

This article was downloaded by:
On: 30 January 2011
Access details: Access Details: Free Access
Publisher Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713618290>

MODELES DE BIOTINE ACTIVEE PAR PHOSPHORYLATION TRANSFERT DE PHOSPHORYLE

G. Etemad-moghadam^a; C. Blonski^a; M. B. Gasc^a; J. J. Perie^a; A. Klaebe^a

^a UER-PCA, bat. II R₁, Université P. Sabatier, Toulouse cedex

To cite this Article Etemad-moghadam, G. , Blonski, C. , Gasc, M. B. , Perie, J. J. and Klaebe, A.(1983) 'MODELES DE BIOTINE ACTIVEE PAR PHOSPHORYLATION TRANSFERT DE PHOSPHORYLE', Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 14: 3, 367 — 375

To link to this Article: DOI: 10.1080/03086648308073269

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/03086648308073269>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

MODELES DE BIOTINE ACTIVEE PAR PHOSPHORYLATION TRANSFERT DE PHOSPHORYLE

G. ETEMAD-MOGHADAM,* C. BLONSKI,[†] M. B. GASC,[†]
J. J. PERIE,[†] A. KLAEBE[‡]

UER-PCA, bat. II R₁, Université P. Sabatier, 31062 Toulouse cedex

(Received September 24, 1982)

This work describes the synthesis of the first two O-phosphobiotin models, which mimic the activated form of biotin through a phosphorylation process. In addition, pyrophosphate bond formation is considered through this kind of O-phosphorylated intermediate. Reversible interconversion of the S- and N-phosphorylated urea structures is depicted and implications of the activation process are presented.

Les résultats décrits ici sont en relation avec l'intérêt que nous portons aux réactions biochimiques activées par phosphorylation, en particulier toutes celles réalisées par couplage avec la transformation d'une molécule d'adénosine triphosphate.

Plusieurs étapes du cycle de l'urée (voie catabolique de l'azote chez de nombreux êtres vivants) offrent des exemples de telles situations:

- l'étape ornithine → citrulline réalisée par introduction d'un groupe carbamyl activé sous forme de carbamylphosphate,
- l'étape citrulline → arginosuccinate, dont l'intermédiaire est vraisemblablement une forme O-phosphorylée d'urée.¹

Le motif urée O-phosphorylée est également invoqué comme intermédiaire activé des réactions de carboxylation enzymatiques dans lesquelles la fixation et le transport de carbonate est assuré par le coenzyme biotine dont la partie active est une urée cyclique considérée plus réactif dans la forme O-phosphorylée.²

Nous présentons les recherches menées sur ce dernier point, en vue de tester sur des réactions modèles la réactivité de structures O-phosphorylées de carbamates et d'urées, l'hypothèse d'activation par O-phosphorylation n'ayant pu être confirmée jusqu'ici dans le cas de la biotine faute de disposer de substrats adaptés.

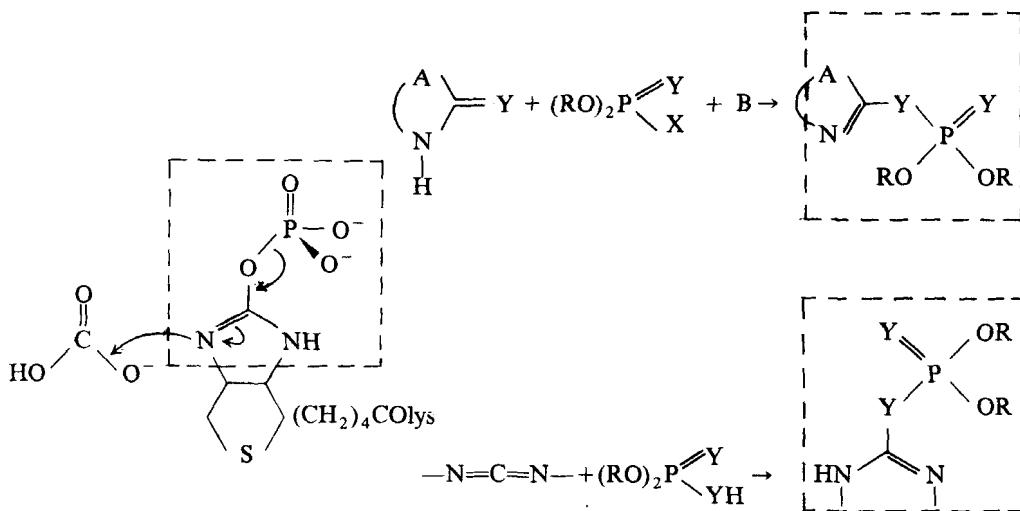
Deux approches ont été considérées:

- la phosphorylation directe de différents substrats présentant les motifs urée, carbamate ou apparentés: thiouréido et thiocarbamate,
- la synthèse de formes phosphorylées activées par réaction d'esters phosphoriques et thiophosphoriques sur des carbodiimides, l'intermédiaire de cette addition s'apparentant également à la structure O-phosphobiotine comme indiqué sur le Schéma 1.

*ERA CNRS no. 316.

[†]ERA CNRS no. 264.

[‡]ERA CNRS no. 926.



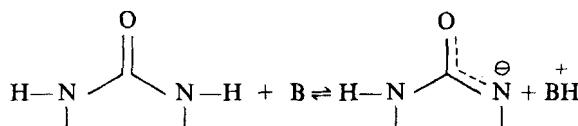
SCHEMA 1 Deux voies d'accès au motif "O-Phosphobiotine"

A. REACTIONS DE PHOSPHORYLATION DE SUBSTRATS DE TYPE CARBAMATE ET UREE

Les résultats de la littérature relatifs à la phosphorylation de structures de ce type portant plusieurs sites nucléophiles sont assez contradictoires, les produits décrits étant selon les cas des structures O- ou N-phosphorylées.^{3,4} Nous avons repris cette question avec une variété de substrats (Schéma 2), et en modifiant également la structure de l'agent phosphorylant.

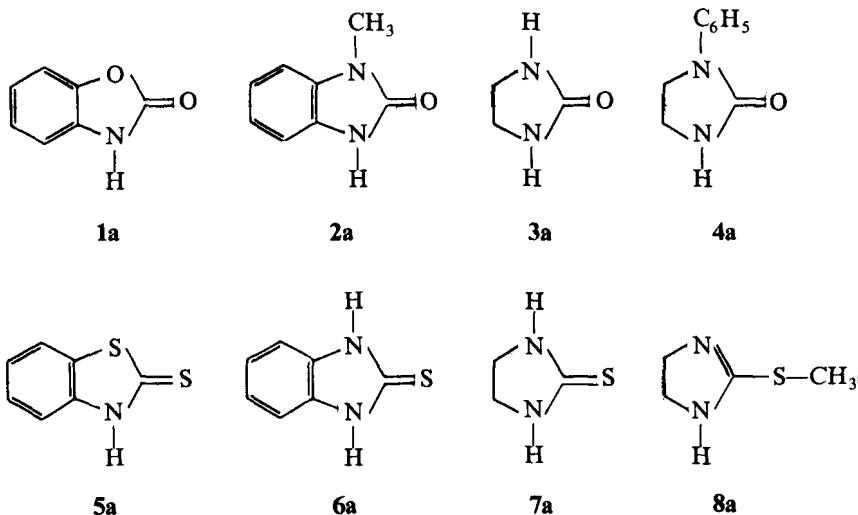
Les principaux résultats sont les suivants:

—une base forte (Et_3N , NaH) est nécessaire pour que la réaction de phosphorylation de tels substrats ait lieu, le rôle de cette base étant de transformer le substrat en anion plus réactif, selon la réaction:

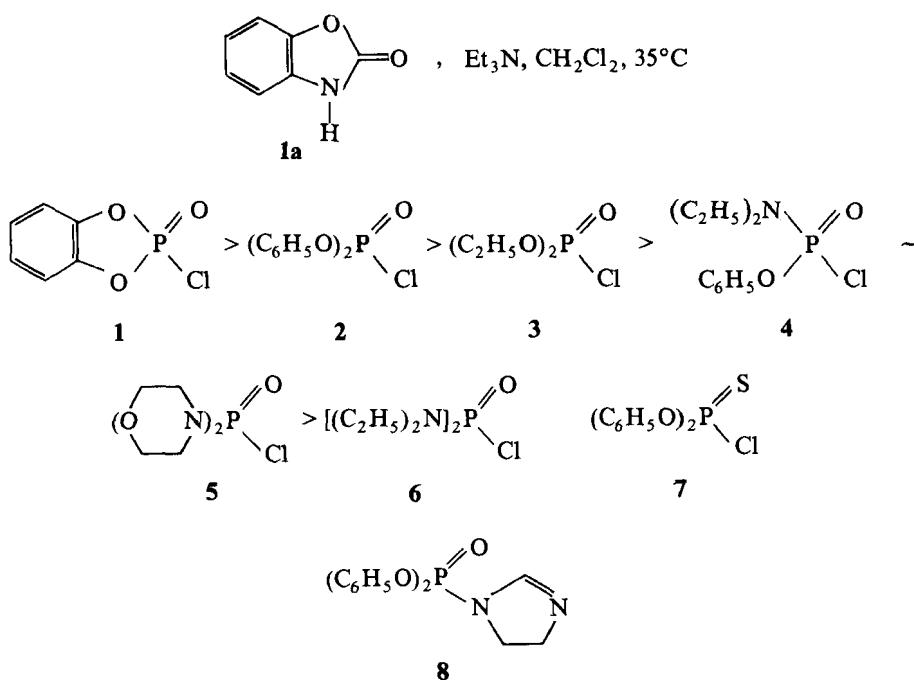


—dans le cas des substrats oxygénés, le produit de réaction est un dérivé N-phosphorylé; la réaction suivie en R.M.N. du phosphore ^{31}P ne permet pas de mettre en évidence une forme O-phosphorylée, même à basse température; la forme N-phosphorylée doit vraisemblablement résulter du réarrangement d'une structure O-phosphorylée intermédiaire, la réactivité de la forme énolate étant plus élevée que celle de forme amidure:

—les agents de phosphorylation étudiés ont des réactivités très différentes pour cette réaction mais conduisent dans tous les cas au même produit N-phosphorylé; la séquence de leurs réactivités relatives est indiquée dans le Schéma 2. Cette réactivité semble dépendre de la présence de groupements aryloxy liés au phosphore, la



réactifs de phosphorylation

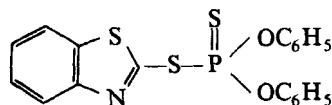


SCHEMA 2 Substrats et réactifs de phosphorylation.

présence d'un groupement donneur d'électrons comme un amino diminuant au contraire cette réactivité. Ceci peut s'interpréter par le rôle de ces substituants dans la stabilisation de la structure de l'anion pentacoordiné intermédiaire dont la formation doit donc être considérée comme étant l'étape lente;

—le remplacement des atomes d'oxygène des substrats par des atomes de soufre a permis de caractériser le produit cinétique S-phosphorylé (Tableau I); l'utilisation d'un agent de phosphorylation lui-même porteur d'un atome de soufre a rendu possible la synthèse et l'isolement du premier analogue de structure de type "O-phosphobiotine".⁵

La détermination de la structure de ce composé:



par diffraction de rayons X, fournit un élément d'explication de la stabilité de cette structure intermédiaire: la distance à travers l'espace entre atomes d'azote et de phosphore bien plus grande dans le cas du produit soufré par rapport à l'analogue oxygéné rend défavorable la migration du groupement phosphate du soufre à l'azote. Aucun produit N-phosphorylé n'est d'ailleurs caractérisé dans ce cas.

—Une dernière particularité intéressante de ces réactions doit être signalée en ce qui concerne la phosphorylation des substrats oxygénés: la formation d'un taux élevé de pyrophosphate y compris dans les cas où des conditions anhydres sont

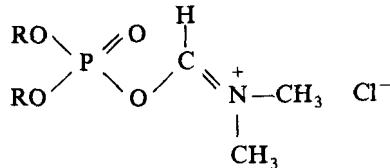
TABLEAU I

substrats		1a	avancement %		avancement %	
			(δ ³¹ P/ppm)	CNP	COP	CNP
$2(\phi O)_2 P \begin{array}{l} \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \end{array} Cl$	45 mn	60	0	—	—	—
	2 jours	(-17,3)	—	—	46 (-17,0)	8 (+9,5)
$7(\phi O)_2 P \begin{array}{l} \diagup \\ \text{S} \\ \diagdown \end{array} Cl$	45 mn	5	0	—	—	—
	2 jours	(+46,2) 87	0	0	38 (+75,4)	—

