

Literatur

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Mitt. I der Fremdstoff-Kommission, 14. 4. 1964. — DREWS, G., Acides Ribonucléiques et Polyphosphates, Centre National de la Recherche Scientifique p. 533 (Paris 1962). — EBEL, J. P., J. COLAS et S. MULLER, Exptl. Cell Research **15**, 21-42 (1958). — EICHHOLTZ, F., E. A. RIVERTON et J.-D. KLINKE, Ther. Umsch. **20**, 93 (1963). — FLEISCH, H., Clin. Orthop. **32**, 170 (1964). — FLEISCH, H. und S. BISAZ, Z. Ernährungswiss. Suppl. **4**, 166 (1965). — FLEISCH, H., S. BISAZ, and A. D. CARE, Lancet, May **16**, 1065 (1964). — FLEISCH, H., S. BISAZ und A. CARE, Helvet. Physiol. acta **22**, C 16-C 17 (1964). — FLEISCH, H. and W. F. NEUMAN, Amer. J. Physiol. **200**, 1296 (1961). — VAN GENDEREN, H., G. J. VAN ESCH, H. H. VINK und S. J. WIT, Arzneimittelforsch. **7**, 172 (1957). — GOSSELIN, R. E., A. ROTHSTEIN, G. J. MILLER, and H. L. BERKE, J. Pharmacol. exper. Ther. **106**, 180 (1952). — GRUNZE, H. und E. THILO, Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate (Berlin 1956). — HAHN, F., Z. Ernährungswiss. Suppl. **1** (1961). — HAHN, F., Klin. Wschr. **42**, 505 (1964). — HAHN, F. und K. LANG, DLR **57**, 330 (1961). — KÜHL, A., Erg. Biol. **23**, 144 (Heidelberg 1960). — LANG, K., L. SCHACHINGER, O. KARGES, F. K. BLUMENBERG, G. ROSSMÜLLER und K. SCHMUTTE, Biochem. Z. **327**, 118 (1955). — LANG, K., Kondensierte Phosphate in Lebensmitteln (Heidelberg 1958). — LANG, K. und D. GROSSMANN, Biochem. Z. **336**, 351 (1962). — LYNN, W. S. and H. R. BROWN, Biochem. Biophys. Res. Commun. **11**, 357 (1963). — MATTENHEIMER, H., Kondensierte Phosphate in Lebensmitteln (Heidelberg 1958). — PENNIAL, R. and J. B. GRIFFIN, Biochem. Biophys. Acta **90**, 429 (1964). — RUF, F., Unveröffentlichte Untersuchungen. — RUF, F., Persönliche Mitteilung. — SCHREIER, K. und H. G. NÖLLER, Arch. Exper. Pathol. Pharmacol. **227**, 199 (1955). — THILO, E. und W. WIEKER, J. Polymer Sci. **53**, 55 (1961). — Wld Hth Org. techn. Rep. Ser. **281** (1964). — ZIMMERMANN, M., Z. angew. Chem. **55**, 28 (1942).

Anschrift der Verfasser:

Dr. M. FINGERHUT u. a., Physiologisch-Chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität, 6500 Mainz

*Du Centre de Recherches sur la Nutrition, Bellevue
et du Laboratoire de biochimie des Isomères, Paris (France)*

Efficacité biologique des Isomères optiques de la Leucine et de L'isoleucine pour un Lactobacille (*L. arabinosus* 17/5)

Par JEAN ADRIAN et JACQUES NICOLLE

Avec 5 tableaux

(Reçu p. p. le 1 février 1966)

Introduction

A la suite de différents travaux concernant l'activité des antipodes optiques d'acides aminés pour des microorganismes (NICOLLE et coll., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), nous nous proposons de reprendre ce type de recherches en utilisant un lactobacille connu pour son besoin absolu en leucine et isoleucine et qui — pour cette raison — est fréquemment utilisé dans les dosages microbiologiques d'acides aminés: il s'agit de *Lactobacillus arabinosus* 17/5; Les besoins de cette souche sont parfaitement définis dans les conditions du dosage: en absence de leucine ou d'isoleucine la croissance est pratiquement nulle et seul l'isomère L — qui est le plus fréquemment répandu dans le domaine animal ou végétal — peut assurer le développement du microorganisme. L'isomère D est entièrement dépourvu d'activité dans les conditions du dosage microbiologique (ADRIAN et RERAT, 2¹).

