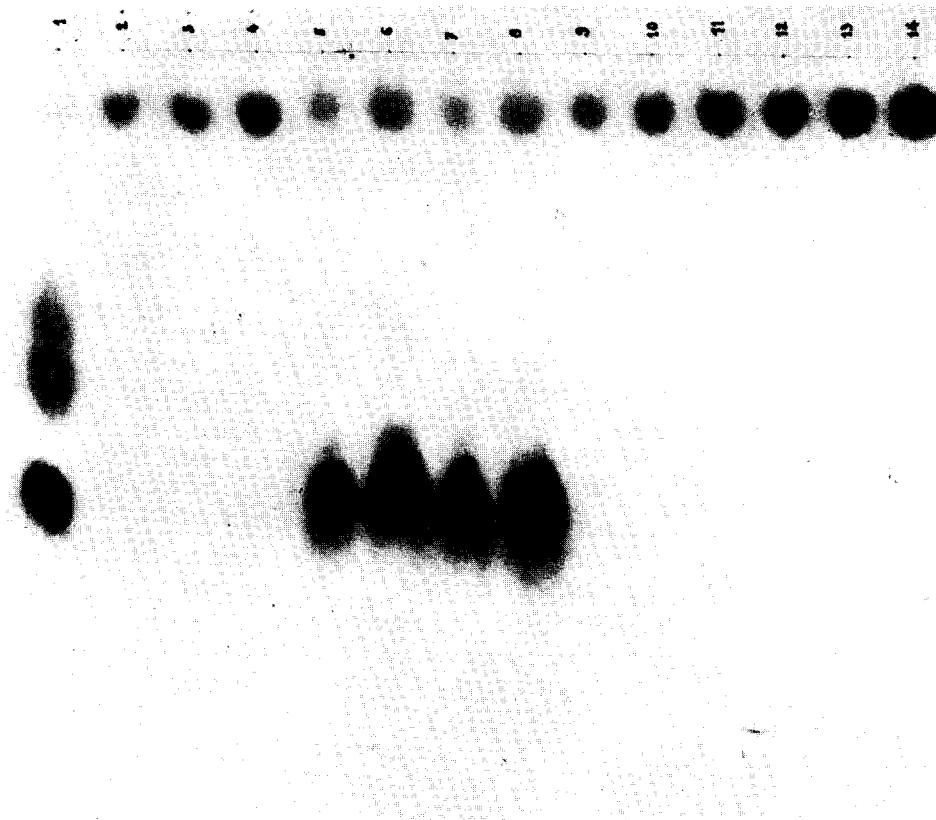


Fig. 1. Chromatographies sur papier (Whatman No. 1, solvant: butanol-acide formique; développement à la ninhydrine, après 40 heures).

- No. 1: Protéine extraite par le phénol d'un résidu bacillaire délipidé de souche humaine virulente Test; vérification de l'élution complète de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique par l'acide acétique *N*; éluat chlorhydrique d'alumine acide, ne contenant plus d'acide diamino-pimélique; les deux taches correspondent aux acides aspartique et glutamique.
- No. 2, 3, 4: acide α, ϵ -diamino-pimélique synthétique, à concentration croissante.
- No. 5, 6: 1 et 2 gouttes d'un éluat acétique correspondant à la protéine de No. 1; les fortes taches dans le bas du chromatogramme correspondent à l'acide glutamique.
- No. 7, 8: 1 et 2 gouttes d'un éluat acétique correspondant à une protéine extraite par le phénol d'un résidu bacillaire délipidé de B.C.G.
- No. 9-14: acide α, ϵ -diamino-pimélique isolé du Bacille Diphtérique par E. WORK (4.2, 6.3, 8.4, 10.5, 12.6, 16.8 μ g par tache).

Chromatographie

WORK^{3,4} a trouvé que l'acide α, ϵ -diamino-pimélique est adsorbé sur alumine acide, avec les acides aspartique et glutamique, quand on emploie une quantité d'alumine acide trois fois plus grande que celle nécessaire pour retenir les acides aminés dicarboxyliques. Nous nous servons de cette propriété de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique, pour le séparer des autres acides aminés. L'éluat de l'alumine est ensuite chromatographié sur papier.