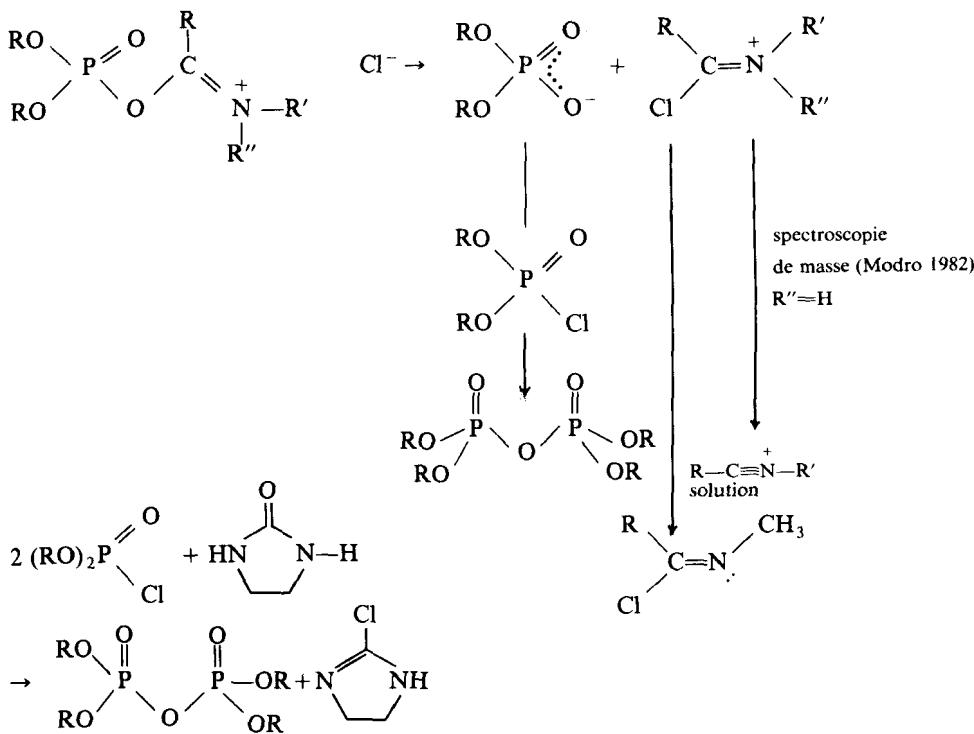
Solvant CH_2Cl_2 , base: Et_3N , 35°C. Les réactifs sont en proportions stoechiométriques. CNP: substrat N-phosphorylé; COP: substrat O-phosphorylé; CSP: substrat S-phosphorylé

réalisées et donc où l'hydrolyse même partielle de l'agent phosphorylant ne peut être envisagée.

Cette réaction est d'une part à relier au fait que le solvant lui-même est susceptible de réagir avec l'agent phosphorylant pour donner un phosphate de formamidium de structure,



déjà décrit dans la littérature⁶ et qui peut réagir sur lui-même selon le schéma:



SCHEMA 3 Formation de liaison pyrophosphate par l'intermédiaire d'un dérivé phosphorylé d'amide ou d'imidazolidone.

Ce mécanisme est suggéré par une observation faite par Modro *et al.*⁷ selon laquelle l'étude en spectrographie de masse d'amides phosphorylées donne comme principaux fragments le pyrophosphate et l'ion nitrilium $\text{R}-\text{C}^+=\text{N}-\text{R}'$;

—le fait d'observer instantanément la formation presque quantitative de pyrophosphate lorsque la réaction est faite en présence d'imidazolidinone (Tableau II)

TABLEAU II

Phosphorylation des substrat **1a** et **3a** par le chlorodiphényl phosphate

substrat	temps (mn)	% de produit N-phosphorylé ($\delta^{31}\text{P} = -17,3 \text{ ppm}$)	% de pyrophosphate ($\delta^{31}\text{P} = -25,7 \text{ ppm}$)
sans	7	—	39
1a 	7	40	40
3a 	4	0	95

Solvant: DMF, base Et_3N , 35°C , agent de phosphorylation: diphénylchlorophosphate, les réactifs sont en proportions stoechiométriques.

indique que l'intermédiaire O-phosphorylé de ce composé doit se comporter comme un excellent agent de transfert de groupement phosphate selon un schéma très comparable à celui proposé plus haut dans le cas du DMF.