¹) C'est à dire à des concentrations de l'ordre de 10 µg par ml de milieu de culture.

Avec une telle souche, l'étude des isomères ou des mélanges d'isomères prendra obligatoirement une signification nutritionnelle qui distinguera ce travail de ceux qui ont été réalisés antérieurement avec des microorganismes capables de synthétiser la leucine ou l'isoleucine selon leurs exigences nutritionnelles et pour lesquels la présence des acides aminés dans le milieu n'avait pas pour but initial d'assurer le développement de la souche.

Ce travail se divise en deux parties

— dans la première, nous comparons l'activité des isomères L et D à celle du racémique ou du mélange « $\frac{1}{2}$ D + $\frac{1}{2}$ L ». Dans ce cas la comparaison entre les 2 antipodes optiques se fait en ne considérant que des doses identiques d'isomères L et D.

— au contraire, dans la seconde partie, nous mesurons l'activité des 2 antipodes en présence l'un de l'autre, mais lorsqu'ils ne sont plus dans un rapport équimoléculaire entre eux.

Conditions expérimentales et Modalités techniques

Le principe de nos essais consiste à mesurer l'activité biologique de l'isoleucine ou de la leucine sous différentes formes¹⁾: isomères L ou D, ou racémique ou mélange « $\frac{1}{2}$ D + $\frac{1}{2}$ L », en nous plaçant dans les conditions du dosage microbiologique des acides aminés, c'est à dire en utilisant *L. arabinosus* qui présente un besoin absolu en ces facteurs.

Composition du milieu de base

<i>Acides aminés sous forme L²⁾:</i>	<i>Quantité par ml de milieu</i>
Arginine, cystine, histidine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine	100 µg de chaque
Alanine, glycocolle, hydroxyproline, norleucine, norvaline, proline, sérine, tyrosine	50 µg de chaque
acides aspartique et glutamique	200 µg de chaque
isoleucine ou leucine	100 µg de chaque
<i>purines:</i>	
adénine, guanine, et uracile	10 µg de chaque
<i>vitamines:</i>	
thiamine	20 mµg
riboflavine, pyridoxine	200 mµg de chaque
acide nicotinique	300 mµg
pantothénate de Ca et acide	
p-a-benzoïque	100 mµg de chaque
acide folique	10 mµg
biotine	0,4 mµg
<i>minéraux:</i>	
phosphates mono- et bipotassiques	0,60 mg de chaque
sulfate de magnésium	0,25 mg
sulfate ferreux et chlorure de sodium	0,02 mg de chaque
<i>énergie:</i>	
glucose	24,5 mg

¹⁾ Nous utiliserons le mot « forme » pour exprimer les isomères L et D, ou associés sous forme de racémique ou de mélanges équimoléculaires d'isomères L et D.

²⁾ Si les acides aminés sont utilisés à l'état de racémique, les doses sont doublées.

Nous rappelons la composition du milieu de base utilisé qui est celui du dosage microbiologique (ADRIAN 1): excepté l'acide aminé dosé il satisfait entièrement les exigences de la souche et peut assurer son plein développement:

Composition du milieu de base

Ce milieu est réparti dans des tubes qui contiennent des quantités variables de différentes formes de leucine ou d'isoleucine, et après stérilisation on ensemence avec *L. arabinosus* et on incube à 34° pendant 50 à 70 heures. A ce moment on mesure la croissance bactérienne par titration de l'acidité totale de 1 ml de culture. Elle est exprimée en ml de soude N/100.

Chaque point expérimental représente la moyenne de 4 ou 8 essais.

Résultats expérimentaux

Ière. Partie – Activité de doses équimoléculaires d'isomère L ou D –

Dans les tableaux n° I et II figure la croissance de *L. arabinosus* en présence de différentes formes de leucine ou isoleucine.

