

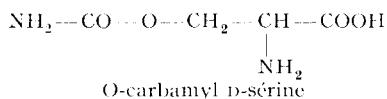
# SUR UN DÉRIVÉ DE LA SÉRINE, LA O-CARBAMYL-D-SÉRINE, PRODUIT PAR UN *STREPTOMYCES*

par

G. HAGEMANN, L. PÉNASSE ET J. TEILLON

*Services de Recherches Roussel-Uclaf, Romainville, Seine (France)*

Au cours d'études effectuées pour isoler un antibiotique présent dans les milieux de culture d'une souche nouvelle de *Streptomyces*, nous avons détecté, par chromatographie sur papier, un composant particulièrement abondant, mais dépourvu d'activité antibiotique. Le fait que ce corps réagisse avec la ninhydrine et forme facilement un complexe cuivrique rendait probable la présence d'un arrangement  $\alpha$ -amino-acide dans sa molécule. Des essais de chromatographie sur papier dans divers solvants ne permirent toutefois pas de l'identifier avec un des acides aminés à notre disposition. Après isolement du composé à l'état cristallisé, nous avons réussi à établir qu'il s'agissait de la O-carbamyl D-sérine, dérivé de la D-sérine non identifié jusqu'ici dans les milieux naturels.



La production, ici décrite, de O-carbamyl D-sérine par un *Streptomyces*, mérite d'être rapprochée de la découverte récente d'un autre dérivé, d'origine également fongique, l'azasérine<sup>5</sup>. Elle paraît devoir souligner l'importance des  $\beta$ -hydroxy  $\alpha$ -amino-acides dans le métabolisme intermédiaire de certains micro-organismes.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

Le *Streptomyces* producteur de la O-carbamyl D-sérine est un microorganisme non décrit jusqu'à présent, isolé d'un sol du Vénézuéla. Il figure dans notre collection de souches sous la référence T 4473 et le nom de *Streptomyces polychromogenus* lui a été attribué, en raison des variations caractéristiques de sa pigmentation.

### *Obtention de la O-carbamyl D-sérine*

Un milieu de culture à base de farine de soja deshuilée (2.6%), dextrine (1.0%), glucose massé (1.0%), sulfate de magnésium à 7 H<sub>2</sub>O (0.3%) et carbonate de calcium (0.2%) estensemencé à l'aide d'un inoculum constitué par des spores de *Streptomyces polychromogenus*, en suspension dans l'eau stérile. La fermentation en culture immergée est poursuivie dans les conditions habituelles de stérilité et d'aération, à 28–30°, pendant cinq jours.

On verse un litre de bouillon filtré sur une colonne de 300 g d'échangeur de cations,

Amberlite IR 120, forme acide. Après lavage par 500 ml d'eau, l'élution est effectuée par 800 ml d'une solution aqueuse de pyridine à 12%. L'éluat renferme le nouveau composé, ainsi que diverses substances neutres ou faiblement basiques. On concentre sous pression réduite à 50 ml environ, puis ajoute 25 ml de méthanol et abandonne pendant 24 heures à 0°. Un précipité cristallin se dépose. Après filtration et lavage au méthanol à 50% on recristallise deux fois dans l'éthanol à 50%. Rendement: environ 1 g. La substance obtenue se présente sous forme de fines aiguilles incolores; F. lente: 226-234° (déc.); F. instantanée: 238° (déc.);  $[\alpha]_D = -19.6^\circ$  ( $c = 2\%$ , acide chlorhydrique N) et  $+2^\circ$  ( $c = 2\%$ , eau). Elle est très soluble dans l'acide chlorhydrique dilué et dans l'eau chaude, soluble dans l'eau froide, très peu soluble dans l'éthanol et le méthanol, insoluble dans l'éther.

*Formol-titration.* La formol-titration<sup>3</sup> effectuée sur 30 mg de substance indique un poids moléculaire de 144 (148 pour la carbamyl-sérine).

*Analyse.*  $C_4H_8O_4N_2 = 148.1$

Calculé:	C % 32.4	H % 5.4	N % 18.9
Trouvé:	32.4	5.5	18.8

Le dosage de l'azote selon VAN SLYKE a fourni, en dix minutes, 9.6% d'azote et en une heure 18.0% d'azote, ce qui correspond respectivement à un et deux atomes d'azote par molécule-gramme.

