

## TRANSAMINATIONS NON-ENZYMATIQUES DU PYRIDOXAL PHOSPHATE ET DU PYRIDOXAMINE PHOSPHATE À TEMPÉRATURE PHYSIOLOGIQUE ET EN PRÉSENCE DE MÉTAUX

JEANNNE CATTANÉO, JACQUES C. SENEZ ET PAULE BEAUMONT

*Centre National de la Recherche Scientifique, C.R.S.I.M., Marseille (France)*

(Reçu le 13 Mars, 1960)

---

### SUMMARY

*Non enzymic transaminations of pyridoxal phosphate and of pyridoxamine phosphate at physiological temperature and in the presence of metals*

Non-enzymic transaminations of pyridoxal phosphate with aminoacids and of pyridoxamine phosphate with ketoacids have been studied at  $+37^{\circ}$ . Copper and other metals strongly catalyze these reactions as well as the intermediary formation of chelates, which have been separated by paper chromatography. The absorption spectra of the isolated chelates and the spectral composition of the light emitted by u.v. fluorescence have been obtained.

Under experimental conditions where initial concentrations of ketoacids or aminoacids are equal to, or one hundred times higher than, the concentrations of pyridoxamine phosphate or pyridoxal phosphate, the chelates formed in the presence of copper at neutral pH are relatively stable. At pH 5.0, however, the reactions tend to proceed further, with partial decomposition of the chelates and non-enzymic transaminations; these are faster and more complete from pyridoxamine phosphate to pyridoxal phosphate than in the reverse direction.

The structure of the intermediary chelates and the influence of the two tautomeric forms, aldimine and cetimine, on their spectrophotometric properties are discussed.

---

### INTRODUCTION

Le présent travail a été entrepris dans le cadre de recherches sur le mécanisme d'action des enzymes à phosphate de pyridoxal et, plus particulièrement, de la 4-aspartique décarboxylase de *Desulfovibrio desulfuricans*<sup>1,2</sup>. Des observations qui seront rapportées ailleurs ont montré, en effet, que la réactivation remarquable de cette décarboxylase bactérienne par de très faibles concentrations de céto-acides est due à un processus non-enzymique de transamination, convertissant une forme inactive du coenzyme en sa forme active, aldéhydique.

Les transaminations non-enzymatiques du pyridoxal, de la pyridoxamine et de

---

Abréviations: PAL, pyridoxal; PALP, phosphate de pyridoxal; PAMP, phosphate de pyridoxamine; AA, amino acides; CA, céto-acides.

leurs dérivés phosphorylés ont d'abord été observées à  $+100^{\circ}$  par SNELL et son groupe<sup>3,4</sup>, qui ont étudié l'action catalytique des métaux sur ces réactions. Par la suite, BLAKLEY<sup>5</sup>, METZLER<sup>6</sup> et MATSUO<sup>7</sup> ont démontré spectrophotométriquement la formation intermédiaire de bases de Schiff et CHRISTENSEN<sup>8</sup> a précisé la structure moléculaire et les propriétés physico-chimiques des complexes formés entre le pyridoxal, les amino acides et les métaux. FASELLA *et al.*<sup>9</sup> ont séparé par chromatographie les complexes métalliques de phosphate de pyridoxal et d'amino acides produits à  $+100^{\circ}$  en milieu aqueux et ont souligné la forte fluorescence de ces composés. Récemment, enfin, KING ET LUCAS<sup>10</sup> ont étudié, en fonction du pH et de l'amino-acide entrant dans leur constitution, la stabilité des bases de Schiff obtenues en présence et en l'absence de métaux.

Les expériences rapportées ici ont eu pour but de déterminer comment et dans quelle mesure les transaminations non-enzymatiques du phosphate de pyridoxal et du phosphate de pyridoxamine s'effectuent dans les conditions physiologiques où la 4-aspartique décarboxylase est activée par les céto-acides, c'est à dire à  $+37^{\circ}$  et à pH 5.0.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### *Spectrophotométrie*

Les spectres d'absorption des mélanges réactionnels ont été relevés avec un spectrophotomètre JOBIN ET YVON, dans des cuves en quartz de 1 cm.

Le spectre de la lumière émise par fluorescence a été enregistré perpendiculairement à un faisceau de lumière de WOOD, par un monochromateur muni d'une chambre photographique, et les intensités relevées sur les clichés avec un microphotomètre enregistreur ont été ramenées à une échelle linéaire en longueur d'onde.

##### *Chromatographie*

Les mélanges réactionnels ont été chromatographiés sur papier Whatman No. 1 (méthode descendante), avec le mélange<sup>11</sup> butanol tertiaire-acide formique à 99 %-eau (70:15:15). Après développement et séchage des chromatogrammes, les amino acides et le PAMP ont été localisés par la ninhydrine et le PALP et les complexes métalliques des bases de Schiff par leur fluorescence à l'u.v.

Les complexes ont été séparés à partir des chromatogrammes par élution à  $+32^{\circ}$  avec du tampon acétate 0.05 M à pH 5.0.