Adsorption sur alumine. Nous utilisons l'alumine d'activité I préparée d'après DUPONT, DULOU ET VILKAS¹¹. On remplit un tube de 5 mm de diamètre avec 1.6 g de cette alumine et laisse passer à travers cette colonne 5 ml de HCl N chauffés à environ 85°; on lave ensuite à l'eau distillée (environ 200 ml) jusqu'à ce que le pH des dernières gouttes sortant de la colonne soit de 4.2 ± 0.2 (voir à ce sujet FROMAGEOT, JUTIZ ET LEDERER¹²). On verse sur la colonne ainsi préparée 2 ml d'une solution aqueuse contenant environ 10 mg de résidu sec, saturée d' H_2S (pour éviter l'adsorption de la cystine) et neutralisée à pH 7 par LiOH. On lave ensuite par 15 ml d'eau saturée d' H_2S , ce qui fait passer dans le filtrat tous les acides aminés basiques et neutres¹².

L'éluation de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique (avec la plus grande partie de l'acide glutamique) se fait quantitativement par 5 ml d'acide acétique N. On évapore l'éluat à sec, sous vide. L'éluation complète est vérifiée par l'absence d'acide diaminopimélique dans un éluat chlorhydrique effectué à la suite de l'éluation acétique (Fig. 1, No. 1).

Chromatographie sur papier. Nous employons le papier Whatman no 1 et comme phase organique une solution d'acide formique dans le *n*-butanol, préparée de la façon suivante: 180 ml de *n*-butanol fraîchement rectifié sont mélangés avec 20 ml d'acide formique à 96–98% puis saturés par 200 ml d'eau distillée. La couche supérieure sert de phase organique; elle est, fraîchement préparée à 20°, 1.4 N en acide formique; après 4 jours, par suite de formation de formiate de butyle, l'acidité tombe à 0.7 N.

Nous opérons par chromatographie descendante et laissons couler le solvant pendant 40 heures; la révélation est faite avec une solution de ninhydrine à 0.15% dans le butanol.

Le solvant indiqué permet une bonne séparation de l'acide diamino-pimélique (R_F -0.015) et de l'acide glutamique (R_F 0.17) seules substances présentes en quantité notable dans l'éluat acétique de l'alumine acide (Fig. 1, no. 5-8). On y remarque quelquefois deux faibles taches au-dessus de celle de l'acide glutamique; il s'agit là de sérine et de thréonine dont une partie est retenue sur la colonne d'alumine acide.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Spécificité de la méthode

L'emploi de la colonne d'alumine acide, sous les conditions décrites ci-dessus, permet d'éliminer toutes les substances non acides; ceci est indispensable, car les acides aminés basiques ont, dans le butanol-acide formique un R_F très voisin de celui de l'acide diamino-pimélique. L'éluation par l'acide acétique N élimine en plus l'acide aspartique et d'autres substances acides fortement fixées, comme par exemple l'acide cystéique et l'acide colamine-phosphorique, qui ne s'éluent qu'à l'acide chlorhydrique N*.

La tache de R_F 0.012–0.015 obtenue sous les conditions décrites ci-dessus semble donc pouvoir être attribuée uniquement à l'acide α, ϵ -diamino-pimélique. On peut, en cas de doute, vérifier l'identité de cette tache par les essais suivants: 1. Absence de coloration par le nitroprussiate + CNK (pour démontrer l'absence de cystine); 2. chromatographie à deux dimensions de l'éluat acétique, en utilisant par exemple le phénol en présence de NH_3 comme deuxième solvant (R_F de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique: 0.24)**.

Les homologues inférieurs de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique (par exemple α, δ -diamino-adipique) ou les homologues supérieurs (p. ex. acide α, ζ -diamino-subérique) n'ont pas encore été trouvés dans la nature. Leur présence se traduirait sur papier par des taches légèrement déplacées par rapport à celle de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique. Dans les conditions où nous opérons, l'acide α, δ -diamino-

* Ceci a été vérifié avec des substances synthétiques.