#### Réactions colorées

avec la ninhydrine	positive
avec les sels cuivriques	positive
avec le réactif de Nessler	négative
avec la benzidine	négative
selon Sakaguchi (guanidines substituées) <sup>2,9</sup>	négative
selon Pauly (imidazole) <sup>11</sup>	négative
selon Barrenschen-Weltmann (urées monosubstituées) <sup>1,8</sup>	positive

*Chromatographie sur papier.* La substance chromatographiée dans les solvants suivants, sur papier Whatman No. 1, ne fournit qu'une seule tache avec la ninhydrine.

Solvants	$R_F$
Phénol-tampon borate, pH 9.3 <sup>6</sup>	0.41
Phénol-tampon phosphate, pH 11.2 <sup>6</sup>	0.27
Pyridine 80, alcool isoamylique 40, eau 70	0.33
Butanol 75, acide formique 15, eau 10	0.08

#### Etablissement de la structure

*Hydrolyse.* L'hydrolyse acide de la substance libre, en quantités stoechiométriques, de la sérine, de l'ammoniac et de l'anhydride carbonique.

(a) 1 g de produit est chauffé à reflux dans 20 ml d'acide chlorhydrique 6 N pendant trois heures et demie. On évapore sous vide, reprend par l'eau et évapore de nouveau. On dissout alors dans 25 ml d'eau et verse sur une colonne renfermant 12 g d'Amberlite IR 120, forme acide. La résine est lavée à l'eau jusqu'à fin d'acidité chlorhydrique, puis

éluée par 120 ml d'ammoniaque 3 *N*. Cet éluat est évaporé à sec sous vide, puis le résidu est recristallisé deux fois en éthanol dilué. Rendement: 0.6 g de grandes aiguilles incolores; F. 229° (déc.);  $[\alpha]_D^{25} = -13.2^\circ$  ( $c = 1\%$ , acide chlorhydrique *N*). FISCHER<sup>1</sup> indique un pouvoir rotatoire voisin pour la D-sérine:  $-14.3^\circ$ .

*Analyse.*  $C_3H_7O_3N = 105.1$

Calculé:	C % 34.3	H % 6.7	O % 45.7	N % 13.3
Trouvé:	34.5	6.8	46.1	13.1

(b) 10 mg de produit sont hydrolysés en tube scellé par 2 ml d'acide chlorhydrique 6 *N*, à 100° pendant 20 heures. Après alcalinisation par le carbonate de sodium, un entraînement à la vapeur permet de titrer, dans le distillat, une substance basique volatile (ammoniac ou amine) représentant 50% de l'azote total.

(c) 100 mg de produit sont soumis à l'hydrolyse par 10 ml d'acide sulfurique 6 *N* à reflux. L'ensemble des gaz entraîné par un courant d'azote, exempt d'acide carbonique, est capté dans 20 ml de soude 2 *N*. Au bout de 4 heures, la solution sodique est transvasée dans une fiole conique, additionnée de 10 ml de chlorure d'ammonium à 10%, portée à l'ébullition, puis additionnée de 10 ml de chlorure de baryum à 10%. Le précipité formé, filtré et lavé à chaud, est alors repris par 10 ml d'acide chlorhydrique *N* dont on titre l'excès par la soude *N*. La valeur trouvée correspond à 0.97 molécule d'anhydride carbonique pour une molécule d'ammoniac libérée par hydrolyse. La sérine, traitée dans ces conditions, ne libère pas d'anhydride carbonique. L'éthyluréthane, par contre, en fournit 0.90 molécule.

*Oxydation périodique.* La formation d'ammoniac par oxydation périodique de la sérine est liée au fait que cette substance présente sur deux carbones voisins un groupe aminé et un groupe hydroxyle libres. Le nouveau composé, soumis à cette oxydation, ne donne pas naissance à de l'ammoniac: il présente donc une substitution sur le  $NH_2$ , ou sur l'OH, ou sur les deux groupements. Par contre, lorsqu'on opère sur un hydrolysate acide, préparé comme ci-dessus et débarrassé des produits basiques volatils par entraînement à la vapeur d'eau, on libère 50% de l'azote total, sous forme d'ammoniac.

*Formation de dérivé 2,4-dinitro phényle.* En procédant selon SANGER<sup>10</sup>, on dissout 100 mg du nouveau composé et 200 mg de carbonate de sodium dans 10 ml d'eau, puis ajoute 150 mg de 2,4-dinitro fluorobenzène dissous dans 50 ml d'éthanol. Après agitation pendant 2 heures, on évapore sous pression réduite, lave à l'éther, puis acidifie par quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Le dérivé dinitrophényle qui précipite aussitôt est recristallisé dans l'alcool dilué et fournit des aiguilles jaunes, F. 166°. Il présente une acidité qui nécessite pour être neutralisée 1 ml de soude *N* pour 310 mg de substance.