##### *Produits employés*

Le PALP utilisé nous a été gracieusement procuré par le Dr. S. BLAU (Laboratoires Roche), à qui nous exprimons nos vifs remerciements. Le PAMP était un produit commercial de la California Corporation et l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique un produit de la Nutritional Biochemicals Corp. Le pyruvate et les amino acides (L- $\alpha$ -alanine et acide L-glutamique) étaient des produits commerciaux Hoffmann-La Roche.

#### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Dans une série d'expériences préliminaires, l'influence de divers métaux sur les transaminations non-enzymatiques a été étudiée à pH 5.0, avec des mélanges réactionnels contenant du PAMP et une concentration environ 50 fois plus élevée d' $\alpha$ -céto-glutarate. La formation de PALP était estimée par mesure de la densité optique à

388 m $\mu$ , en présence de soude 0.1 *N*, conditions où l'absorption de ce composé est maximum.

Les résultats obtenus (Tableau I) montrent que la réaction ne se produit pas en l'absence de métaux et qu'elle est catalysée sensiblement de la même façon par le fer et par le cuivre. Le zinc et le magnésium sont, par contre, inactifs.

Les spectres relevés dans ces systèmes après 5 h d'incubation à +32° correspondent de façon satisfaisante à celui du PALP libre, caractérisé par ses deux

TABLEAU I

INFLUENCE DE DIVERS MÉTAUX SUR LA TRANSAMINATION ENTRE LE PHOSPHATE DE PYRIDOXAMINE ET L'  $\alpha$ -CÉTO-GLUTARATE

Conditions expérimentales: Systèmes de 4 ml, en tampon acétate 0.1 *M* (pH 5.0) contenant initialement 1.7  $\mu$ moles de PAMP et 75  $\mu$ moles d'  $\alpha$ -céto-glutarate. Densités optiques mesurées à 388 m $\mu$ , en présence de NaOH 0.1 *N*, après 5 h d'incubation des mélanges à +32°.

Additions		$A_s(388 \text{ m}\mu)$
Néant		0.000
Fe <sup>++</sup> (FeSO <sub>4</sub> )	2 · 10 <sup>-3</sup> <i>M</i>	1.600
	2 · 10 <sup>-4</sup> <i>M</i>	0.870
Fe <sup>+++</sup> (FeCl <sub>3</sub> )	2 · 10 <sup>-3</sup> <i>M</i>	1.800
	2 · 10 <sup>-4</sup> <i>M</i>	1.590
Cu <sup>++</sup> (CuSO <sub>4</sub> )	2 · 10 <sup>-3</sup> <i>M</i>	1.800
	2 · 10 <sup>-4</sup> <i>M</i>	1.500
Zn <sup>++</sup> (ZnCl <sub>2</sub> )	2 · 10 <sup>-3</sup> <i>M</i>	0.051
	2 · 10 <sup>-4</sup> <i>M</i>	0.009
Mg <sup>++</sup> (MgSO <sub>4</sub> )	2 · 10 <sup>-3</sup> <i>M</i>	0.005
	2 · 10 <sup>-4</sup> <i>M</i>	0.000

maximums d'absorption à 388 et 330 m $\mu$ . Par contre, lorsque les concentrations des réactifs, ou le pH, sont modifiés, les produits de réaction comportent des proportions, en certains cas importantes, de complexes intermédiaires dont la formation et l'influence sur les spectres ont été étudiés d'une part dans les mélanges de PALP et d'acides aminés et d'autre part dans les mélanges de PAMP et de céto-acides.

#### Réactions entre PALP et acides aminés

METZLER<sup>6</sup> a constaté en l'absence de métaux que le PAL forme avec les acides aminés des bases de Schiff, dont le spectre est caractérisé, à pH neutre ou acide, par un maximum d'absorption situé à 414 m $\mu$  et par un autre, moins accusé, à 280 m $\mu$ . À pH 7.4, ces bases de Schiff se forment en quantités notables lorsque le rapport des concentrations de l'acide aminé et du pyridoxal [AA]/[PAL] est compris entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>3</sup>. En milieu acide et, notamment, à pH 5.0, leur formation est quantitativement minime, même lorsque le rapport [AA]/[PAL] est encore accru.

Des observations similaires ont été faites par MATSUO<sup>7</sup> avec le PALP, à pH 7.5 et en employant des rapports de concentrations du même ordre que ceux de METZLER. Les bases de Schiff formées dans ces conditions ont également deux maxima d'absorption à 400–415 m $\mu$  et à 278 m $\mu$ .