** Notons à ce sujet, que nous trouvons maintenant, contrairement à des essais antérieurs⁶ des R_F très voisins pour les acides glutamique et diamino-pimélique dans le phénol; une séparation n'est pratiquement pas possible, dans ce solvant.

adipique* est retenu plus fortement sur la colonne d'alumine acide que l'acide diamino-pimélique, car s'il s'élue partiellement à l'acide acétique *N*, une importante fraction ne s'élue qu'à l'acide chlorhydrique *N*. Dans le *n*-butanol-acide formique, son R_F est sensiblement le même (0.012) que celui de l'acide diamino-pimélique (0.015). On peut cependant séparer les deux substances par chromatographie dans le phénol (R_F de l'acide diamino-pimélique = 0.24; R_F de l'acide diamino-adipique = 0.18). Ceci permet de prévoir que l'homologue supérieur de l'acide diamino-pimélique, l'acide diamino-subérique, doit avoir dans le phénol un R_F nettement supérieur à celui de l'acide diamino-pimélique, ce qui permettra ainsi leur séparation. Une chromatographie bidimensionnelle de l'éluat acétique s'imposerait donc dans le cas où l'on soupçonnerait la présence d'homologues inférieurs ou supérieurs de l'acide diamino-pimélique.

Nous n'avons obtenu aucune tache correspondant à celle de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique, après chromatographie sur alumine, puis sur papier d'hydrolysats totaux des protéines suivantes: ovalbumine, sérumalbumine, insuline, lysozyme et d'un hydrolysat total de levure de boulangerie. En ajoutant à ces hydrolysats une faible quantité d'acide α, ϵ -diamino-pimélique, on retrouve la tache caractéristique sur papier. En ajoutant p. ex. 93 μg d'acide diamino-pimélique à 10 mg de sérumalbumine, nous en avons retrouvé 80 μg = 85%, après chromatographie sur colonne et sur papier. Avec 50 μg nous en retrouvons 45 μg = 90%.

Dosages

Les éluats acétiques sont chromatographiés sur papier en même temps qu'une gamme étalon de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique** en quantité croissantes (3 à 15 μg); la surface des taches obtenues après révélation à la ninhydrine est mesurée directement au planimètre. Nous effectuons par exemple cinq mesures par tache et nous prenons la moyenne des valeurs obtenues. La surface est proportionnelle au logarithme des concentrations (FISHER, PARSONS ET MORRISON¹³). Ce dosage semiquantitatif ne permet d'obtenir que des chiffres très approximatifs, que nous estimons à $\pm 20\%$ près. On pourrait obtenir une plus grande précision par élution des taches et colorimétrie avec la ninhydrine-hydrindantine, d'après MOORE ET STEIN¹⁴.

Résultats

1. Hydrolysats de Bacilles entiers

Le Tableau I donne quelques chiffres de la teneur en acide α, ϵ -diamino-pimélique de Mycobactéries entières. On voit qu'ils varient, pour les 15 souches étudiées, de 0.2 à 0.7% ($\pm 20\%$). *L'acide α, ϵ -diamino-pimélique se trouve dans toutes les souches de Mycobactéries étudiées jusqu'ici*. Il ne semble pas y avoir de différence quantitative entre souches virulentes et non virulentes, en ce qui concerne la teneur en acide α, ϵ -diamino-pimélique des hydrolysats totaux. Indiquons par comparaison que nous trouvons le chiffre de 0.95% pour un hydrolysat de Bacille Diphtérique. Dans un hydrolysat de *Vibrio cholerae**** nous avons trouvé 0.5% d'acide diamino-pimélique; nous n'en avons pas trouvé (ou que des traces) dans un hydrolysat de *Staphylococcus aureus*, ce qui confirme les données de WORK¹⁵.

* Nous remercions le Professeur J. C. SHEEHAN, Boston, pour un échantillon d'acide α, δ -diamino-adipique.

** Nous remercions Mlle E. WORK pour des échantillons d'acide α, ϵ -diamino-pimélique.

*** Nous remercions Monsieur J. GALLUT (Institut Pasteur) pour le Bacille du choléra.

TABLEAU I
TENEUR EN ACIDE α, ϵ -DIAMINO-PIMÉLIQUE DE 15 SOUCHES DE MYCOBACTÉRIES

Souches	Virulence	% d'acide α, ϵ -diamino-pimélique par rapport au poids sec des Bacilles
I. Humaines		
1. H-37 Rv	+++	0.5
2. H 37 Ra	—	0.3
3. Test	++	0.3
4. R ₁	+	0.3
5. L 25	—	0.3
II. Bovines		
1. B.C.G.	—	0.4
2. Vallée	+	0.7
3. Marmorek	++	0.3
4. Dupré	++	0.3
III. Aviaire		
1. No 802	—	0.6
IV. Paratuberculeuses		
1. <i>M. phlei</i>	—	0.2
2. <i>M. agreste</i>	—	0.6
3. <i>M. acné</i>	—	0.7
4. <i>M. Friedmanii</i>	—	0.6
5. <i>M. Bruynoghi</i>	—	0.4

