

SUR LES ACIDES α -AMINO- δ -HYDROXYVALÉRIANIQUE ET γ -AMINO- δ -HYDROXYVALÉRIANIQUE

par

PIERRE JOLLÈS ET CLAUDE FROMAGEOT

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

Nous avons indiqué précédemment¹ l'intérêt, pour l'étude de la structure des protéines, des hydroxy-aminoacides provenant de la réduction de l'un des groupes carboxyliques de l'acide aspartique et de l'acide glutamique. Pour ce dernier en particulier, la nature de telles substances doit permettre de mettre en évidence l'existence éventuelle de liaisons γ -peptidiques dans lesquelles serait engagé l'acide glutamique. Rappelons à ce sujet qu'une tentative de caractérisation de liaisons γ -peptidiques de l'acide glutamique a déjà été faite par HAUROWITZ ET BURSA², mais par une tout autre méthode. Nous avons donné antérieurement quelques indications concernant à un point de vue analogue les acides α -amino- γ -hydroxybutyrique et β -amino- γ -hydroxybutyrique, correspondant tous deux à l'acide aspartique. Dans le présent travail, nous décrivons quelques propriétés des acides α -amino- δ -hydroxyvalérianique et γ -amino- δ -hydroxyvalérianique et, à titre d'exemple, nous appliquons au glutathion les données acquises.

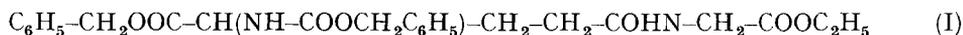
PARTIE EXPÉRIMENTALE

L'acide α -amino- δ -hydroxyvalérianique a déjà été préparé par SÖRENSEN^{3,4} puis plus récemment par PLIENINGER⁵. Nous l'avons synthétisé selon la méthode de SÖRENSEN, à partir de la dibenzoyl-ornithine; nous avons obtenu cette dernière en utilisant les deux méthodes connues: celle de BERGMAN ET ZERVAS⁶ partant du nitrate d'arginine, et celle de SCHOTTEN^{7,8} partant de la benzoylpipéridine. Cette dernière donne un meilleur rendement (20% du rendement théorique calculé à partir de la pipéridine). L'acide α -amino- δ -hydroxyvalérianique synthétisé: p.f. (n. corr.) 218°; N%: calculé 10.52; trouvé 10.28.

L'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique n'avait pas encore été préparé*. Nous l'avons synthétisé à partir d'esters du glutamyl- γ -glycocolle, et ce, par deux voies différentes.

a. *A partir de l'ester α -benzylique du N-carbobenzoxy-glutamyl- γ -glycocolate d'éthyle*

Nous avons obtenu cet ester, non encore préparé jusqu'ici, en utilisant le même procédé que BERGMAN ET ZERVAS^{11,12} et GRASSMAN¹³ ont employé pour la synthèse du dérivé correspondant de l'acide aspartique, mais en partant d'acide glutamique:



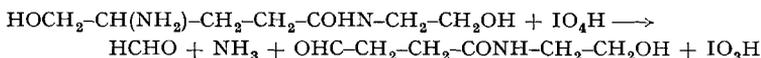
p.f. 108° (n. cor.); N %: calculé 6.14; trouvé 5.96.

* Seuls avaient été obtenus jusqu'ici des acides γ -amino- δ -hydroxy- δ , δ -dialkylvalérianiques^{9,10}, et ce par une réaction de GRIGNARD.

L'ester α -benzylique de l'acide N-carbobenzoxyglutamique et le chlorure d'acide correspondant n'ont été obtenus ici que sous forme d'huiles.

De façon analogue, à ce que nous avons décrit dans le travail précédent concernant le dérivé de l'acide aspartique, l'ester α -benzylique du N-carbobenzoxyglutamyl- γ -glycocolate d'éthyle, réduit par l'hydrure d'aluminium et de lithium, perd le radical carbobenzoxylique et fournit le diol correspondant; ce dernier, par hydrolyse acide, donne d'une part la colamine et d'autre part l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique:

Une quantité de l'ordre de 40 à 190 mg (0.100 à 0.350 mmol.) de (I) est mise en suspension dans 20 ml de N-éthylmorpholine; le tout est additionné de 10 ml de N-éthylmorpholine renfermant 100 mg d'hydrure d'aluminium et de lithium pour 100 mg de (I). L'ensemble est agité pendant un temps et à une température déterminés, sous atmosphère d'azote sec. On décompose par une goutte d'eau l'excès d'hydrure métallique, on filtre et on lave à l'éther le précipité formé, pour éliminer la morpholine. Ce précipité fixe par adsorption la quasi-totalité du diol formé. On prélève une partie aliquote de ce précipité sur laquelle on opère un dosage par l'acide periodique, le diol étant déterminé par l'ammoniac libéré:



Ce dosage est fait de la façon suivante: Le diol ou l'aminoalcool à doser, en quantité telle que l'ammoniac dégagé sous l'action de l'acide periodique soit d'environ 100 μg , est dissous dans 1 ml d'eau distillée. On ajoute ensuite 9 ml d'une solution de CO_3K_2 à 50 % et 1 ml d'une solution de IO_4H 0.2 M; on agite pendant 12 minutes à température ordinaire puis on détruit l'excès de IO_4H par addition de thiosulfate 0.1 M. On distille NH_3 formé selon le procédé habituel, et on le recueille dans HCl 0.01 N.

Remarques

1. Lorsque le dosage est effectué sur le précipité des hydroxydes métalliques contenant le diol, la N-éthylmorpholine susceptible de rester dans ce précipité fausse le dosage; il convient donc de l'éliminer complètement. Pour ce faire, préalablement au dosage, on extrait au soxhlet le précipité en question par de l'éther sec (environ 150 ml), une goutte d'acide sulfurique concentré étant introduite dans le ballon pour fixer la morpholine. Cette extraction dure 24 heures; cette durée ne doit pas être prolongée par suite du risque d'entraînement du diol.

2. Que la quasi-totalité du peptide-diol se trouve fixée par le précipité constitué par les hydroxydes métalliques, ressort des observations suivantes: après traitement du précipité en question par HCl 6 N pendant 24 heures à 110° en tube scellé, puis évaporation de HCl sous vide, dessalification et chromatographie sur papier, on obtient (Tableau II), les taches correspondant à l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique, à la colamine, au glycocolle, et à l'acide glutamique. Quand on effectue les mêmes opérations, mais avec le résidu de la solution de N-éthylmorpholine obtenu après évaporation totale sous vide de ce solvant, on obtient seulement les taches correspondant au glycocolle et à l'acide glutamique.

Nous avons d'abord recherché comment varie le rendement en diol avec les variations de la durée et de la température de la réduction. Le Tableau I donne, avec les détails expérimentaux, les résultats obtenus.

Le meilleur rendement, environ 40%, est obtenu après huit heures d'action à 20°.

La préparation proprement dite de l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique a porté sur 184 mg de (I), traité 5 heures à 70°; le précipité (586 mg) contient 1.41 mg d'azote aminé contigu à un groupe hydroxyle, soit 17.75 mg du diol attendu, ce qui représente 25% du rendement théorique. Sans isoler le diol adsorbé par le précipité, on dissout ce dernier dans 10 ml de HCl 6 N, on hydrolyse le tout et après élimination de l'excès de HCl et dessalification selon la technique habituelle, la solution (A) finalement obtenue, est soumise à diverses chromatographies sur papier Whatman no. 1. Avec les mélanges butanol-acide acétique et phénol-ammoniacal¹, les chromatographies, après révélation par la ninhydrine, montrent l'existence de quatre taches dont les R_F correspondent, pour trois d'entre elles, à ceux de l'acide glutamique, du glycocolle et de la colamine

TABLEAU I

RÉDUCTION DE L'ESTER α -BENZYLIQUE DU N-CARBOBENZOXY- γ -GLYCOCOLLATE D'ÉTHYLE PAR L'HYDRURE D'ALUMINIUM ET DE LITHIUM EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA TEMPÉRATURE

Température °C	Durée (heures)	Diester mis en oeuvre (mmol)	Diol formé (mmol)	Rendement (%)
20	5	0.138	0.029	21.0
20	8	0.169	0.068	40.3
50	2	0.094	0.018	19.0
50	5	0.149	0.035	23.1
50	8	0.358	0.088	24.6
70	2	0.134	0.041	30.6
70	5	0.169	0.041	24.2
70	8	0.364	0.041	11.2

respectivement (Tableau II). Les R_F de la quatrième tache, très voisins de ceux des taches fournies par l'acide α -amino- δ -hydroxyvalérianique dans les mêmes solvants, correspondent, comme on le verra plus bas, à l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique.

b. *A partir de l'ester éthylique du glutamyl- γ -glycocolle d'éthyle*

Nous avons préparé le glutamyl- γ -glycocolle selon la méthode de KING ET KIDD^{14*}. La réduction directe de ce peptide par l'hydrure d'aluminium et de lithium dans la morpholine (8 heures à 70°), n'a donné qu'un rendement dérisoire en diol (de l'ordre de 5%).