En nous plaçant dans les conditions décrites par ces auteurs nous avons obtenu des résultats entièrement concordants avec les leurs, c'est à dire la formation de bases

de Schiff dont le maximum d'absorption est déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport à celui du PAL et du PALP. Nous avons vérifié, d'autre part, que si le rapport  $[AA]/[PALP]$  est abaissé à 100:1, la formation des bases de Schiff à pH 7.5 se traduit seulement par un déplacement lent et progressif du pic du PALP vers les grandes longueurs d'onde et sa stabilisation, au bout de 4 h environ, à 395 m $\mu$ . A pH 5.0, la modification du spectre est encore plus lente et moins marquée. Enfin, lorsque le rapport  $[AA]/[PALP]$  est équimoléculaire, on ne constate pratiquement aucune modification d'amplitude ni déplacement du pic d'absorption du PALP, qui demeure fixe, à 388 m $\mu$ .

L'addition de cuivre dans les systèmes où le rapport  $[AA]/[PALP]$  est compris entre 100:1 et 1:1, entraîne par contre des modifications spectrales extrêmement accusées, qui correspondent à la formation de complexes intermédiaires et, dans certaines conditions, à la formation de PAMP libre, par transamination. Ces réactions ont été étudiées à pH 5.0 (tampon acétate 0.1 M), en présence d'une concentration fixe de  $CuSO_4$  ( $2 \cdot 10^{-4}$  M). La concentration de PALP, comprise entre 3 et  $4 \cdot 10^{-4}$  M, était déterminée exactement d'après le coefficient moléculaire d'absorption de ce composé à 388 m $\mu$  et à pH 5.0 ( $\epsilon_M = 5,200$ ). L'acide aminé (L- $\alpha$ -alanine ou L-glutamate) était ensuite ajouté à concentration égale ou 100 fois supérieure à celle du PALP. Les mélanges réactionnels étaient incubés à  $+37^\circ$  et leurs spectres relevés à intervalles de temps, entre 260 et 460 m $\mu$ , en prenant comme blanc un mélange témoin contenant tous les réactifs sauf le PALP.

Dans le cas des mélanges équimoléculaires d'alanine et de PALP, on constate (Fig. 1A) un déplacement progressif du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'onde, et sa stabilisation, au bout de 24 h environ, à 357–360 m $\mu$ . Le nouveau pic ne présente pas d'inflexion vers 325 m $\mu$ , ce qui indique qu'il ne s'est pas formé de PAMP. Il correspond à un mélange de PALP restant et d'un complexe intermédiaire, qui a été isolé chromatographiquement comme il sera précisé plus loin.

L'absorption du complexe isolé est maximum à 355 m $\mu$  et négligeable à 410 m $\mu$ , tandis qu'à cette dernière longueur d'onde celle du PALP représente 63.8 % de son maximum. On peut ainsi calculer que la concentration restante du PALP dans le

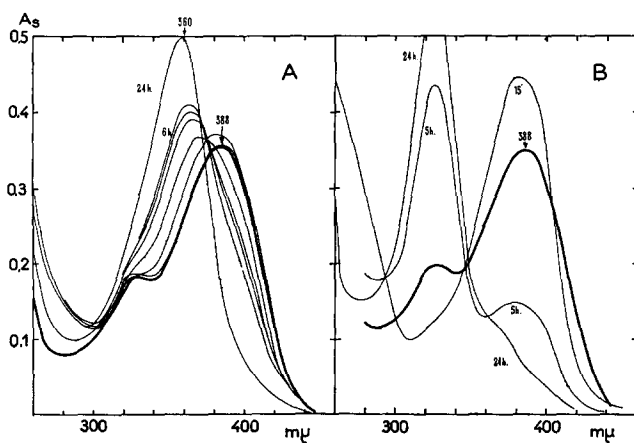


Fig. 1. Spectres d'absorption des mélanges L- $\alpha$ -alanine-PALP- $Cu^{++}$  (pH 5.0; température,  $37^\circ$ ). (A) Alanine et PALP à concentrations équimoléculaires ( $2.7 \cdot 10^{-4}$  M); (B) alanine 100 fois plus concentrée. Les spectres initiaux sont tracés en trait plus épais.

mélange considéré représente 19.5 % de sa concentration initiale. Comme tout le PALP disparu est engagé dans le complexe, il est également possible, en soustrayant de la densité optique à 355  $m\mu$  l'absorption, à cette longueur d'onde, du PALP restant, de déterminer l'absorption propre du complexe et son coefficient moléculaire.

Lorsque la concentration initiale de l'alanine est 100 fois supérieure à celle du PALP (Fig. 1B), le spectre relevé après incubation montre la présence simultanée de PALP, de complexe et de PAMP libre, formé par transamination. Le pic qui culmine vers 380  $m\mu$  et dont l'amplitude décroît en cours d'incubation correspond au mélange du complexe et du PALP restant. La concentration du PALP et l'absorption à 355  $m\mu$  due au complexe peuvent être calculées comme il vient d'être dit, même en présence