En partant des faibles doses et en allant jusqu'aux plus fortes, à concentration égale, ce sont les isomères L qui manifestent le plus rapidement une activité, suivis de près par les racémiques ou les mélanges « $\frac{1}{2}$ L + $\frac{1}{2}$ D ». La croissance maximale est obtenue avec des concentrations de l'ordre de 100 μ g d'isomère L par ml de culture; il en est sensiblement de même avec les autres formes, exception faite de l'isomère D. Au delà de cette concentration, on assiste à une diminution plus ou moins marquée du développement de la souche, la chute de l'efficacité étant plus nette avec l'isoleucine qu'avec la leucine.

Tableau 1.

Activité propre de différentes formes de leucine pour *Lactobacillus arabinosus*

Quantité de leucine par ml de milieu	Activité pour <i>L. arabinosus</i> ¹⁾			DL Leucine
	L (–) Leucine	D (+) Leucine	$\frac{1}{2}$ L (–) Leucine + $\frac{1}{2}$ D (+) Leucine	
2 m μ g	0	0	0	0
5 "	0	0	0	0
10 "	0	0	0	0
20 "	0	0	0	0
100 "	0,10	0	0	0,30
200 "	0,20	0	0	0,20
500 "	0,50	0	0,20	0,20
1 μ g	1,20	0	0,50	0,70
5 "	7,30	0	2,80	3,60
10 "	11,50	0	7,30	7,40
50 "	17,30	0,20	17,20	17,60
100 "	17,30	0,90	17,10	17,70
1 mg	17,20	1,00	17,20	17,00
5 "	17,10	3,40	16,80	17,10
10 "	16,80	3,60	17,10	17,10
15 "	16,80	7,70	16,90	17,00
20 "	16,70	10,60	16,50	16,80

¹⁾ L'activité propre de la leucine ou de l'isoleucine est exprimée sous la forme suivante:

Croissance totale de la souche (mesurée en ml NaOH N/10) moins croissance de la souche en absence de leucine ou isoleucine (mesurée en ml NaOH N/10).

Tableau 2.

Activité propre de différentes formes d'isoleucine pour *Lactobacillus arabinosus*

Quantité d'isoleucine par ml de milieu	Activité pour <i>L. arabinosus</i> ¹⁾			DL isoleucine
	L (+) isoleucine	D (—) isoleucine	$\frac{1}{2}$ L (+) isoleucine + $\frac{1}{2}$ D (—) isoleucine	
2 μ g	0	0	0	0
5 „	0	0	0	0
10 „	0	0	0	0
20 „	0,10	0	0	0
100 „	0,20	0	0	0
200 „	0,30	0	0	0,20
500 „	0,70	0	0,20	0,60
1 μ g	1,50	0	0,80	1,10
5 „	8,70	0	3,30	4,20
10 „	13,60	0,20	8,40	10,30
50 „	20,30	1,40	18,00	19,80
100 „	20,30	1,50	20,30	20,30
1 mg	20,00	1,70	20,00	20,20
5 „	19,40	7,50	20,40	20,00
10 „	14,80	9,60	19,70	19,80
15 „	4,90	9,70	17,40	19,10
20 „	0,90	10,70	13,90	18,70
25 „	0,70	10,10	8,00	18,20

¹⁾ Voir Tableau 1.

Le comportement des isomères D est assez différent : c'est pratiquement au moment où les doses d'isomère L commencent à devenir inhibitrices pour *L. arabinosus* que celles d'isomères D exercent une activité sur la souche et provoquent un début de croissance. Il faut au minimum 50 μ g d'isomère D pour avoir une action tandis que 0,1 μ g d'isomère L suffisent à provoquer un effet comparable, soit 500 fois moins. Cependant, il n'est pas possible d'atteindre le plein développement de la souche avec les isomères D et lorsqu'on arrive à leur seuil de saturation dans le milieu de culture, *L. arabinosus* n'atteint que sa demi-croissance maximale.

Les acides aminés racémiques présentent quelques petites différences d'activité en comparaison avec les mélanges « $\frac{1}{2}$ L + $\frac{1}{2}$ D » : l'exemple le plus net est observé avec l'isoleucine aux doses très élevées. Dans ces conditions, l'isomère L seul ou en présence d'isomère D, fourni séparément, accuse une nette diminution d'efficacité tandis qu'inclus dans le racémique il assure à *L. arabinosus* une croissance proche de sa valeur maximale.