Cette observation est par ailleurs à rapprocher d'une synthèse enzymatique d'ATP décrite par Guchait,⁸ synthèse réalisée à partir d'ADP et d'un donneur de phosphate et catalysée par un enzyme à biotine; le coenzyme doit agir dans ce cas de façon tout à fait comparable à la formation de pyrophosphate catalysée par l'imidazolidinone décrite ici, c'est-à-dire par un intermédiaire O-phosphorylé.

B. REACTION D'ADDITION DES THIOESTERS PHOSPHORIQUES AVEC LE DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE (DCCD)

Une autre approche pour accéder à des analogues "O-phosphobiotine" correspond à la 2ème réaction du Schéma 1; on sait que le produit intermédiaire de cette réaction n'est pas isolable dans le cas des esters phosphoriques oxygénés, les produits de la réaction étant le pyrophosphate (ou le nucléotide) et l'urée.⁹ Par contre sur la base des résultats obtenus dans la 1ère partie de ce travail, on pouvait espérer avoir une situation plus favorable avec les esters thiophosphoriques.

Nous avons réussi à isoler par cette réaction les deux produits N- et S-phosphorylés, le motif dicyclohexyl de l'amine étant requis (d'autres carbodiimides tels que di-paratolyl- et N-isopropyl N'-paranitrophényl n'ont pas donné de résultats satisfaisants); d'autre part la transformation du produit S- en N-phosphorylé ainsi que la formation de pyrothiophosphate sont ralenties ou supprimées en utilisant des esters thiophosphoriques porteurs de substituants dialkyl 2-6 phénoxy, créant un encombrement autour de l'atome de phosphore.¹⁰

La réaction du DCCD sur l'ester thiophosphorique $(\text{RO})_2\text{P(S)SH}$ avec R = 2,6-diméthylphényl en présence d'acide tétrafluoroborique a permis d'isoler un autre

analogue de "O-phosphobiotine", sous forme de tétrafluoroborate d'isothiouronium, dont la structure a été établie par diffraction de rayons X.¹⁰ La même réaction réalisée en milieu neutre conduit à la formation du produit N-phosphorylé que nous avons également isolé et caractérisé.

Le fait de disposer de ces deux dérivés rendait envisageable, l'étude de leur interconversion éventuelle, la détermination du produit thermodynamiquement le plus stable ainsi qu'une meilleure connaissance de la réactivité de ces structures S- et N-phosphorylées. Dans ce but, nous avons étudié les réactions de ces composés et en avons déterminé les paramètres cinétiques.

L'analyse des produits a été faite par spectroscopie (RMN ^{31}P , IR) et analyse élémentaire, la cinétique étant suivie en UV à 20° dans le dichlorométhane à partir de la disparition ou de l'apparition de la forme N-phosphorylé (280 nm).

Les différentes transformations réalisées sont illustrées sur le Schéma 4.

A partir du dérivé N-phosphorylé CNP

La mise en solution du composé CNP isolé—suivie par RMN de ^{31}P —provoque l'apparition de la forme S-phosphorylée (CSP). La spectroscopie UV permet par technique de mélange rapide de déterminer les constantes de vitesse et d'équilibre de cette transformation.

L'importance de ce premier résultat est de mettre en évidence l'interconversion entre les deux formes et non plus la seule transformation du S- en N-phosphorylé comme supposé précédemment.

Une seconde partie a consisté en l'étude de la catalyse acido-basique sur cet équilibre, l'action d'une base étant d'une part nécessaire au "déblocage" de la structure isothiouronium CSP^+ , d'autre part en raison de l'intérêt d'un contrôle par acide ou par base de cette réaction, selon un processus s'apparentant à une bio-régulation:

—l'action d'un acide sur le composé CNP provoque un déplacement vers la forme CSP^+ plus stable, l'étape contrôlant la vitesse étant l'isomérisation entre les deux formes CNP et CSP;