TABLEAU II  
COMPOSITION DES MÉLANGES RÉACTIONNELS APRÈS INCUBATION À pH 5.0

Mélanges		Temps de réaction (h)	PALP (%)	PAMP (%)	Complexe (%)	$\epsilon M$ du complexe
			Restant	Formé		
Alanine-PALP	1:1	5	66	0	34	8,987
	1:1	24	19.5	0	80.5	4,000
	100:1	5	20	42.8	37	2,644
	100:1	24	6.8	55.9	37.3	4,241
Glutamate-PALP	1:1	5	92.6	6.2	1.1	—
	1:1	24	68	9.4	22.6	2,681
	100:1	5	53	24.3	22.5	2,600
	100:1	24	11.7	59.8	28.5	1,893
			Formé	Restant		
Pyruvate-PAMP	1:1	4.5	7.3	41.6	46.9	9,560
	100:1	5	88.8	0	11.2	9,750
$\alpha$ -cétoglutarate-PAMP	1:1	4.5	20.6	70	8.4	9,621
	100:1	5	88.9	7	4	10,500

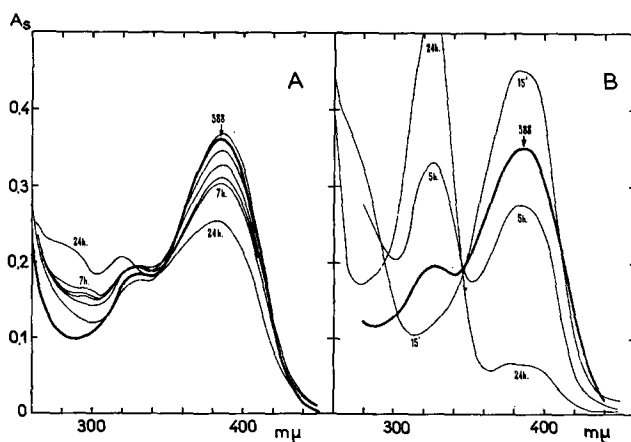


Fig. 2. Spectres d'absorption des mélanges acide L-glutamique-PALP-Cu<sup>++</sup> (pH 5.0; température, 37°). (A) acide glutamique et PALP à concentrations équimoléculaires; (B) acide glutamique 100 fois plus concentré. Les spectres initiaux sont tracés en trait plus épais.

de PAMP, dont l'absorption à  $355\text{ m}\mu$  est nulle. La formation de PAMP libre s'exprime par l'apparition progressive d'un nouveau pic à  $325\text{ m}\mu$  et peut être déterminée quantitativement d'après le coefficient moléculaire du PAMP à pH 5.0 ( $\epsilon_M^{325\text{ m}\mu} = 10,200$ ), après soustraction des absorptions du complexe et du PALP restant à cette longueur d'onde. Par différence, on obtient la concentration du complexe dont on peut ainsi calculer le coefficient moléculaire d'absorption. Les résultats de ces calculs montrent (Tableau II) que la transamination est déjà importante au bout de 5 h et qu'en fin d'expérience la quantité de PAMP libre formée représente environ 50 % du PALP initial. Ils montrent, d'autre part, que la concentration relative du complexe demeure sensiblement constante pendant toute la réaction et représente environ 37 % du PALP initial.

Dans les mélanges où l'alanine est remplacée par l'acide L-glutamique, on relève des modifications spectrales comparables (Fig. 2A et B). Avec cet amino acide le complexe se forme toutefois plus lentement et est moins stable, ce qui se traduit par une transamination moins complète et par une moindre accumulation du complexe intermédiaire en cours de réaction (Tableau II).

La chromatographie sur papier des mélanges réactionnels (Fig. 3) confirme la formation de PAMP libre dans les mélanges  $[\text{AA}]/[\text{PALP}]$  100:1. Elle montre en

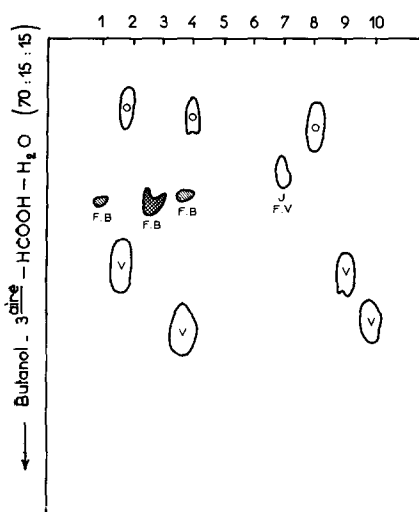


Fig. 3. Chromatographie sur papier des mélanges d'acides aminés et de PALP. Systèmes réactionnels: (1) acide L-glutamique-PALP 1:1; (2) acide L-glutamique-PALP 100:1; (3) L- $\alpha$ -alanine-PALP 1:1; (4) L- $\alpha$ -alanine-PALP 100:1; Témoins: (5)  $\alpha$ -céto-glutarate; (6) PALP à la même concentration que dans les mélanges réactionnels; (7) PALP 10 fois plus concentré; (8) PAMP; (9) acide L-glutamique; (10) L- $\alpha$ -alanine. J: coloration jaune; F.B.: fluorescence bleue; F.V.: fluorescence verte; colorations après révélation par la ninhydrine: O:orange; V:violet.

outre la présence dans tous les systèmes de complexes intermédiaires qui se manifestent par une tache fluorescente à l'u.v. ( $R_F$ , 0.35), nettement séparée des taches du PAMP ( $R_F$ , 0.16) et du PALP ( $R_F$ , 0.29). La fluorescence des complexes a une teinte bleue très différente de la fluorescence verte du PALP. A la concentration où ce dernier se trouve dans les mélanges réactionnels, sa fluorescence est d'ailleurs trop faible pour être détectée sur les chromatogrammes. Les complexes ne se colorent pas par la ninhydrine, ce qui indique que la fonction  $\alpha$ -aminée de l'acide amino participe à la liaison chimique avec le PALP.

