

- [21] A. Nickon & J. F. Bagli, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 6330 (1959); *idem*, *ibid.* **83**, 1498 (1961); G. O. Schenck, K. Gollnick, G. Buchwald, S. Schröter & G. Ohloff, *Liebigs Ann. Chem.* **674**, 93 (1964); K. Gollnick & G. O. Schenck, *Pure appl. Chemistry* **9**, 507 (1964).
- [22] H. Pauling, D. A. Andrews & N. C. Hindley, *Helv.* **59**, 1233 (1976).
- [23] L. Horner, H. Hoffmann, H. G. Wippel & G. Klahre, *Chem. Ber.* **92**, 2499 (1959); W. S. Wadsworth jr. & W. D. Emmons, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 1833 (1961); W. S. Wadsworth, *Org. React.* **25**, 73 (1977).
- [24] W. Dimroth, *Chem. Ber.* **71**, 1333 (1938).
- [25] H. Bohnsack, *Chem. Ber.* **74**, 1583 (1941).
- [26] B. M. Mitzner, V. J. Mancini & S. Lemberg, *Canad. J. Chemistry* **44**, 2103 (1966); R. Heilmann & R. Glenat, *Bull. Soc. chim. France* **1955**, 1586.
- [27] K. Kappeler, D. Stauffacher, A. Eschenmoser & H. Schinz, *Helv.* **37**, 937 (1954).
- [28] C. S. Foote, M. T. Wuesthoff, S. Wexler, J. G. Burstain, R. Jenny, G. O. Schenck & K. H. Schulte-Elte, *Tetrahedron* **23**, 2583 (1967).
- [29] G. O. Schenck & E. Koch, *Z. Elektrochem.* **64**, 178 (1960).
- [30] L. Horner & W. Jurgeleit, *Liebigs Ann. Chem.* **591**, 138 (1955).
- [31] A. Perron, M. Mazer & S. Piekarski, *Bull. Soc. chim. France* **1976**, 2006.

84. Influence de l'imidazole, de quelques sels métalliques et de mélanges imidazole/sel métallique sur des réactions de condensation «prébiotiques» induites par les polyphosphates en milieu aqueux

par Joseph Rabinowitz et Aioub Hampai¹⁾

Centre universitaire d'écologie humaine et des sciences de l'environnement, Université de Genève,
CH-1211 Genève 4

(6.III.79)

Influence of imidazole, metal salts and mixtures of imidazole/metal salt on 'prebiotic' condensation reactions induced by polyphosphates in aqueous solution

Summary

In the presence of imidazole, aqueous solutions 0.1M in glycine and 0.1M in sodium trimetaphosphate, at pH 8.0-8.6 and room temperature, yield after 14 days up to 3% of triglycine. Addition of Cd^{2+} or Zn^{2+} decreases the yields, while Mg^{2+} increases them slightly.

The significance of the systems trimetaphosphate/imidazole and trimetaphosphate/imidazole/magnesium salt in the promotion of 'prebiotic' condensation reactions in aqueous solutions, especially the condensation of amino acids, is discussed.

Partant de l'hypothèse que les phosphates ont dû jouer un rôle important au cours de l'évolution chimique prébiologique, nous avons utilisé, avec un certain succès, l'énergie libre provenant de l'hydrolyse des liaisons P-O-P de polyphosphates minéraux linéaires ou cycliques, pour promouvoir la condensation

¹⁾ Laboratoire central de chimie clinique, division de pédiatrie, Hôpital cantonal, Genève.

d'acides aminés en milieu aqueux dans des conditions telles qu'elles auraient pu exister sur la terre primitive [1]. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le trimétaphosphate, et les rendements les plus bas, avec le pyrophosphate, ce que l'on pourrait expliquer par la différence importante de l'énergie libre d'hydrolyse de ces deux produits. En effet, l'énergie libre (standard) libérée par hydrolyse d'un groupement P–O–P de l'ATP



est de 7,3 kcal mol⁻¹ alors que pour le trimétaphosphate (ouverture du cycle par hydrolyse enzymatique) et pour le pyrophosphate ces énergies libres sont d'environ 7,0 et 3,2 kcal mol⁻¹ respectivement [2].