2. Distribution de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique dans diverses fractions extraites de Mycobactéries

a. *Fractions lipidiques.* Nous avons déjà mentionné la présence des trois acides aminés, acide α, ϵ -diamino-pimélique, acide glutamique et alanine, dans des lipopolysaccharides isolés des souches humaines virulentes suivantes: H37-Rv, Test, Aeschbacher, R₁⁷. Les souches humaines L 25 et L 65 isolées par CANETTI (Institut Pasteur) de lésions lupiques, contiennent également les trois acides aminés dans les lipopolysaccharides⁸. Celui de souche Test contient, d'après nos dosages, environ 1.1% d'acide diamino-pimélique.

La souche humaine avirulente H37-Ra, les souches bovines Vallée, Marmorek, Dupré, le B.C.G. et *Mycobacterium phlei* ont des lipopolysaccharides dépourvus d'acides aminés⁸.

Les phosphatides des souches Test et Marmorek contiennent une substance azotée qui n'est pas l'acide α, ϵ -diamino-pimélique et que nous essayons d'identifier. Nous n'avons pas trouvé d'azote dans les autres fractions lipidiques extraites de la souche humaine Test: graisses solubles dans l'acétone, cires A (cires extraites par l'alcool-éther, insolubles dans l'acétone à froid), cires molles.

Le lipopolysaccharide des souches humaines virulentes semble donc être la seule fraction lipidique contenant de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique.

b. *Fractions protéïdiques.* Il est évident, d'après ce qui vient d'être dit sur les substances azotées des fractions lipidiques, que tout l'acide α, ϵ -diamino-pimélique des souches humaines avirulentes, des souches bovines ou paratuberculeuses se trouve dans

les protéines. Des préparations de protéines, extraites par le phénol, de Bacilles de souche humaine Test et du BCG*, contiennent 0.65 et 0.5% d'acide diamino-pimélique.

Nous n'avons pas pu nous procurer de tuberculine pure; un échantillon estimé à 70% pur contenait environ 0.6% d'acide α, ϵ -diamino-pimélique.

REMERCIEMENT

Nous remercions la "Fondation Waksman pour le développement des Etudes microbiologiques en France" pour une subvention ayant facilité ce travail.

RÉSUMÉ

1. Nous décrivons une méthode de détermination semiquantitative de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique dans des hydrolysats de Bactéries. Elle consiste à adsorber l'acide α, ϵ -diamino-pimélique sur alumine acide, à l'éluer (en même temps que l'acide glutamique) par l'acide acétique *N*, puis à chromatographier l'élutat sur papier. On obtient ainsi une tache bien distincte dont la mesure de la surface permet un dosage semiquantitatif.

2. Nous avons appliqué cette méthode à des hydrolysats de Mycobactéries de 15 souches différentes (5 humaines, 4 bovines, une aviaire et 5 paratuberculeuses). Toutes ces souches ont une teneur en acide α, ϵ -diamino-pimélique de 0.2 à 0.7% du poids sec des bactéries; il n'y a pas de différence quantitative suivant la virulence des Bacilles.

3. Parmi les fractions lipidiques extraites des Bacilles, seul le lipopolysaccharide azoté des souches humaines virulentes, décrit précédemment^{6,7,8}, contient de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique.

Il semble donc y avoir deux cas bien distincts: 1. souches humaines virulentes, qui contiennent de l'acide α, ϵ -diamino-pimélique dans les protéines et dans un lipopolysaccharide; 2. les autres souches (humaines avirulentes, bovines, paratuberculeuses) dans lesquelles l'acide α, ϵ -diamino-pimélique est absent des lipides et se trouve uniquement dans les protéines.

SUMMARY

1. A method for the semiquantitative determination of α, ϵ -diaminopimelic acid in bacterial hydrolysates is described. It consists of the adsorption of the α, ϵ -diaminopimelic acid on acid alumina, followed by elution with *N* acetic acid (together with glutamic acid) and chromatography of the eluate on paper. A distinct spot is thus obtained, and measurement of its surface area enables a semiquantitative estimation of the acid to be made.

2. This method has been applied to hydrolysates from 15 different strains of mycobacteria (5 human, 4 bovine, 1 avian, and 5 paratubercular). All these strains contain 0.2-0.7% α, ϵ -diaminopimelic acid, calculated on the dry weight of the bacteria. No quantitative differences connected with the virulence of the bacteria could be established.