Le complexe alanine-cuivre-PALP a été isolé par élution sélective des chromatogrammes. Son spectre d'absorption (Fig. 4) est identique à celui du complexe formé dans la réaction inverse, c'est à dire dans les mélanges de pyruvate, de cuivre et de

PAMP, et comporte un pic unique et symétrique, culminant à  $355\text{ m}\mu$ . La composition spectrale de la lumière émise par fluorescence est représentée sur la Fig. 5.

A pH 7.5, le cuivre catalyse également la formation de complexes, mais ceux-ci sont beaucoup plus stables qu'à pH 5.0 et on ne constate pas de transamination, même dans les mélanges où les rapports  $[\text{AA}]/[\text{PALP}]$  sont de 100:1. On ne constate pas, en

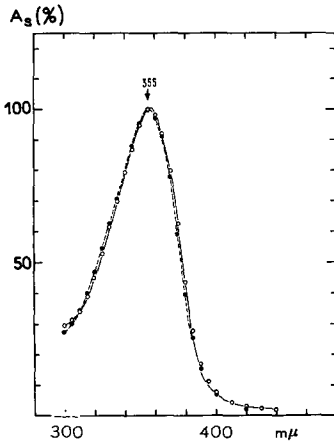


Fig. 4. Spectres d'absorption des complexes isolés par élution des chromatogrammes. —: complexe formé dans un mélange équimoléculaire de pyruvate et de PAMP; ---: complexe formé dans un mélange équimoléculaire d' $\alpha$ -alanine et de PALP.

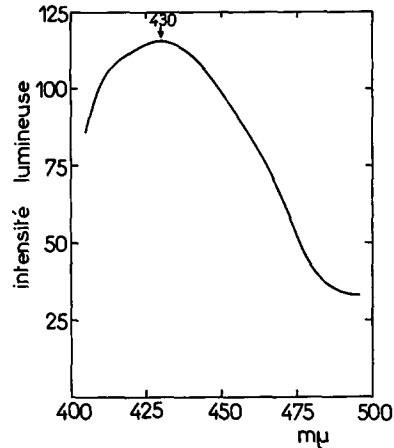


Fig. 5. Spectre de la lumière émise par fluorescence (complexe formé en présence de cuivre dans un mélange équimoléculaire de pyruvate et de PAMP, et séparé par chromatographie). Les intensités lumineuses sont exprimées en unités arbitraires.

effet, l'apparition du pic caractéristique du PAMP libre, à  $325\text{ m}\mu$ , mais seulement un déplacement du pic du PALP vers les courtes longueurs d'onde et l'effacement de son inflexion à  $350\text{ m}\mu$ . Ces modifications sont semblables à celles que MATSUO<sup>7</sup> a relevé à pH neutre et en présence de métaux.

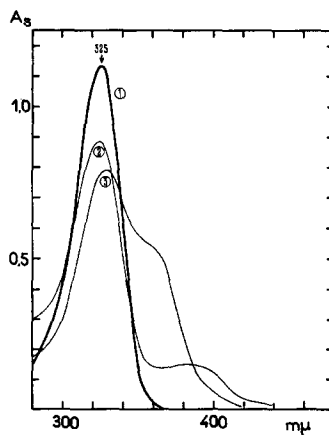


Fig. 6. Spectres d'absorption des mélanges équimoléculaires de céto-acides et de PAMP ( $4.4 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ ) (pH 5.0; température,  $37^\circ$ ; temps de réaction: 4.5 h). (1) spectre initial du PAMP; (2) système contenant l' $\alpha$ -céto-glutarate; (3) système contenant le pyruvate.

### Réactions entre PAMP et céto-acides

Les réactions inverses, entre PAMP et céto-acides (pyruvate et  $\alpha$ -céto-glutarate) ont été étudiées dans des conditions analogues, c'est à dire à  $+37^\circ$  et à pH 5.0, en présence de  $\text{CuSO}_4 \cdot 2 \cdot 10^{-4} M$ . Les concentrations initiales du PAMP étaient comprises entre  $3$  et  $4 \cdot 10^{-4} M$  et déterminées d'après le coefficient moléculaire d'absorption de ce composé à pH 5.0 ( $\epsilon_{325 m\mu}^{325 m\mu} = 10,200$ ).