Toutefois, cette réaction qui peut donner jusqu'à 40% de dipeptide ne fournit que des quantités minimales (0,1 à 0,3%) de tripeptide. Pour promouvoir la formation de produits de condensation supérieure, nous avons ajouté à notre système aqueux de trimétaphosphate + glycine maintenu à pH 8,0–9,0, un catalyseur de transfert des groupements phosphate et acyle tel que l'imidazole [3], ce qui s'est traduit dans cette rangée de pH par une augmentation considérable du rendement en tripeptide (3 à 4% au lieu de 0,1 à 0,3% en absence d'imidazole) [4]. Ce phénomène ne s'est pas produit à pH 10,3–10,7, ce qui nous paraît compatible avec l'hypothèse formulée par nous que le glycyl-l-imidazole serait un des produits intermédiaires de la réaction [5]. En effet, le glycyl-l-imidazole donne dans H₂O

Tableau. Formation de diglycine et de triglycine à partir de solutions aqueuses 0,1M en glycine et 0,1M en trimétaphosphate de Na, additionnées ou non d'imidazole, de MgCl₂, d'imidazole/MgCl₂, de CdCl₂, d'imidazole/CdCl₂, de ZnCl₂ ou d'imidazole/ZnCl₂, à pH 8,1–8,6 (7,1–8,6 dans le cas de MgCl₂), après 14 jours à 20°. Après réaction, les solutions sont gardées à 4° (17 jours) jusqu'au moment de leur analyse

Additions	pH		Rendement en % par rapport à la glycine initiale		
	Rangée	A l'analyse	Diglycine	Triglycine	Glycinamide
–	8,1–8,6 ^a	8,17	9,4	traces (~0,1)	2,0
Imidazole 0,3M	8,4–8,6 ^a	8,35	12,1	1,4	1,6
Imidazole 1M	8,5–8,6 ^a	8,53	16,3	2,5	1,6 ^b)
Imidazole ^c)	8,5–8,6 ^c	8,51	18,2	2,7	–
MgCl ₂ 0,1M ^d)	7,1–8,6 ^a	8,06	10,8	traces (~0,2)	1,4
Imidazole 0,3M + MgCl ₂ 0,1M ^d)	8,4–8,6 ^a	8,40	15,6	2,4	2,6 ^b)
CdCl ₂ 0,1M ^e)	8,2–8,6 ^a	8,47	5,9	–	1,2
Imidazole 0,3M + CdCl ₂ 0,1M ^e)	8,4–8,6 ^a	8,44	9,7	0,7	2,8
ZnCl ₂ 0,1M ^e)	8,4–8,6 ^a	8,51	1,1	–	1,1
Imidazole 0,3M + ZnCl ₂ 0,1M ^e)	8,2–8,6 ^a	8,42	10,4	0,7	3,4 ^b)

a) Le pH est amené au début à 8,6 avec des solutions conc. de NH₃ ou de HCl et ajusté durant la réaction à 20° chaque jour à cette valeur avec la solution conc. de NH₃; le chiffre de gauche représente le pH minimum mesuré au cours de cette période.

b) En outre, traces de diglycinamide.

c) Comme sous a) sauf qu'on utilise une solution conc. d'imidazole au lieu de la solution conc. de NH₃; au début de la réaction la solution est ~0,25M en imidazole, à la fin elle est ~1,2M.

d) Apparition d'un précipité de plus en plus abondant de phosphate ammoniac-magnésien au cours de la réaction.

e) Formation d'un précipité dès le début de la réaction.

un maximum de tri- et poly-glycines dans la rangée de pH 6 à 9 uniquement [6], ce qui présente un intérêt particulier en chimie prébiotique (pH présumé des océans autour de 8 env.).

