

ACIDE 2(R)-AMINO-3-BUTENOIQUE (VINYLGLYCINE) DANS LES CARPOPHORES DE *RHODOPHYLLUS NIDOROSUS*

GASTON DARDENNE, JEAN CASIMIR et MICHEL MARLIER

Chimie Organique et Biologique, Faculté des Sciences Agronomique,
5800, Gembloux, Belgique

et

PEDER OLESEN LARSEN

Department of Organic Chemistry, Royal Veterinary and Agricultural University,
DK, 1871 Copenhagen, Denmark

(Received 14 January 1974)

Key Word Index—*Rhodophyllus nidorosus*; Basidiomycète; non-protein amino acid; 2(R)-amino-3-butenoic acid; vinylglycine.

Abstract—2(R)-amino-3-butenoic acid (vinylglycine), the simplest β,γ -unsaturated α -amino acid, has been isolated from the mushroom *Rhodophyllus nidorosus* (Fr.) Quél. The amino acid occurs as partly racemized D-form. The structure has been confirmed by comparison with synthetic material.

Résumé—L'acide 2(R)-amino-3-buténioïque (vinylglycine), le plus simple des acides α aminés β,γ -insaturés, a été isolé du champignon *Rhodophyllus nidorosus* (Fr.) Quél. L'acide aminé est présent sous la forme D, partiellement racémique. La structure a été confirmée par comparaison avec le produit synthétique qui a été récemment accessible.

INTRODUCTION

ENVIRON 20 acides α aminés libres aliphatiques et insaturés ont été découverts dans la nature. Un nombre relativement important de ceux-ci ont été isolés à partir de champignons: l'acide 2(S)-amino-3-méthylènepentanoïque¹ (β -méthylènenorvaline), l'acide 2(S)-amino-3-hydroxyméthyl-3-penténioïque,² l'acide 2(S)-amino-3-formyl-3-penténioïque,² l'acide 2(S)-amino-5-méthyl-4-hexénioïque,³ l'acide 2(S)-amino-4,5-hexadiénioïque,⁴ l'acide 2(S)-amino-3-méthylènehexanoïque⁵ (β -méthylènenorleucine) et l'acide trans-2-amino-5-chloro-4-hexénioïque.⁶ Nous avons identifié dans les carpophores de *Rhodophyllus nidorosus* (Fr.) Quél. l'acide 2(R)-amino-3-buténioïque (vinylglycine). L'acide aminé est à l'origine racémique avec une forte prédominance de l'énanthiomère D. La DL-vinylglycine a été

¹ LEVENBERG, B. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 6009.

² DOYLE, R. R. and LEVENBERG, B. (1968) *Biochemistry* **7**, 2457.

³ DARDENNE, G., CASIMIR, J. et JADOT, J. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1401.

⁴ CHILTON, W. S., TSOU, G., KIRK, L. et BENEDICT, R. G. (1968) *Tetrahedron Letters* 6283.

⁵ VERVER, R. et CASIMIR, J. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2059.

⁶ CHILTON, W. S. et TSOU, G. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2853.