Dans les mélanges  $[\text{CA}]/[\text{PAMP}]$  1:1, on constate (Fig. 6) la diminution progressive du pic du PAMP, tandis que l'absorption augmente au voisinage de  $360 m\mu$ , dans le cas du pyruvate, et de  $385 m\mu$  dans le cas de l' $\alpha$ -céto-glutarate. La composition des mélanges après 4.5 h d'incubation est rapportée sur le Tableau II. On voit que, dans le cas du pyruvate, les concentrations du PAMP restant et du complexe formé sont sensiblement égales et que la quantité de PALP libre, formée par transamination, est très faible, ne dépassant pas 7 % du PAMP initial. Dans le cas de l' $\alpha$ -céto-glutarate, la quantité de PAMP disparue est moindre (30 %) et le mélange contient relativement peu de complexe mais, par contre, des quantités déjà élevées de PALP libre.

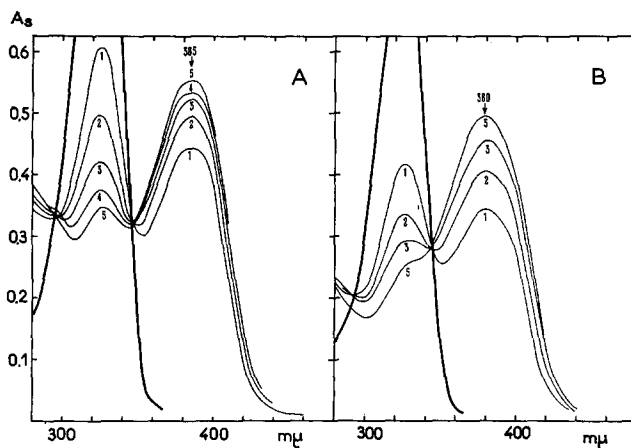


Fig. 7. Spectres d'absorption des mélanges contenant une concentration initiale en céto-acides 100 fois supérieure à la concentration en PAMP (pH 5.0; température,  $37^\circ$ ). (A)  $\alpha$ -céto-glutarate-PAMP; (B) pyruvate-PAMP. Spectres relevés à intervalles d'une heure.

Lorsque le rapport des concentrations  $[\text{CA}]/[\text{PAMP}]$  est de 100:1 (Fig. 7A et B), on observe au bout de 5 h la disparition pratiquement complète du PAMP. La quantité de PALP libre, formé par transamination, est sensiblement la même avec les deux céto-acides, mais dans le cas du pyruvate la concentration finale du complexe est un peu plus élevée, ce qui se traduit par le déplacement du pic du PALP vers  $380 m\mu$ .

Ces observations montrent qu'en présence de cuivre et à pH 5.0, les transaminations non-enzymatiques sont plus rapides et plus complètes dans le sens  $\text{PAMP} \rightarrow \text{PALP}$  que dans le sens inverse. Elles confirment, d'autre part, que les complexes métalliques formés sont plus stables avec le pyruvate ou l'alanine qu'avec l' $\alpha$ -céto-glutarate ou l'acide glutamique.

Les chromatogrammes des systèmes PAMP-CA (Fig. 8) montrent que les complexes intermédiaires ont la même mobilité que ceux formés dans les mélanges PALP-AA.

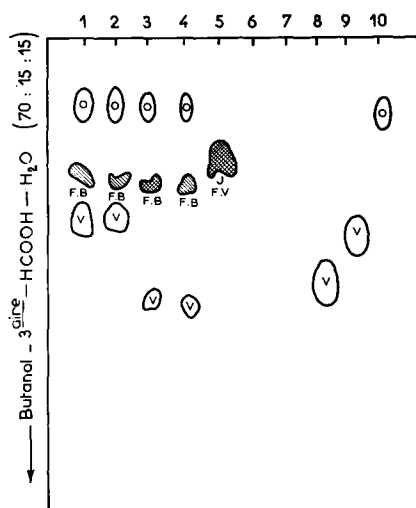


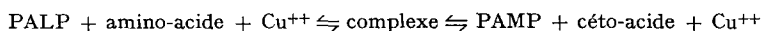
Fig. 8. Chromatographie sur papier des mélanges de céto-acides et de PAMP. Systèmes réactionnels: (1)  $\alpha$ -céto-glutarate-PAMP 10:1; (2)  $\alpha$ -céto-glutarate-PAMP 100:1; (3) pyruvate-PAMP 10:1; (4) pyruvate-PAMP 100:1; Témoins: (5) PALP concentré; (6)  $\alpha$ -céto-glutarate; (7) pyruvate; (8) L- $\alpha$ -alanine; (9) acide L-glutamique; (10) PAMP. J: coloration jaune; F.B.: fluorescence bleue; F.V.: fluorescence verte; colorations après révélation par la ninhydrine: O: orange; V: violet.