*Analyse.*  $C_{10}H_{10}O_8N_4 = 314.2$

Calculé:	C % 38.2	H % 3.2	N % 17.8
Trouvé:	38.0	3.4	17.6

On hydrolyse 20 mg de ce dérivé par 3 ml d'acide chlorhydrique 6 *N* en tube scellé pendant 4 heures à 100°, extrait à l'éther, évapore ce solvant, puis chromatographie sur papier le résidu. Le produit ainsi obtenu est identique au dérivé dinitrophényle de la sérine<sup>7</sup>. Il en résulte que le nouveau composé présente une fonction amine libre et qu'avant hydrolyse le groupe hydroxyle était substitué.

*Bibliographie p. 243.*

Un hydrolysats acide, préparé comme ci-dessus, puis alcalinisé et soumis à un entraînement à la vapeur, permet à nouveau de titrer 1 millimolécule d'ammoniac pour 310 mg de dérivé. Le substituant fixé à l'oxygène n'a donc pas été éliminé au cours de la formation du dérivé dinitrophényle.

*Formation de complexe cuivrique.* On chauffe 100 mg du nouveau composé et 200 mg de carbonate de cuivre fraîchement précipité, dans 10 ml d'eau, au bain-marie. Il apparaît immédiatement une coloration bleue intense. Après filtration et refroidissement, la solution laisse déposer des petits cristaux bleus, F. 257° (déc.).

L'ensemble de ces résultats montre que le nouveau composé est un dérivé O-substitué de la sérine, dans lequel le substituant peut être facilement éliminé par hydrolyse en libérant une molécule d'ammoniac et une molécule d'anhydride carbonique. Ce substituant ne confère pas de propriétés basiques à la molécule et fournit la réaction de Barrenschen-Weltman des urées substituées. Le seul groupe répondant à ces divers caractères est le groupe carbamyle ( $\text{NH}_2\text{—CO—}$ ).

### RÉSUMÉ

Un nouveau dérivé de la sérine, la O-carbamyl D-sérine, a été isolé des milieux de culture d'une souche nouvelle de *Streptomyces*, par adsorption sur Amberlite IR 120 et élution à la pyridine. La structure de ce composé a été établie par l'étude des produits d'hydrolyse, par oxydation périodique, ainsi que par formation du dérivé dinitrophényle et du complexe cuivrique.

### SUMMARY

A serine derivative, O-carbamyl D-serine, has been isolated from culture media of a new *Streptomyces* strain by adsorption on Amberlite IR 120 and elution with pyridine. The structure was established by hydrolysis, periodic acid oxidation and preparation of the dinitrophenyl derivative and the copper complex.

### ZUSAMMENFASSUNG

Aus der Kulturlösung eines neuen *Streptomyces*-Stammes wurde durch Adsorption an Amberlit IR 120 und Elution mit Pyridin ein Serinderivat, O-Carbamyl D-Serin, isoliert. Die Struktur der Verbindung folgt aus der Untersuchung der Hydrolysenprodukte, ferner aus dem Ergebnis der Perjodsäureoxydation sowie der Darstellung des Dinitrophenylderivates und des Kupferkomplexes.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> H. K. BARRENSCHEN ET O. WELTMAN, *Biochem. Z.*, 131 (1922) 591.
- <sup>2</sup> C. DUMAZERT ET R. POGGI, *Bull. soc. chim. biol.*, 21 (1939) 1381.
- <sup>3</sup> M. S. DUNN ET A. LOSHAKOFF, *J. Biol. Chem.*, 113 (1936) 359.
- <sup>4</sup> E. FISCHER ET W. A. JACOBS, *Ber. deut. chem. Ges.*, 39 (1906) 2942.
- <sup>5</sup> S. A. FUSARI, T. H. HASKELL, R. P. FROHARDT ET Q. R. BARTZ, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 2881.
- <sup>6</sup> E. F. MCFARREN, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.
- <sup>7</sup> R. MONIER ET L. PÉNASSE, *Compt. rend.*, 230 (1950) 1176.
- <sup>8</sup> D. M. P. PHILIPPS, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 560.
- <sup>9</sup> J. ROCHE ET M. EYSSERIC-LAFON, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 1437.
- <sup>10</sup> F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- <sup>11</sup> F. SANGER ET H. TUPPY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 463.

Reçu le 10 janvier 1955