

Jean-Pierre Monti, Diane Braguer et Aimé Crevat*

Laboratoire de Biophysique, Faculté de Pharmacie, 27 Bd J. Moulin,
13385 Marseille Cedex 5, France

Antoine Muriasco

Service de Néphrologie, Hôpital de Sainte Marguerite,
Marseille, France

Reçu le 11 juin 1983

Nous avons étudié par rmn du proton et du carbone 13 et par spectrométrie de masse le phosphate d'isaxonine. Les résultats ont montré que cette molécule possède deux sites de protonation sur l'hétérocycle. De plus, la fragilité de la liaison isopropyl-amine est mise en évidence par spectrométrie de masse.

J. Heterocyclic Chem., **21**, 1265 (1984).

Introduction.

Le phosphate d'isaxonine (figure 1) est une nouvelle molécule qui a pu être préconisée dans le traitement de diverses neuropathies. Elle possède en effet la propriété de faciliter la croissance des axones [1]. Un des sites d'action paraît être la tubuline, protéine dont la polymérisation conduit aux microtubules qui sont les constituants principaux des axones. Le phosphate d'isaxonine paraît, au moins en partie, devoir son effet à une accélération de la polymérisation de cette protéine [2]. Nous pensons étudier le mécanisme d'action de cette molécule dont nous avons déjà démontré certaines propriétés [3]. Mais il est bien évident que pareille étude n'est concevable que si on connaît parfaitement les caractéristiques spectrales et la structure de l'isaxonine. Le but du présent travail est précisément d'exposer les résultats que nous avons obtenus dans ce domaine et qui nous permettent de préciser certains points sur la structure de cette molécule, en particulier ses sites de protonation.

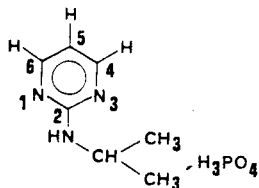


Figure 1. Formule du phosphate d'isaxonine.

Résultats obtenus.

1) rmn du proton.

La solution 0,1 M de phosphate d'isaxonine dans l'eau lourde présente un pH de 2,72. Le spectre de cette solution est représenté dans la figure 2A. Les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont fournis dans le tableau 1 où figurent également les résultats obtenus avec l'isaxonine, base en solution 0,1 M dans l'eau lourde (pH obs. = 6,90). Dans ce tableau sont également représentées

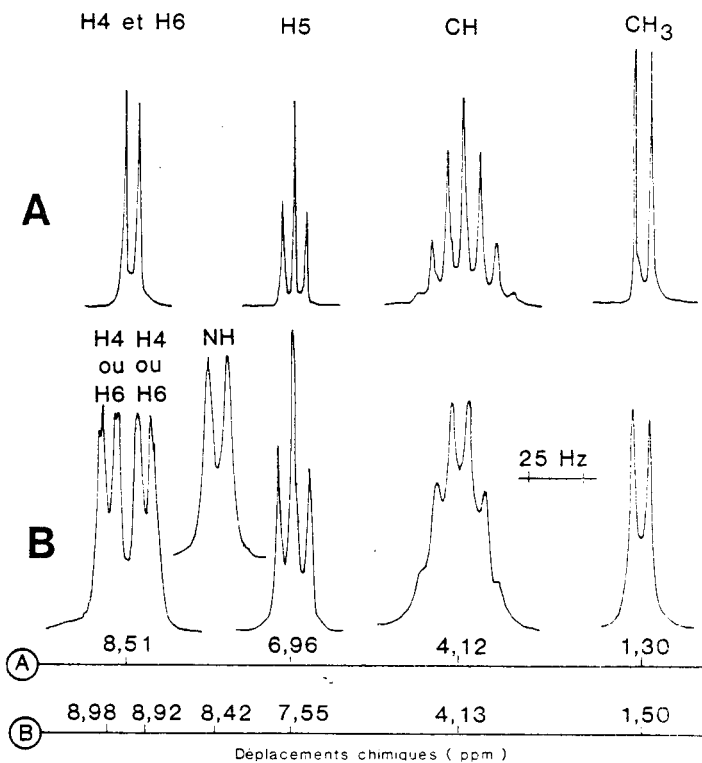


Figure 2. A-Spectre du phosphate d'isaxonine dans l'eau lourde (0,1 M) à pH = 2,72. B-Spectre du phosphate d'isaxonine dans l'acide sulfurique (0,3 M).

les caractéristiques des spectres du phosphate d'isaxonine et de l'isaxonine base en solution 0,1 M dans le DMSO. Les expériences menées avec l'isaxonine base et le phosphate d'isaxonine en solution dans l'acétone deutériée, à température variable, ont permis de mesurer les températures de coalescence des protons H₄ et H₆ dans le cas de ces deux molécules. Ces températures sont égales à -35° pour l'isaxonine base et -20° pour le phosphate d'isaxonine.

Sur la figure 3 sont représentées les courbes de variation des déplacements chimiques en fonction du pH, $\delta = f(\text{pH obs.})$. Ces courbes sont obtenues à partir des solutions 0,1 M de phosphate d'isaxonine dans l'eau lourde. Lorsque le pH augmente tous les signaux se déplacent vers les champs forts mais les différents protons ne sont pas affectés avec la même intensité.