récemment synthétisée et la forme *D* a été isolée par résolution avec de la levure de boulangerie.⁷ Le plus simple des acides α -aminés β,γ -insaturés qui a été décrit comme un intermédiaire dans la conversion enzymatique de l'homosérine en thréonine⁸ et en α -cétobutyrate⁹ n'avait jamais été identifié ni isolé dans la nature.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'examen d'un chromatogramme bidimensionnel sur papier de la fraction acides aminés libres de *R. nidorosus* nous a permis de mettre en évidence une tache de nature indéterminée et se révélant en jaune intense à la ninhydrine. Par chauffage prolongé, cette couleur vire au brun et ensuite au violet. Cette réaction a été décrite comme étant caractéristique des acides α -aminés β,γ -insaturés.¹⁰ Chilton et Tsou⁶ notent que la réaction brune est propre aux acides aminés β,γ et $\gamma\delta$ -insaturés. Ce changement de couleur se remarque cependant aussi dans le cas d'acides aminés $\delta\omega$ -insaturés.³ La substance se situe approximativement à la place de l'acide 4-aminobutyrique (voir Table 1) et elle migre à l'électrophorèse sur papier comme les acides aminés neutres. L'acide aminé a été séparé par chromatographie sur résines échangeuses d'ions (Amberlite CG 120, H⁺ et Dowex 50 W × 8, forme chloropyridine¹¹) et a été recristallisé dans un mélange EtOH-H₂O. La fonction α -NH₂ a été mise en évidence par la méthode de Larsen et Kjaer.¹² Les essais au brome et au permanganate de potassium acid indiquent une insaturation. L'analyse élémentaire est conforme à la formule brute C₄H₇NO₂ et montre que la substance contient une double liaison. Le spectre IR présente des bandes caractéristiques du groupement vinylique¹³ (1412 cm⁻¹, 1290, 990 et 918) ainsi qu'une bande caractéristique de la vibration de valence C=C à 1650 cm⁻¹. L'hydrogénéation catalytique (PtO₂) conduit à l'acide 2-aminobutyrique dont l'identité a été confirmée par chromatographie et par spectrographie IR. Les divers arguments qui précédent nous permettent de proposer la structure COOH-CH(NH₂)-CH=CH₂.

TABLE I. R_{ALANINE} DE LA VINYLGLYCEINE ET D'ACIDES AMINÉS DE RÉFÉRENCE

Acides aminés		R _{Alanine}	
	Solvant 1		Solvant 2
Vinylglycine de synthèse	1.00		1.27
Vinylglycine naturelle	1.00		1.27
Acide 2 aminobutyrique	1.43		1.36
Acide 4 aminobutyrique	1.00		1.29

Solvant 1: *n*-BuOH-HCOOH-H₂O (15:3:2); Solvant 2: Phenol saturé par un tampon à pH 4.2.

La structure a été confirmée par comparaison des spectres IR et NMR de la substance naturelle avec ceux de la *D,L*-vinylglycine. Les spectres sont identiques; en particulier le spectre IR du racémique naturel enrichi en lénantiomère *D* est tout à fait comparable au spectre du racémate de synthèse. La configuration de la vinylglycine naturelle a été déter-

⁷ FRIIS, P., HELBOE, P. et LARSEN, P. O. *Acta Chem. Scand.* Sous presse.

⁸ FLAVIN, M. et SLAUGHTER, C. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 1112.

⁹ POSNER, B. I. et FLAVIN, M. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 6402.

¹⁰ TAGAGI, E., MANGYO, M., SAWAI, M. et ENSAKA, I. (1955) *Bull. Chem. Soc. Japan* **28**, 213.

¹¹ LARSEN, P. O. (1967) *Acta Chem. Scand.* **21**, 1592.

¹² LARSEN, P. O. et KJAER, A. (1960) *Biochem. Biophys. Acta* **38**, 149.

¹³ BELLAMY, L. J. (1960) *The InfraRed Spectra of Complex Molecules*, p. 34. Wiley, New York.

minée par les valeurs du pouvoir rotatoire (voir Table 2) et par dichroïsme circulaire. L'acide aminé a été soumis à des recristallisations successives dans un mélange EtOH-H₂O. Les mesures du pouvoir rotatoire à partir des cristaux et des filtrats nous permettent d'observer une évolution du racémique contenant un léger excès de l'énanthiomère D (45% L-55% D) vers la forme D contenant environ 20% de l'énanthiomère L. Ces différents pourcentages ont été calculés en se basant sur la valeur $[\alpha]_D - 94^\circ$ obtenue pour l'isomère D.⁷ L'acide aminé obtenu lors de la dernière recristallisation a un $\Delta[M] - 16$, ce qui est en concordance avec la règle de Clough-Lutz-Jurgensons.¹⁴ Un effet Cotton négatif a également été observé par la mesure des courbes de dichroïsme circulaire (208 nm dans l'eau et 211 nm dans 0·1 N HCl). La position et le signe des effets Cotton sont identiques avec ceux décrits pour la D-vinylglycine de synthèse.⁷