Il est vraisemblable que ces différences relèvent des propriétés physiques des acides aminés et non de leur activités physiologique. En réalité, étant proches du seuil de saturation de ces aminoacides les différences enregistrées peuvent précisément se rattacher au caractère de solubilité des leucines et isoleucines.

Par ailleurs, les résultats des tableaux n° I et II font ressortir que l'activité d'un racémique ou du mélange « $\frac{1}{2}$ L + $\frac{1}{2}$ D » ne correspond pas *obligatoirement* :

– ni à l'activité de l'isomère L,

— ni à la somme des activités « isomères L/isomère D ».

ceci nous paraît suffisamment important pour que nous l'illustrions avec les exemples ci-dessous :

Quantité d'acide aminé (par ml)	Forme de l'acide aminé	Activité propre avec:	
		Isoleucine	Leucine
10 mg	isomère L	14,8	16,8
10 mg	isomère D	9,6	3,6
		= 24,4	
20 mg	I/1 L + $\frac{1}{2}$ D	13,9	16,5
21 mg	racémique	18,7	16,8
5 g	isomère L	8,7	7,3
5 g	isomère D	0,0	0,0
		= 8,7	
10 g	$\frac{1}{2}$ L + $\frac{1}{2}$ D	8,4	7,3
10 g	racémique	10,3	7,4

Dans le cas de la leucine, l'activité de la fraction L contenue dans le racémique ou le mélange « I/1 L + $\frac{1}{2}$ D » est toujours égale à celle de la même quantité de forme L donnée seule, il n'en est pas de même avec l'isoleucine.

Si la présence de la D isoleucine fournie seule (dans le mélange « $\frac{1}{2}$ L + $\frac{1}{2}$ D ») ne modifie pas grandement l'activité de la forme L, par contre sous forme racémique elle paraît exalter l'activité biologique de l'isomère L dans des proportions allant de 18 à 26 p. 100, c'est à dire que la différence ne peut être imputée à une imprécision matérielle ou à un manque de pureté d'une des formes d'isoleucine. Il faut ajouter que si l'activité de l'isoleucine racémique ne correspond pas à celle de l'isomère L, elle n'est pas davantage comparable à l'activité du mélange « $\frac{1}{2}$ L + 1 + 2 D » ou à la somme des activités de l'isomère L et de l'isomère D réunies.

Ces observations méritent l'attention en ce sens qu'elles vont à l'encontre de la relation maintes fois avancée, aussi bien dans le domaine de la nutrition animale (JACQUOT et VIGNERON 3) que dans celui de l'analyse microbiologique (ADRIAN et RERAT 2):

$$100 \text{ D L} = 50 \text{ L.}$$

2ème. Partie — Rapport « isomère D/isomère L » différent de l'unité

A. Activité des isomères D en présence de faibles quantités d'isomères L

Contrairement aux conditions des essais précédents, dans lesquels la comparaison portait sur des quantités identiques d'isomères L et D, on enregistre dans le tableau n° III l'activité des isomères D à fortes concentrations en présence ou non de traces d'isomères L (2 g par ml). Dans ces essais, le rapport « isomère D/isomère L » varie dans les proportions de 100 à 10.000.

Nous retrouvons une certaine efficacité des isomères D lorsqu'ils sont à très fortes concentrations, mais dans ce cas la présence d'isomères L n'exerce pas une action significative sur l'efficacité de l'isomère D. La L-leucine n'a aucune utilité dans l'efficacité de la D leucine, tandis que la L isoleucine favoriserait légèrement l'utilisation de la D-isoleucine.

Tableau 3
 Activité propre de la D leucine en présence de traces de L leucine

Quantité de D leucine en mg par ml de milieu	Rapport «D/L»	Activité pour <i>L. arabinosus</i> ¹⁾	
		D (+) leucine seule	D (+) leucine + 2 µg de L (-) leucine par ml de milieu
0,2	100	0	0
0,5	250	0	0,10
1,0	500	0,30	0,40
2,0	1000	0,60	0,50
5,0	2500	1,70	1,50
10,0	5000	3,30	2,10

¹⁾ voir Tableau 1.