Après diverses tentatives d'estérification du dipeptide, soit par le diazométhane, qui n'a donné que des résultats peu satisfaisants, soit par l'alcool absolu et l'acide chlorhydrique N, qui a provoqué l'hydrolyse du peptide, nous avons obtenu des résultats convenables en traitant le peptide par l'alcool absolu en présence de HCl sec à faible concentration: 353 mg de glutamyl- γ -glycocolle sont introduits dans 5 ml d'alcool absolu contenant HCl (sec gazeux) 0.11 N, et le tout est agité pendant une demi-heure à la température ordinaire. On élimine l'alcool sous vide et l'on recommence l'opération. Après dessiccation sur P₂O₅ dans le vide, on obtient un produit huileux sur lequel on opère la réduction. 174 mg de ce produit sont finement émulsifiés dans 10 ml de N-éthylmorpholine contenant 180 mg d'hydrure d'aluminium et de lithium. Le tout est agité pendant 8 heures sous azote sec, à 50°, et on opère comme il a été dit plus haut. Le précipité (648 mg) contient 32.7 mg du diol attendu, soit un rendement de 31%. Après hydrolyse et dessalification, la solution (B) finalement obtenue est chromatographiée sur papier dans les mêmes conditions que la solution (A); les chromatogrammes sont identiques à ceux fournis par cette dernière.

Pour caractériser avec certitude l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique, nous l'avons isolé de la façon suivante: sur une feuille de papier Whatman no. 1, on place les unes à côté des autres 50 prises contenant chacune environ 0.3 mg de la solution (A). On chromatographie en utilisant le phénol ammoniacal; après avoir localisé sur une chromatographie témoin la place exacte occupée par la substance en question, on découpe la feuille de papier et on élue la substance par l'eau. La solution aqueuse obtenue

* Nous avons également éliminé le groupement phtalyle par le procédé de GRASSMANN ET SCHULTE-UEBBING¹⁵, qui nous a donné un meilleur rendement.

est concentrée sous vide à 1 ml environ puis additionnée de 3 ml d'alcool absolu; l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique précipite. On le purifie en le redissolvant dans l'eau et en le précipitant à nouveau par l'alcool. On obtient ainsi finalement 10 mg d'une poudre blanche légère se décomposant au-dessus de 220°. N %: trouvé 10.20; calculé 10.52.

Comparaison entre quelques propriétés de l'acide α -amino- δ -hydroxyvalérianique et de l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique. Distinction entre ces deux acides

1. Chromatographiés sur papier Whatman no. 1, à 20°, avec les mélanges butanol-acide acétique et phénol-ammoniacal, précédemment décrits, les deux acides en question, comme ceux qui dérivent de l'acide aspartique, possèdent des R_F extrêmement voisins (Tableau II). Toutefois, des observations portant sur un très grand nombre d'essais montrent que le R_F de l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique est un peu supérieur à celui de son isomère. Cette différence est toutefois trop faible pour permettre de distinguer les deux substances.

2. Traités par l'acétate de cuivre selon la technique de WIELAND ET FISCHER¹⁶, les deux isomères, comme les dérivés correspondants de l'acide aspartique, forment un complexe avec le cuivre, ce qui rend cette réaction inutilisable pour leur différenciation.

3. Traités par l'acide periodique, seul réagit l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique, d'où la possibilité de distinguer les deux acides. L'expérience est faite dans les conditions qui ont été décrites précédemment¹. Les chromatogrammes obtenus montrent la disparition totale de l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique dans les solutions traitées par l'acide periodique, alors que l'on retrouve la même quantité d'acide α -amino- δ -hydroxyvalérianique dans les solutions traitées par l'acide periodique ou non.

TABLEAU II

R_F SUR PAPIER WHATMAN N° I DANS LE BUTANOL ACÉTIQUE ET DANS LE PHÉNOL AMMONIACAL (20°)

<i>Substance</i>	<i>Butanol acétique</i>	<i>Phénol ammoniacal</i>
Glycocolle	0.06	0.43
Colamine	0.17	0.77
Acide glutamique	0.09	0.25
Ac. α -amino- δ -hydroxyvalérianique	0.14	0.65
Ac. γ -amino- δ -hydroxyvalérianique	0.15	0.67

Application au glutathion

Le fait que les rendements dans la réduction des dipeptides, même estérifiés, ne sont pas quantitatifs, n'empêche pas d'utiliser cette réduction pour la mise en évidence qualitative d'une liaison α ou d'une liaison β ou γ dans un peptide contenant une molécule d'acide aspartique, ou d'acide glutamique. Nous avons appliqué, à titre d'exemple, la méthode de réduction en question au glutathion.