Il nous a paru encore intéressant d'examiner l'influence de certains ions métalliques sur notre système glycine/trimétaphosphate/imidazole en milieu aqueux, particulièrement celle de Mg^{2+} - qui catalyse la synthèse d'aminoacyladénylates (intermédiaires dans la biosynthèse du lien peptidique) ainsi que l'hydrolyse des liaisons anhydride phosphorique (P-O-P) - comparée à celle de Cd^{2+} (métal toxique) et Zn^{2+} . A cet effet, nous avons préparé des solutions aqueuses à la fois 0,1M en glycine, trimétaphosphate et chlorure du métal d'une part, et des solutions identiques mais additionnées d'imidazole (0,3M) d'autre part. A titre de comparaison, nous avons préparé une solution de glycine et de trimétaphosphate ainsi que des solutions de glycine/trimétaphosphate additionnées de diverses quantités d'imidazole (v. *Tableau*). Ces solutions sont amenées à pH 8,6 avec des solutions conc. de NH_3 ou de HCl et on ajuste tous les jours le pH à 8,6 avec la solution concentrée de NH_3 . Dans un cas, nous avons amené le pH à 8,6 avec une solution aqueuse concentrée d'imidazole et ajusté le pH tous les jours avec ce même réactif. Après 14 jours de réaction à température ordinaire (20°), les solutions sont refroidies à 4° (blocage de la réaction) et gardées à cette température jusqu'au moment de leur analyse. Dans chaque solution, nous avons recherché et dosé par chromatographie sur colonne (analyseur d'acides aminés) la diglycine, la triglycine, le glycinamide et le diglycinamide (v. *Tableau*). Cette méthode ne permet pas d'identifier la tétraglycine éventuellement présente en petite quantité car son pic est confondu avec celui de la diglycine. Evidemment, il n'y a pas de formation d'amides lorsque les corrections de pH se font avec de l'imidazole au lieu d'ammoniac. Notons tout de suite, que dans le cas de la réaction en présence de Mg^{2+} il se forme un précipité de phosphate ammoniaco-magnésien au fur et à mesure du progrès de la réaction, alors que dans le cas du Cd^{2+} et du Zn^{2+} des précipités apparaissent dès le début de la réaction (probablement les hydroxydes correspondants).

On remarque à nouveau que la triglycine ne se forme en quantité appréciable qu'en présence d'imidazole; en même temps, ce dernier joue le rôle de tampon et les écarts journaliers du pH au cours de la réaction sont faibles. Avec l'augmentation de la concentration en imidazole, les rendements en peptides augmentent.

L'influence des métaux examinés sur ces réactions paraît plus complexe. Le zinc et le cadmium diminuent nettement les rendements en peptides, cette diminution étant moins importante en présence d'imidazole. Par contre, le magnésium ne perturbe nullement cette réaction et semble même l'améliorer quelque peu dans la rangée de pH 8,0-8,6. Ceci est d'autant plus intéressant que Mg^{2+} est un catalyseur de la transformation des polyphosphates linéaires (à partir du pentaphosphate) en trimétaphosphate (cyclique) en milieu aqueux [7], ce dernier polyphosphate cyclique donnant les meilleurs rendements dans cette réaction de condensation d'acides aminés. Si Mg^{2+} , Zn^{2+} ou Cd^{2+} ne sont pas des catalyseurs beaucoup plus actifs que Na^+ dans la scission hydrolytique du cycle trimétaphosphorique, Mg^{2+} est un catalyseur environ 4 fois plus actif que Na^+ dans

ladite transformation de polyphosphates linéaires en trimétaphosphate en milieu aqueux.

D'un point de vue de l'évolution chimique prébiologique, le système polyphosphate (trimétaphosphate)/imidazole/ions magnésium dans la rangée de pH 7,0-9,0, nous apparaît comme particulièrement intéressant pour des réactions de condensation en milieu aqueux, notamment d'acides aminés en peptides.

Les auteurs remercient le Prof. P. Moeschler (Université de Genève) ainsi que le Dr J. Vogel (chimiste cantonal, Genève) de leur appui et le Prof. E. Cherbuliez (Université de Genève) de son intérêt pour ce travail.

Partie expérimentale

1. *Produits de départ et de référence*: obtenus dans le commerce. Le trimétaphosphate de Na (pureté environ 98%) nous a été fourni gracieusement par *Monsanto Chemical Company* (St. Louis, Missouri).