TABLE 2. EVOLUTION DE $[\alpha]_D$ DANS LA VINYLGLYCINE NATURELLE LORS DE DIFFÉRENTES RECRYSTALLISATIONS

Vinylglycine			
Precipité jaune	Filtrat	Filtrat jaune	Résidu + alcool-eau 1:2
Passage sur charbon		Passage sur charbon	
Résidu + alcool-eau 1:5		Résidu + alcool-eau 1:2	
Cristaux 11 mg	Filtrat	Cristaux 75 mg	Résidu jaune 90 mg
$[\alpha]_D - 6^\circ \text{ c, 0,4 eau}$		$[\alpha]_D - 24^\circ \text{ c, 1 eau}$	$[\alpha]_D - 46^\circ \text{ c, 1 eau}$
Cristaux 48 mg	Résidu 44 mg		
$[\alpha]_D - 22^\circ \text{ c, 0,9 eau}$		Alcool-eau 1:2	
Cristaux 12 mg	Résidu jaune 25 mg		
$[\alpha]_D - 58^\circ \text{ c, 0,6 eau}$			
$-74^\circ \text{ c, 0,3 1 N HCl}$			

Les carpophores de *Rhodophyllum nidorosus* contiennent donc très vraisemblablement à l'origine le racémique avec un excès de l'énanthiomère D. A la lecture des différentes manipulations nécessaires pour obtenir la forme D de la vinylglycine à partir du racémique,⁷ il est presque impossible que le produit naturel aie été racémisé lors des opérations d'isolement. Ce résultat est à mettre en parallèle avec ceux obtenus lors de l'isolement de la DL-(3-carboxyphényl)glycine à partir de bulbes d'*Iris tingitana* et de graines de *Reseda luteola*,¹⁵ de la DL-(3-carboxy-4-hydroxyphényl)glycine enrichie en la forme D à partir de graines de *R. luteola*,¹⁵ de la DL-*trans*-4-hydroxyméthylproline enrichie en la forme D à partir de

¹⁴ GREENSTEIN, J. P. et WINITZ, M. (1961) *Chemistry of the Amino Acids*, p. 85, Wiley, New York.¹⁵ KJAER, A. et LARSEN, P. O. (1963) *Acta Chem. Scand.* **17**, 2397.

graines de *Eriobotrya japonica*¹⁶ et de la 2(S), 3(R), 4(R)-4-hydroxyisoleucine et 2(R), 3(R), 4(R)-4-hydroxyisoleucine isolées à partir de graines de *Trigonella foenum-graecum*.¹⁷ L'isolement de la D-vinylglycine de *Rhodophyllum* renforce aussi les affirmations de Bentley¹⁸ qui écrit "fungi, insects and annelids can occasionally synthetise D-amino acids".

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. *Rhodophyllum (Entoloma) nidorosus* (Fr.) Quélet. Les spécimens récoltés ont été déterminés par le Professeur P. Heinemann. Ils sont parfaitement conforme à la description et à la planche de Lange.¹⁹ Ce champignon, lorsqu'il est fraîchement cueilli, présente une odeur nitreuse. Il provoquerait des méfaits gastro-intestinaux, parfois spectaculaires mais jamais dangereux.²⁰