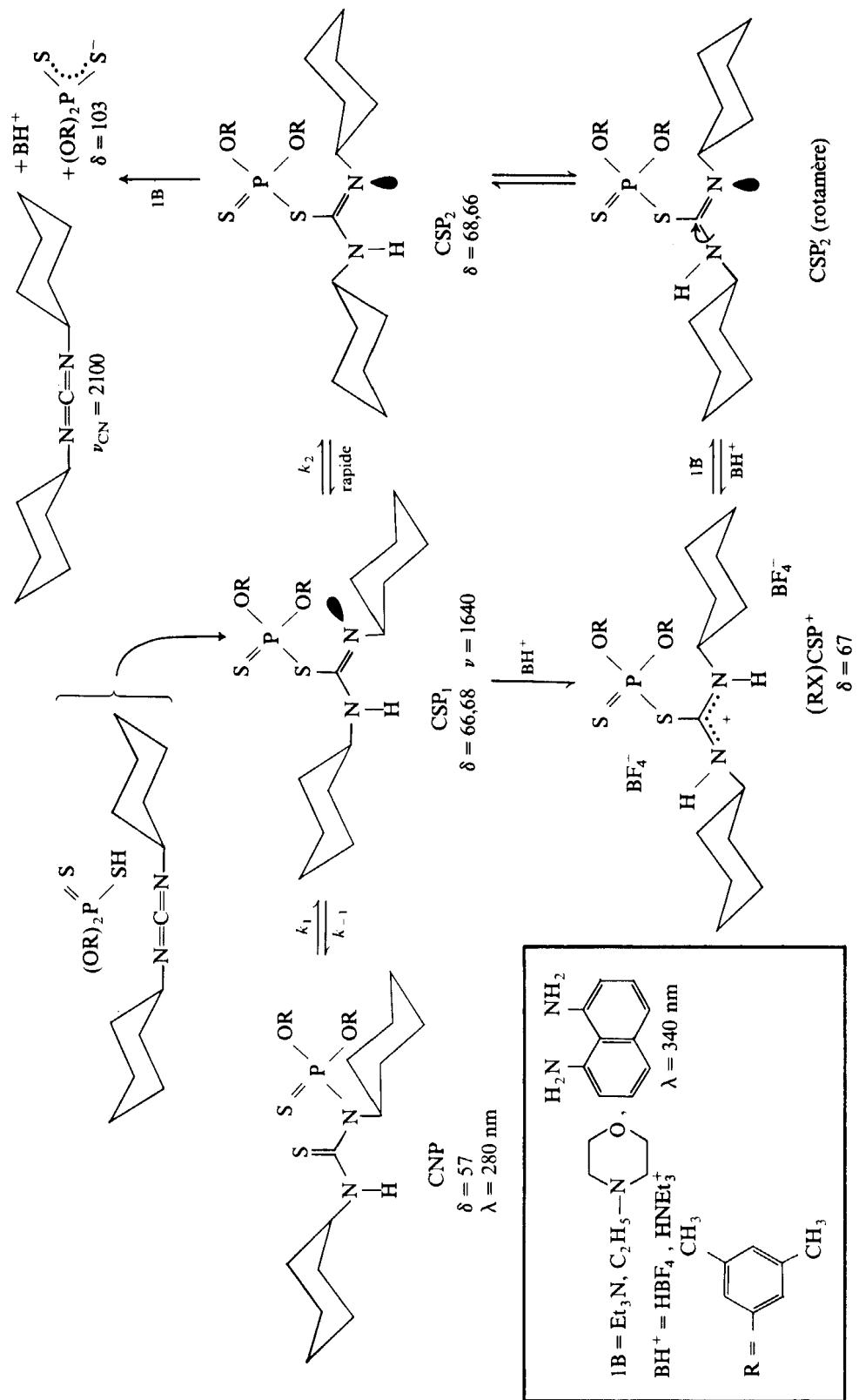
—l'action d'une base sur le même composé provoque un retour aux réactifs carbodiimide et anion de l'ester phosphorique; nous démontrons que l'étape lente de cette réaction est une autre réaction d'isomérisation, ici entre formes CSP_1 et CSP_2 . C'est à partir de cette dernière que se fait l'élimination vers les produits selon un processus soumis à un contrôle stéréoélectrique, effet bien connu pour les intermédiaires tétrahédriques,¹¹ et également décrit dans le cas des systèmes insaturés.¹²

Cette réaction constitue à notre connaissance le premier exemple de contrôle stéréoélectrique dans des composés phosphorylés.