Activité propre de la D isoleucine en présence de traces de l'isoleucine

Quantité de D isoleucine	Rapport «D/L»	Activité pour <i>L. arabinosus</i> ¹⁾	
		D (-) isoleucine seule	D (-) isoleucine + 2 µg de L (+) isoleucine par ml de milieu
0,4	200	0,70	0,80
1,0	500	1,30	2,20
2,0	1000	1,90	3,30
4,0	2000	4,10	5,10
10,0	5000	5,90	11,40
20,0	10000	12,00	10,80

¹⁾ voir Tableau 1.

En bref, il est permis de conclure que si les isomères D exercent une activité biologique (concentrations élevées) la présence de faibles quantités d'isomères L ne semble pas modifier significativement l'utilisation des formes D.

B. Activité de mélanges d'isomères L et D à faibles et fortes concentrations

Des essais précédents, il ressort que l'activité des isomères en présence les uns des autres semble dépendre des conditions expérimentales. C'est un fait que nous avons voulu mettre pleinement en évidence en choisissant 2 points particuliers: celui où l'activité des isomères L est la plus intense (100 g par ml) et celui où l'isomère D assure le meilleur développement de la souche (20 mg par ml). Nous fournissons les quantités ci-dessus soit sous forme d'isomère L ou d'isomère D ou d'un mélange en parties variables d'isomères L et D.

Les croissances de *L. arabinosus* obtenues dans ces conditions figurent dans les tableaux 4 et 5.

Nous envisagerons d'abord les effets aux doses faibles (Tableau 4) pour lesquelles l'isomère L est particulièrement actif, tandis que le D n'offre qu'une efficacité faible sinon nulle. Dans ce cas, seule l'activité de l'isomère L se manifeste dans les mélange «D + L».

Les faits sont un peu plus complexes si l'on se trouve dans une zone de fortes concentrations (Tableau 5). Dans ce cas, nous retrouvons tout d'abord l'inhibition de la croissance de *L. arabinosus* provoquée par des quantités massives

Tableau 4

Activité des Mélanges d'isomères L et D pour la croissance de *L. arabinosus* (faibles doses)

L (—) leucine		A. Cas de la leucine D (+) leucine		Mélange D + L		
Concentration (μ g/mg)	Activité propre ¹⁾	Concentration (μ g/mg)	Activité propre ¹⁾	Concentration (μ g/mg) forme K	forme D	Activité propre ¹⁾
100	17,0	0	0,20	100	0	16,80
75	17,0	25	0,20	75	25	16,80
50	16,7	50	0,30	50	50	17,00
25	15,2	75	0,30	25	75	15,00
0	0,0	100	0,80	0	100	0,00

L (+) isoleucine		B. Cas de l'isoleucine D (—) isoleucine		Mélange D + L		
Concentration (μ g/ml)	Activité propre ¹⁾	Concentration (μ g/ml)	Activité propre ¹⁾	Concentration (μ g/mg) forme L	forme D	Activité propre ¹⁾
100	18,50	0	0,0	100	0	18,5
75	18,20	25	0,2	75	25	19,1
50	18,70	50	0,3	50	50	18,8
25	15,50	75	0,8	25	75	16,1
0	0	100	0,8	0	100	0,6

¹⁾ Voir Tableau 1.

Tableau 5

Activité des Mélanges d'isomères L et D pour la croissance de *L. arabinosus* (fortes doses)

L (—) leucine		A. Cas de la leucine D (+) leucine		Mélange D + L		
Concentration (mg/ml)	Activité propre ¹⁾	Concentration (mg/ml)	Activité propre ¹⁾	Concentration (mg/ml) forme L	forme D	Activité
20	8,8	0	0	20	0	9,3
15	10,6	5	5,1	15	5	5,0
10	14,3	10	6,2	10	10	4,1
5	17,8	15	4,2	5	15	3,0
0	0	20	2,1	0	20	2,2