### Coefficients d'absorption moléculaire des complexes

Les coefficients moléculaires d'absorption des complexes ont été déterminés, par la méthode indiquée, dans tous les mélanges réactionnels. On constate (Tableau II) que leurs valeurs numériques présentent des variations considérables et que, d'une manière générale, elles sont beaucoup plus élevées dans les mélanges où la transamination est quantitativement importante et s'opère dans le sens PAMP  $\rightarrow$  PALP que dans le sens inverse, ou lorsque se forme un complexe sans transamination concomitante. La signification de ces faits sera discutée plus loin.

### DISCUSSION

Nos observations apportent des données nouvelles sur les transaminations non-enzymatiques des dérivés phosphorylés de la vitamine B<sub>6</sub>. Elles montrent, en particulier, qu'en présence de Cu<sup>++</sup> et d'autres métaux, ces transaminations s'effectuent non seulement à +100°, comme l'ont constaté METZLER ET SNELL<sup>3</sup>, mais encore à des températures physiologiques, et qu'à pH 5.0 elles atteignent des rendements élevés, même lorsque les rapports initiaux de concentrations [AA]/[PALP] et [CA]/[PAMP] sont faibles. D'autre part, elles confirment et complètent les observations antérieures sur la formation intermédiaire de complexes dans ces réactions, qui peuvent être représentées par le schéma général:



FASELLA *et al.*<sup>9</sup> ont étudié les complexes formés à +100° et à pH 7.0 entre le PALP, les amino acides et les métaux et les ont séparés chromatographiquement. Ils ont constaté que ces complexes, comme ceux que nous avons obtenus, ont une forte fluorescence bleue et ne se colorent pas par la ninhydrine, ce qui indique que leur structure comporte une liaison imine dans laquelle le groupement -NH<sub>2</sub> de l'acide est engagé. Cependant, ces auteurs ont constaté au lieu d'un complexe unique deux composés ayant des mobilités chromatographiques différentes et ont relevé, pour celui de ces composés dont ils ont pu étudier le spectre, un maximum d'absorption

situé vers 330 m $\mu$ . Ces divergences avec nos résultats s'expliquent vraisemblablement par le fait qu'à +100°, il se produit une hydrolyse partielle du PAMP, du PALP et des complexes eux-mêmes.

Les bases de Schiff formées par METZLER<sup>6</sup> et par MATSUO<sup>7</sup> avec le PAL ou le PALP et les amino acides en l'absence de métaux et à température ordinaire présentent, à pH neutre ou acide, deux maximums d'absorption situés à 280 et à 414 m $\mu$ . D'après METZLER ce dernier maximum, fortement déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au pic du PAL et du PALP, est dû à une liaison hydrogène entre le groupement 3-hydroxyle du PAL et l'atome d'azote de la base de Schiff. Une première preuve à l'appui de cette interprétation est que les salicyl-aldimines présentent également un maximum d'absorption à 410 m $\mu$ , mais que la méthylation de la fonction phénolique ramène à 370 m $\mu$  le spectre des imines correspondantes. Un autre argument est qu'en milieu très alcalin, où l'hydroxyle du PAL est fortement ionisé et ne peut contracter une liaison hydrogène, les bases de Schiff ont un maximum d'absorption unique et situé non plus à 414 m $\mu$  mais à 360 m $\mu$ .

Ces considérations conduisent à attribuer aux complexes que nous avons obtenus, et dont le maximum d'absorption est situé à 355 m $\mu$ , la configuration proposée par LONGENECKER ET SNELL<sup>12</sup> et par CHRISTENSEN<sup>8</sup>, c'est à dire une structure dans laquelle le cuivre est combiné avec les deux hydroxyles du noyau pyridine et de l'acide amino, ce qui a pour effet d'empêcher l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle de la pyridine et l'azote de l'imine. Les deux formes tautomères aldimine (I) et cétimine (II) d'un tel complexe et l'ordre de leurs interconversions au cours des transaminations sont représentées sur la Fig. 9.

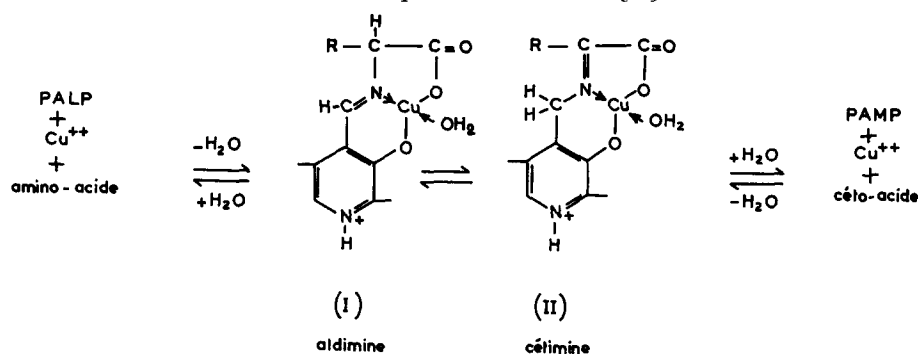


Fig. 9. Structure des complexes intermédiaires. Pour la clarté de la figure, on a omis de représenter sur le cycle pyridine les substituants 2-méthyle et 5-hydroxy-méthyle phosphate.