3. Of the lipid fractions extracted from the bacilli, only the nitrogen-containing lipopolysaccharide from the human virulent strains, previously described^{6,7,8}, contains α, ϵ -diaminopimelic acid.

Thus there seem to be two distinct cases: 1. human virulent strains which have α, ϵ -diaminopimelic acid in the proteins and in a lipopolysaccharide, and 2. the other strains (human non-virulent, bovine, paratubercular) in which the acid in question is absent from the lipids and is found only in the proteins.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Eine semiquantitative Methode zur Bestimmung der α, ϵ -Diaminopimelinsäure in Bakterienhydrolysaten wird beschrieben. Sie besteht darin, dass die α, ϵ -Diaminopimelinsäure an saurem Aluminiumoxyd adsorbiert, und mit *N* Essigsäure (zusammen mit Glutaminsäure) eluiert wird, worauf das Eluat an Papier chromatographiert wird. Man erhält so einen deutlichen Fleck; die Ausmessung seiner Oberfläche gestattet eine semiquantitative Bestimmung der α, ϵ -Diaminopimelinsäure.

2. Diese Methode wurde auf Mycobakterienhydrolysate von 15 verschiedenen Stämmen ange-

* Nous remercions Monsieur J. ASSELINEAU pour ces préparations ainsi que pour divers extraits lipidiques ayant été utilisés au cours de ce travail.

wendet (5 menschliche, 4 Rinder-, ein Vogel- und 5 paratuberkulöse Stämme). All diese Stämme enthalten 0.2 bis 0.7% des Gewichtes der Trockenbakterien an α, ϵ -Diaminopimelinsäure; es wurden keine quantitativen Unterschiede, die mit der Virulenz der Bazillen zusammenhängen, festgestellt.

3. Unter den aus den Bazillen extrahierten Lipoidfraktionen enthält lediglich das stickstoffhaltige Lipopolysaccharid der menschlichen virulenten Stämme, welches früher beschrieben worden ist^{6,7,8}, α, ϵ -Diaminopimelinsäure.

Es scheinen also zwei deutlich verschiedene Fälle vorzukommen: menschliche virulente Stämme, welche α, ϵ -Diaminopimelinsäure in den Proteinen und in einem Lipopolysaccharid enthalten, und die anderen Stämme (menschliche avirulente, Rinder-, paratuberkulöse), deren Lipoide frei von α, ϵ -Diaminopimelinsäure sind und welche diese Säure lediglich in den Proteinen enthalten.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. WORK, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 138.
- ² E. WORK, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 400.
- ³ E. WORK, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 204.
- ⁴ E. WORK, *Nature*, 165 (1950) 74.
- ⁵ S. P. L. SØRENSEN ET A. C. ANDERSEN, *Z. Physiol. Chem.*, 56 (1908) 250.
- ⁶ J. ASSELINEAU, N. CHOUCROUN ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 197.
- ⁷ J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Compt. rend.*, 230 (1950) 142.
- ⁸ J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Experientia*, 6 (1951) sous presse.
- ⁹ R. L. M. SYNGE, d'après E. WORK³, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 204.
- ¹⁰ J. M. BREMNER, *Biochem. J.*, 47 (1950) 538.
- ¹¹ G. DUPONT, R. DULOU ET M. VILKAS, *Bull. soc. chim. France*, (1948), 785.
- ¹² C. FROMAGEOT, M. JUTISSE ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- ¹³ R. B. FISHER, D. S. PARSONS ET G. A. MORRISON, *Nature*, 161 (1948) 764.
- ¹⁴ S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 373.
- ¹⁵ E. WORK, *Biochem. J.*, 46 (1950) V.

Reçu le 27 avril 1951

Note ajoutée à la correction des épreuves (21 juin 1951):

Le présent mémoire rectifie des données d'un travail antérieur⁶ d'après lequel l'acide diaminopimélique "ne semble pas être présent dans des hydrolysats acides de résidus bacillaires obtenus après enlèvement des 'lipides fortement liés' selon ANDERSON". Nous sommes ainsi en plein accord avec E. WORK dont le mémoire détaillé "The isolation of α, ϵ -diaminopimelic acid from *Corynebacterium diphtheriae* and *Mycobacterium tuberculosis*" vient de paraître (*Biochem. J.*, 49 (1951) 17).