L (+) isoleucine		B. Cas de l'isoleucine D (—) isoleucine		Mélange D + L		
Concentration (mg/ml)	Activité propre ¹⁾	Concentration (mg/ml)	Activité propre ¹⁾	Concentration (mg/ml) forme L	forme D	Activité propre ¹⁾
20	2,6	0	0	20	0	2,6
15	10,3	5	7,2	15	5	7,4
10	15,5	10	9,2	10	10	6,9
5	20,1	15	7,1	5	15	5,1
0	0	20,6	4,6	0	20	4,8

¹⁾ Voir Tableau 1.

d'isomères L, le fait étant toujours plus accentué avec l'isoleucine qu'avec la leucine. Avec cette dernière la chute de l'efficacité était à peine ébauchée dans le tableau n° 1 tandis qu'ici (Tableau 5) le fait devient indéniable. C'est pourquoi – dans cet essai – les isomères L présentent une activité d'autant plus forte qu'ils sont à des doses moindres.

Les isomères D fournis séparément ont une activité sensiblement constante quelle que soit la concentration à laquelle ils sont introduits dans le milieu.

Si maintenant on examine l'effet de croissance du mélange d'isomères « L et D », il apparaît que son efficacité est toujours faible et considérablement plus basse que celle de la somme des efficacités des 2 isomères données séparément. Dans ces conditions, bien que l'activité de l'isomère D soit plus faible que celle de l'isomère L, celle du mélange « D + L » résulte uniquement de la présence de l'isomère D; c'est au tour de l'isomère L d'être « masqué » dans le mélange.

On pourrait penser de ces différentes conclusions que lorsque l'un des isomères ne présente pas d'activité ou qu'il entre dans une zone dans laquelle il est plus ou moins nuisible son action disparaît au profit de l'isomère qui est dans sa phase de plus grande activité. Ceci expliquerait pourquoi c'est tantôt la présence de l'isomère D, tantôt celle du L qui « disparaît » dans le mélange.

Bibliographie

1. ADRIAN, J., Cahier n° 4 de l'A.E.C.: aminoacides, peptides, protéines 1960, 121. — 2. ADRIAN, J. et A. RERAT, Cahier Technique du CNERNA n° 1. Les méthodes d'évaluation de la valeur nutritive des protéines, 1958, CNRS édit. — 3. JACQUOT, R. et M. VIGNERON, Cahier n° 2 de l'A.E.C.: Le besoin aëté, 1958, A.E.C. édit. — 4. NICOLLE, J., C. R. Ac. Sci. 229, 252 (1949). — 5. NICOLLE, J., C. R. Ac. Sci. 230, 144 (1950). — 6. NICOLLE, J., Y. JOYEUX, C. R. Ac. Sci. 227, 161 (1948). — 7. NICOLLE, J. et Y. JOYEUX, C. R. Ac. Sci. 227, 1057 (1949). — 8. NICOLLE, J. et J. WALLE, C. R. Ac. Sci. 248, 2255 (1959). — 9. NICOLLE, J. et J. WALLE, C. R. Ac. Sci. 248, 3495 (1959). — 10. NICOLLE, J. et J. WALLE, C. R. Ac. Sci. 251, 3109 (1960).

Adresse des auteurs:

Dr. JEAN ADRIAN, Centre de Recherches sur la Nutrition, C.N.R.S., Bellevue (France) et
JAQUES NICOLLE, Laboratoire de biochimie des Isomères, E.P.H.E., Paris V* (France)

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Basel

Die Fettsäuren der Leberlipide der Ratte bei Inanition

VON GÜNTHER RITZEL UND KARL BERNHARD

Mit 7 Tabellen

(Eingegangen am 1. Dezember 1966)

Es ist altbekannt, daß im Hunger nach Verbrauch des Glycogens die Depotfette einem raschen Abbau unterliegen, sogar eine leichte Ketonurie auftreten kann. Die Organlipide verhalten sich nicht in diesem Sinne, auch nach Hungertod weisen Hirn, Leber, Niere usw. ihre Lipidbestände auf (1). Bei Ratten ließ sich auch bei völligem Nahrungsentzug in Versuchen mit Deuterium noch eine geringe Fettsynthese nachweisen (2).