En règle générale, la condition structurale nécessaire pour que les dérivés de la vitamine B<sub>6</sub> aient un maximum d'absorption situé entre 330 et 390 m $\mu$  est l'existence de deux doubles liaisons conjuguées, l'une sur le carbone substitué en position 4 et l'autre sur le cycle pyridine<sup>13</sup>. En ce qui concerne les complexes, cette condition n'est réalisée que par la structure aldimine et, de ce fait, il est probable que l'absorption à 355 m $\mu$  est exclusivement due à cette forme. Dans le cadre de cette hypothèse, les coefficients moléculaires d'absorption qui ont été déterminés expérimentalement (Tableau II) dépendent de l'équilibre entre les deux formes tautomères des complexes et de leurs concentrations relatives, ce qui explique leurs variations suivant les conditions expérimentales.

On doit s'attendre à ce que la forme prédominante du complexe soit, dans un mélange donné, celle qui précède immédiatement les produits finaux de la réaction. Les faits observés concordent avec cette prévision. Ils montrent, en effet, que le coefficient moléculaire d'absorption, et corrélativement la proportion relative de la forme aldimine, sont plus élevés lorsque la transamination s'effectue dans le sens PAMP  $\rightarrow$  PALP que dans le sens inverse.

Les complexes isolés chromatographiquement à partir des mélanges réactionnels où les concentrations initiales des réactifs sont équimoléculaires ont exactement le même spectre d'absorption (Fig. 4), qu'il s'agisse des systèmes amino-acide-PALP ou des systèmes céto-acide-PAMP. Cette observation montre que, comme dans le cas des dérivés non-phosphorylés de la vitamine B<sub>6</sub> (voir réf. 14), la forme stable des complexes est la structure aldimine. La plus grande stabilité de cette dernière forme concorde également avec le fait que le coefficient d'absorption du complexe est relativement élevé dans les mélanges équimoléculaires d'alanine et de PALP, mélange où le complexe se forme en l'absence de toute transamination.

### RÉSUMÉ

Les transaminations non-enzymatiques du phosphate de pyridoxal avec les amino-acides et du PAMP avec les céto-acides ont été étudiées à  $+37^{\circ}$ . Le cuivre et d'autres métaux catalysent activement ces réactions et la formation intermédiaire de complexes qui ont été isolés par chromatographie sur papier. Les spectres d'absorption des complexes isolés et la composition spectrale de la lumière qu'ils émettent par fluorescence dans l'ultra-violet ont été relevés.

Dans les conditions expérimentales employées, c'est à dire lorsque les concentrations initiales du céto-acide ou de l'acide-amino sont égales ou 100 fois supérieures à celles du phosphate de pyridoxamine ou du phosphate de pyridoxal, les complexes formés en présence de cuivre et à pH neutre sont relativement stables. En milieu acide, par contre, les réactions tendent à se poursuivre et la décomposition partielle des complexes aboutit à des transaminations non-enzymatiques, qui sont plus rapides et plus complètes dans le sens phosphate de pyridoxamine  $\rightarrow$  phosphate de pyridoxal qu'en sens inverse.

La structure des complexes intermédiaires et l'influence de leurs deux formes tautomères aldimine et cétimine sur leurs propriétés spectrophotométriques sont discutées.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. C. SENEZ ET J. CATTANÉO-LACOMBE, *Compt. rend.*, 242 (1956) 943.
- <sup>2</sup> J. CATTANÉO-LACOMBE, J. C. SENEZ ET P. BEAUMONT, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 458.
- <sup>3</sup> J. C. RABINOWITZ ET E. E. SNELL, *J. Biol. Chem.*, 169 (1947) 643.
- <sup>4</sup> D. E. METZLER ET E. E. SNELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 979.
- <sup>5</sup> R. L. BLAKLEY, *Biochem. J.*, 61 (1955) 315.
- <sup>6</sup> D. E. METZLER, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 485.
- <sup>7</sup> Y. MATSUO, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 2011 et 2016.
- <sup>8</sup> H. N. CHRISTENSEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 4073.
- <sup>9</sup> P. FASELLA, H. LIS ET N. SILIPRANDI, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 417.
- <sup>10</sup> H. K. KING ET N. LUCAS, *Biochem. J.*, 72 (1959) 18 P.
- <sup>11</sup> R. J. BLOCK ET D. BOLLING, *The amino-acid composition of proteins and foods*, Analytical methods and results, 2nd ed., C. C. Thomas, Springfield, Illinois, 1951.
- <sup>12</sup> J. B. LONGENECKER ET E. E. SNELL, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 42 (1956) 221.
- <sup>13</sup> D. E. METZLER ET E. E. SNELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 2431.
- <sup>14</sup> G. L. EICHORN ET J. W. DAWES, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 5663.