Isolation de l'acide aminé. Les champignons fraîchement récoltés (1300 g) ont été broyés au Waring Blender avec 6 l. d'éthanol à 95%. L'extrait filtré a été purifié sur une colonne d'Amberlite CG 120, forme H⁺, 100-200 mesh, 2,6 × 20 cm. Après passage de l'extrait alcoolique, la résine a été lavée à l'alcool et à l'eau. Les acides aminés ont été élusés par NH₃ 1 N. L'éluat a été évaporé sous pression réduite à 30°. Le résidu d'acides aminés (2,72 g) a été repris par le minimum d'eau. Les acides aminés ont alors été fractionnés sur une colonne de Dowex 50 W × 8, 200-400 mesh, forme chloropyridine, 1,5 × 78 cm. L'élution a été effectuée par l'eau, le débit étant réglé à 1 ml par minute. L'acide aminé a été décelé à l'état pur dans les fractions 21-47. Ces fractions ont été évaporées à volume réduit, décolorée par le charbon et l'acide aminé a été recristallisé par un mélange EtOH-H₂O (voir Table 2). (C, 45,00; H, 6,94; N, 13,27 calculé pour C₄H₇NO₂ C, 47,52; H, 6,98; N, 13,85%). [α]_D: voir Table 2. IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3098 cm⁻¹ (f/b), 2959 (f/b), 2688 (f/b), 2083 (m), 1647 (f/b), 1623 (f/b), 1587 (f/b), 1520 (f/b), 1425 (f/b), 1391 (f/b), 1342 (f/b), 1282 (f/b), 1160 (m), 1121 (m), 1086 (f/b), 1042 (f/b), 934 (f/b), 794 (f/b). NMR: Le spectre présente deux massifs d'absorption: un doublet à δ = 4,29 avec une surface relative égale à 1 est attribué au groupe méthine du chainon acide aminé; un massif complexe à δ = 6,3-5,3 avec une surface relative égale à 3 est attribué aux trois protons vinyliques.

Hydrogénéation de la vinylglycine. 10 mg de produit dissout dans l'eau ont été hydrogénés en présence de PtO₂ comme catalyseur. Après 30 min, la réduction était complète. Après élimination du catalyseur par filtration, le filtrat a été évaporé à sec. Le résidu a été identifié comme étant l'acide 2 aminobutyrique par chromatographie sur papier. Le spectre IR est identique à celui de l'acide 2 aminobutyrique racémique.

Méthodes d'analyses. La chromatographie descendante sur papier Whatman No. 1 a été réalisée en utilisant comme solvants le mélange *n*-BuOH-HCOOH-H₂O (15:3:2) et le phénol saturé par un tampon à pH 4,2 (acide citrique-Na₂HPO₄, 2 H₂O, 0,08 M). Les spectres NMR ont été enregistrés sur un appareil JEOL C 60 HL. Les valeurs de δ en ppm sont données par rapport au 2,2,3,3-tétradeutéri-3-(triméthysilyl)propionate de sodium. Les mesures du pouvoir rotatoire ont été prises sur un polarimètre Perkin-Elmer Modèle 141. Les courbes de dichroïsme circulaire ont été enregistrées sur un appareil Roussel Jouan Dichrographe CD 185. Nous avons utilisé des cellules de 2 mm et les concentrations en vinylglycine étaient de 0,3 mg/ml.

Remerciements.—Nous tenons à remercier le Professeur Heinemann Gembloux et Mr. Marchal, Couvin pour la récolte et la détermination du champignon. Les courbes de dichroïsme circulaire ont été prises grâce à l'amabilité du Dr. P. Laur, Danish Technical University. Une partie de ce travail a été réalisée à Copenhague par l'un de nous (GD) grâce à une bourse de recherches du Ministère Danois de l'Education en relation avec les Accords Culturels Belgo-Danois.

¹⁶ GRAY, D. O. (1972) *Phytochemistry* **11**, 751.

¹⁷ FOWDEN, L., PRATT, H. M. et SMITH, A. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1707.

¹⁸ BENTLEY, R. (1969) *Molecular Assymetry in Biology*, Vol. 1, Academic Press, New York.

¹⁹ LANGE, J. E. (1938) *Flora Agaricina Danica* 2, p. 97, pl. 75B.

²⁰ HEIM, R. (1963) *Champignons Toxiques et Hallucinogènes*, (BOUÉ, N., ed.), p. 170, Paris.