2. *Analyses chromatographiques de glycine, diglycine, triglycine, glycinamide et diglycinamide*: effectuées à l'aide d'un analyseur d'acides aminés «*Chromaspeak Rank Hilger*» à intégrateur automatique, gradient de pH 2,2-11,3 environ. On dilue 50 fois une partie aliquote de l'échantillon avec un tampon à pH 2,1 et analyse 150 μ l de la solution obtenue. Au préalable l'appareil est calibré avec des quantités connues des 5 composants dosés. Avec cet appareil, l'analyse programmée pour du mélange des acides aminés naturels dure environ 6 h. Dans notre cas, nous avons mis au point un programme d'environ 2 h; dans ces conditions les temps d'élution en min sont resp.: glycine 40,3; diglycine 56,2; triglycine 58,5; glycinamide 76,3; diglycinamide 78,5; ammoniacque 93,4.

3. *Effets de l'addition de $MgCl_2$, $MgCl_2$ /imidazole, $CdCl_2$, $CdCl_2$ /imidazole, $ZnCl_2$ ou $ZnCl_2$ /imidazole respectivement sur la condensation de la glycine dans des solutions aqueuses de trimétaphosphate*. On prépare une solution contenant 6,12 g de trimétaphosphate de sodium et 1,50 g de glycine dans 200 ml d'eau (0,1M en chacune des composantes) et la divise en dix parties de 20 ml chacune. On dissout dans une de ces solutions 0,408 g et dans une autre 1,360 g d'imidazole (ces deux solutions seront en plus 0,3 resp. 1M en imidazole). Trois autres solutions sont additionnées de 0,190 g de $MgCl_2$, de 0,403 g de $CdCl_2 \cdot H_2O$ ou de 0,273 g de $ZnCl_2$ respectivement et elles deviendront 0,1M aussi en ces sels respectifs; trois autres solutions déjà 0,1M en $MgCl_2$, $CdCl_2$ et $ZnCl_2$ respectivement sont additionnées de 0,408 g d'imidazole et elles seront en plus 0,3M en imidazole. Une solution sans additions nous servira de référence et une autre sera (v. plus loin) additionnée d'imidazole uniquement. Chaque solution est amenée à pH 8,6 (électrode de verre) avec une solution conc. de NH_3 ou de HCl , sauf la dernière où cette opération est faite avec une solution aqueuse concentrée d'imidazole (la solution ajustée devient $\sim 0,25$ M en imidazole). On laisse reposer ces solutions à température ordinaire (20°) et mesure le pH deux fois par jour pendant les 4 premiers jours et le ramène à pH 8,6 avec une solution conc. de NH_3 sauf dans le dernier essai où on corrige le pH avec de l'imidazole. Pendant les 10 jours suivants, on mesure et corrige le pH une fois par jour seulement. Ensuite, on place les solutions à 4° jusqu'au moment de leur analyse (17 jours) par la méthode décrite sous 2.

Les rendements (v. *Tableau*) rapportés à la glycine initiale constituent des minimums; en effet, pour des motifs de comparaison toutes les réactions sont arrêtées, par refroidissement à 4°, au bout de 14 jours à température ordinaire; à ce moment elles sont nettement ralenties mais non terminées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. Rabinowitz, *Chimia* 26, 350 (1972).
- [2] E. Thilo, *Adv. inorg. Chemistry & Radiochemistry* 4, 1 (1962).
- [3] A. L. Weber & J. C. Lacey, jr., *J. mol. Evolution* 6, 309 (1975); T. A. Cooper, W. S. Brinigar & J. H. Wang, *J. biol. Chemistry* 243, 5854 (1968).
- [4] J. Rabinowitz & A. Hampai, *Helv.* 61, 1842 (1978).
- [5] J. Rabinowitz & A. Hampai, *Chimia* 32, 465 (1978).
- [6] A. L. Weber & J. C. Lacey, jr., *Biochim. biophys. Acta* 349, 226 (1974).
- [7] F. M. Harold, *Bact. Rev.* 30, 772 (1966).