Après diverses tentatives de réduction du glutathion non estérifié, ou du N-carbobenzoxyglutathion non estérifié, tentatives qui n'ont donné aucun résultat convenable, nous avons estérifié les deux fonctions acides du tripeptide. Pour ce faire, et après avoir essayé sans grand succès l'estérification par le diazométhane, nous avons traité du glutathion par l'alcool absolu contenant HCl (sec, gazeux) 0.11 N, à deux reprises successives, selon la technique habituelle. Nous avons obtenu ainsi environ 65 mg, par 100 mg de glutathion traité, d'une poudre fine constituée pour la plus grande partie par le chlorhydrate du diéthylglutathion.

a. Réduction au sein de la N-éthylmorpholine

93 mg du chlorhydrate de diéthylglutathion sont mis en suspension dans 20 ml de N-éthylmorpholine contenant 280 mg d'hydrure d'aluminium et de lithium; l'ensemble est agité pendant six heures à 50° sous atmosphère d'azote sec. Après les opérations décrites plus haut, on obtient un précipité (977 mg) sur une partie aliquote duquel un dosage par l'acide periodique montre une teneur totale en tripeptide-diol de 28.8 mg, soit un rendement de 44% dans la réduction du diester. Une autre partie du précipité est hydrolysée par HCl 6 N, l'hydrolysât est ensuite dessalifié et concentré sous vide selon la technique habituelle. La chromatographie sur papier Whatman no. 1, faite à l'aide de phénol ammoniacal, montre les taches correspondant au glyco-colle, à l'acide glutamique, à la colamine, et à l'un des acides aminohydroxyvalérianiques. En outre, on constate une traînée mal définie due aux produits de décomposition de la cystéine. On fait agir l'acide periodique pendant 10 minutes, dans les conditions habituelles, sur un autre échantillon de la même solution. Après dessalification et concentration, une chromatographie faite dans les conditions qui viennent d'être indiquées, montre la disparition totale et spécifique de la colamine et de l'acide aminohydroxyvalérianique. Il s'agissait donc bien ici de l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique.

b. Réduction au sein du tétrahydrofurane

64 mg du chlorhydrate du diester du glutathion sont mis en suspension dans 10 ml de tétrahydrofurane contenant 100 mg d'hydrure d'aluminium et de lithium. L'ensemble est agité pendant 8 heures à 28° sous atmosphère d'azote sec. Après les opérations habituelles, on obtient un précipité (305 mg); d'autre part le tétrahydrofurane laisse déposer une huile que l'on recueille par décantation (31 mg). Un dosage par l'acide periodique sur ce précipité et sur cette huile montre une teneur en tripeptide-diol respectivement de 8 et de 4 mg, soit ici un rendement d'environ 30% dans la réduction du diester. Le précipité et l'huile, réunis, sont hydrolysés par HCl 6 N, et la solution obtenue est traitée comme ci-dessus. Les chromatographies avant et après action de l'acide periodique, conduisent aux mêmes conclusions que précédemment.

RÉSUMÉ

L'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique a été synthétisé par réduction au moyen d'hydrure d'aluminium et de lithium, soit de l'ester α -benzylique du N-carbobenzoxyglutamyl- γ -glycocolle d'éthyle, soit de l'ester éthylique du glutamyl- γ -glycocolle d'éthyle, et par hydrolyse du diol formé dans l'un ou l'autre cas. Chromatographié sur papier Whatman no. 1 (butanol acétique et phénol ammoniacal), l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique possède sensiblement les mêmes R_F que l'acide α -amino- δ -hydroxyvalérianique; comme ce dernier, il donne un complexe avec le cuivre. Il s'en distingue par sa réaction avec l'acide periodique, auquel l'acide α -amino- δ -hydroxyvalérianique est indifférent.

Le glutathion estérifié en son dérivé diéthyl par l'alcool absolu et HCl à faible concentration fournit par réduction au moyen de l'hydrure d'aluminium et de lithium, en dehors de la colamine et des produits de décomposition de la cystéine, uniquement de l'acide γ -amino- δ -hydroxyvalérianique. Cet exemple montre la possibilité de caractériser qualitativement la nature de la liaison α ou γ par laquelle l'acide glutamique peut être combiné dans un peptide.