Réactions à partir de la forme S-phospho-thiouronium CSP^+

Les réactions suivies à partir de ce composé complètent celles indiquées dans le Schéma 4,

—en présence d'un excès de base, CSP^+ conduit directement aux produits d'élimination carbodiimide et anion de l'ester thiophosphorique.



Dans ces conditions la forme CNP n'est pas détectée, la réaction d'élimination étant beaucoup plus rapide que l'isomérisation $CSP \rightleftharpoons CNP$;

—avec un équivalent de base, CSP^+ conduit à la formation partielle de forme CNP et également à une élimination partielle en DCCD;

—dans le cas où la base est le 1-8(diméthylamino)naphtalène (éponge à proton), la réaction conduit à la formation exclusive de forme CNP avec comme constante de vitesse expérimentale, la constante apparente d'isomérisation $CNP \rightleftharpoons CSP$. Dans ces conditions l'équilibre de déprotonation est complètement déplacé et il ne reste plus dans le milieu de base libre pour catalyser l'élimination vers DCCD. De plus ces résultats impliquent une isomérisation rapide de CSP_2 en CSP_1 ce qui se conçoit bien si on considère l'état d'encombrement très élevé de la structure CSP_2 par rapport à celle de CSP_1 .

Ce dernier point est également confirmé par l'étude cinétique de l'addition DCCD + ester phosphorique dont la constante de vitesse expérimentale est une constante de vitesse de premier ordre dont la valeur est très proche de celle d'interconversion k_{app} de $CNP \rightleftharpoons CSP$; ce résultat implique que la réaction $CSP_2 \rightarrow CSP_1$ qui est en amont, soit plus rapide.

L'étude de l'ensemble de ce système fait donc ressortir comme points majeurs:

—la mise en évidence de la réversibilité de la transformation entre structures S- et N-phosphorylées, résultat qui pose en termes nouveaux la question de l'activation des systèmes de type phospho-carbamates phosphourées ou phosphocarbonates;

—le contrôle par seul transfert de proton dans les réactions $CSP^+/base$, $CNP/acide$, DCCD/ester phosphorique d'un système de transfert de groupe phosphoryle constitue un exemple assez unique de système régulé de façon comparable à celle des systèmes biologiques;

—la contribution d'un contrôle de type stéréoélectronique.

De façon plus générale, ce travail est actuellement poursuivi avec la biotine et la thiobiotine dans le but de mettre en évidence de tels équilibres dans le cas des substrats oxygénés et d'en étudier les implications sur les exemples biochimiques choisis.

BIBLIOGRAPHIE

1. D. E. Metzler, *Biochemistry*, "The chemical reactions of living cells," Academic Press, Londres, 1977.
2. (a) J. Retey, F. Lynen, *Biochem. Z.*, **342**, 256; (b) R. Kluger, P. D. Adavadar, *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 3741 (1976).
3. R. Y. Ning, R. I. Fryer, P. B. Madan, B. C. Sluboski, *J. Org. Chem.*, **41**, 2720 (1976).
4. V. S. Reznik, Y. S. Shvetsov, V. S. Bakulin, I. S. Salikhov, *Bull. Acad. Sci. USSR, Ser. Chem.*, **24**, 1290 (1970).
5. G. Etemad-Moghadam, A. Klaebe, J. Perie, *Phosphorus and Sulfur*, **12**, 61 (1981).
6. F. Cramer, M. Winter, *Chem. Ber.*, **94**, 990 (1961).
7. T. Modro, V. Mizrahi, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **91**, 503 (1982).
8. S. E. Polakis, R. B. Guchait, E. E. Zwergel, M. D. Lane, T. G. Cooder, *J. Biol. Chem.*, **249**, 6657 (1974).
9. A. Williams, I. T. Ibrahim, *Chem. Rev.*, **81**, 589 (1981).
10. C. Blonski, M. B. Gasc, A. Klaebe, J. Perie, R. Roques, *J. Chem. Soc., Perkin II*, 7 (1982).
11. P. Deslongchamps, *Tetrahedron*, **31**, 2463 (1975).
12. A. F. Hegarty, communication personnelle.