SUMMARY

γ -Amino- δ -hydroxyvalerianic acid has been synthesized by the reduction (by means of lithium aluminium hydride) of either α -benzyl ester of ethyl N-carbobenzoxyglutamyl- γ -glycinate or the ethyl ester of ethylglutamyl- γ -glycinate, and by hydrolysis of the diol formed in either case. The

results of paper chromatography on Whatman No. 1 (acetic-acid butanol and ammoniacal phenol) show that γ -amino- δ -hydroxyvalerianic acid possesses the same R_F as α -amino- δ -hydroxyvalerianic acid; like the latter, it forms a complex with copper. It is distinguished by its reaction with periodic acid, to which α -amino- δ -hydroxyvalerianic acid is indifferent. The glutathion, esterified by absolute alcohol and HCl in weak concentration to its diethyl derivative, on reduction by lithium aluminium hydride, gives, besides colamine and the decomposition products of cysteine, γ -amino- δ -hydroxyvalerianic acid uniquely.

This example shows the possibility of characterising qualitatively the nature of the bonding, α or γ by which glutamic acid can be combined in a peptide.

ZUSAMMENFASSUNG

γ -Amino- δ -oxyvaleriansäure wurde durch Reduktion (mit Lithium-Aluminiumhydrid) des α -Benzylesters des (N-Carbobenzoxy- γ -glutamyl)-glycinäthylesters oder des γ -Glutamyl-glycin-diäthylesters, in beiden Fällen gefolgt durch Hydrolyse des gebildeten Diols, hergestellt. Bei der Papierchromatographie auf Whatman No. 1 (essigsäures Butanol und ammoniakalisches Phenol), zeigt die γ -Amino- δ -oxyvaleriansäure beinahe dieselben R_F -Werte wie α -Amino- δ -oxyvaleriansäure; wie letztere bildet sie mit Kupfer eine Komplexverbindung, unterscheidet sich aber von jener durch ihre Reaktion mit Perjodsäure, mit welchem Reagens die α -Amino- δ -oxyvaleriansäure nicht reagiert.

Wird Glutathion mit Hilfe von absolutem Alkohol und HCl in sein Diäthyl-Derivat verwandelt und dann mit LiAlH_4 hydriert, so gibt es, neben Colamin und Zersetzungsprodukten des Cysteins, nur γ -Amino- δ -oxyvaleriansäure. Dieses Beispiel zeigt, dass es möglich ist, die Natur der Bindung, α oder γ , durch welche die Glutaminsäure in einem Peptid gebunden sein kann, qualitativ zu charakterisieren.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. JOLLES ET CL. FROMAGEOT, *Bull. soc. chim.*, 18 (1951) 862.
- ² F. HAUROWITZ ET F. BURSA, *Biochem. J.*, 44 (1949) 509.
- ³ S. P. L. SÖRENSEN, *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 6 (1905) 137.
- ⁴ S. P. L. SÖRENSEN, M. HÖYRUP, ET A. C. ANDERSEN, *Z. physiol. Chem.*, 76 (1911) 52.
- ⁵ H. PLIENINGER, *Chem. Ber.*, 83 (1950) 271.
- ⁶ M. BERGMANN ET L. ZERVAS, *Z. physiol. Chem.*, 152 (1926) 298.
- ⁷ C. SCHOTTEN, *Ber.*, 17 (1884) 2545.
- ⁸ C. SCHOTTEN, *Ber.*, 21 (1888) 2238.
- ⁹ S. KANAO ET S. INAGAWA, *J. Pharm. Soc. Japan*, 48 (1928) 355.
- ¹⁰ S. KANAO, *Bull. Soc. Chim. Japan*, 22 (1949) 4.
- ¹¹ M. BERGMANN ET L. ZERVAS, *Ber.*, 65 (1932) 1192.
- ¹² M. BERGMANN, L. ZERVAS, ET L. SALZMANN, *Ber.*, 66 (1933) 1288.
- ¹³ W. GRASSMANN ET F. SCHNEIDER, *Biochem. Z.*, 273 (1934) 452.
- ¹⁴ F. E. KING ET D. A. A. KIDD, *J. Chem. Soc.*, (1949) 3315.
- ¹⁵ W. GRASSMANN ET E. SCHULTE-UEBBING, *Chem. Ber.*, 83 (1950) 244.
- ¹⁶ T. WIELAND ET E. FISCHER, *Naturwiss.*, 35 (1948) 29.

Reçu le 8 décembre 1951