Sur la figure 2B nous avons fait figurer le spectre du phosphate d'isaxonine dans l'acide sulfurique (0,3 M) à 20°. Les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage sont résumées dans le tableau 2. Nous noterons plus particulièrement l'existence de deux doublets dédoublés à 8,92 et 8,98 ppm pour les protons H₄ et H₆. La figure 4A représente les modifications apportées à ce spectre par l'abaissement de la température. Nous observons l'apparition d'un signal d'intégration 1 à 12,57 ppm aux environs de +10° et celle d'un signal également d'intégration 1 à 12,08 ppm lorsque la température devient inférieure à -10°. Inversement, lorsqu'on élève la température au-dessus de 20°, on note une fusion progres-

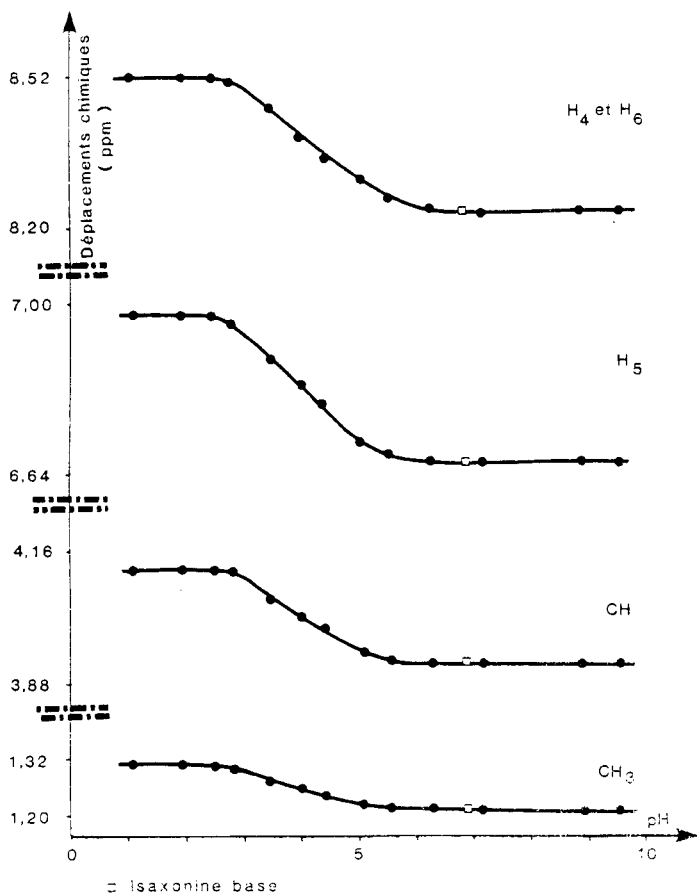


Figure 3. Variations des déplacements chimiques des protons du phosphate d'isaxonine en solution dans l'eau lourde en fonction du pH.

sive des deux signaux de H₄ et H₆, réalisée à 60° (figure 4B) ainsi qu'une disparition du signal du proton de l'amine extracyclique.

Enfin, la figure 5 représente les variations des déplacements chimiques des protons du phosphate d'isaxonine dans des mélanges eau-acide sulfurique de composition variable. Les protons voient leur signal se déplacer vers les champs forts lorsque le pourcentage en acide sulfurique diminue. Toutefois les variations des déplacements chimiques du proton CH sont trop faibles pour être considérées comme significatives. D'autre part, il convient de souligner que pour des concentrations en acide sulfurique inférieures à 70%, les deux doublets se fondent en un signal. Pour cette même concentration il y a disparition du signal du NH.

2) rmn du carbone 13.

Les caractéristiques spectrales du phosphate d'isaxonine (0,6 M) à pH 2,72 et de l'isaxonine base (0,15 M) à pH 6,82 en solution dans l'eau lourde sont fournies dans le tableau 3.

Dans ce même tableau, figurent les résultats obtenus avec le phosphate d'isaxonine en solution dans l'acide sulfurique (0,6 M). Nous noterons dans ce cas l'apparition de deux signaux vers les champs faibles à 160,3 et 161,8 ppm dus aux carbones C₄ et C₆.

Enfin, dans la figure 6 sont représentées les variations $\delta = f(\text{pH obs})$ des différents atomes de carbone du phosphate d'isaxonine en solution dans l'eau lourde (0,6 M).

Discussion.

1) Symétrie de la molécule.

En solution dans l'eau lourde et le DMSO, à température ambiante, nous observons une équivalence des protons et des carbones 4 et 6. Or de par la présence voisine

Tableau 1

Déplacements chimiques (exprimés en ppm $\pm 0,01$ ppm) des protons du phosphate d'isaxonine et de l'isaxonine base par rapport au DSS

Protons	Solvent D ₂ O (0,1 M)		Solvent DMSO (0,1 M)	
	IAPP	IAP	IAPP	IAP
CH ₃	1,30	1,21	1,12	1,21
CH	4,12	3,92	4,00	4,15
H ₅	6,96	6,66	6,51	6,53
NH			7,06	6,04
H ₄ , H ₆	8,51	8,24	8,24	8,23
H ₃ PO ₄			9,79	

Constantes de couplage (exprimées en Hertz)

	Solvent D ₂ O (0,1 M)		Solvent DMSO (0,1 M)	
	IAPP	IAP	IAPP	IAP
³ J(CH-CH ₃)	6,5	6,5	6,5	6,5
³ J(CH-NH)			5,0	8,0
J _{ortho} (H ₅ -H ₄ ou H ₆)	5,4	5,0	5,8	4,8

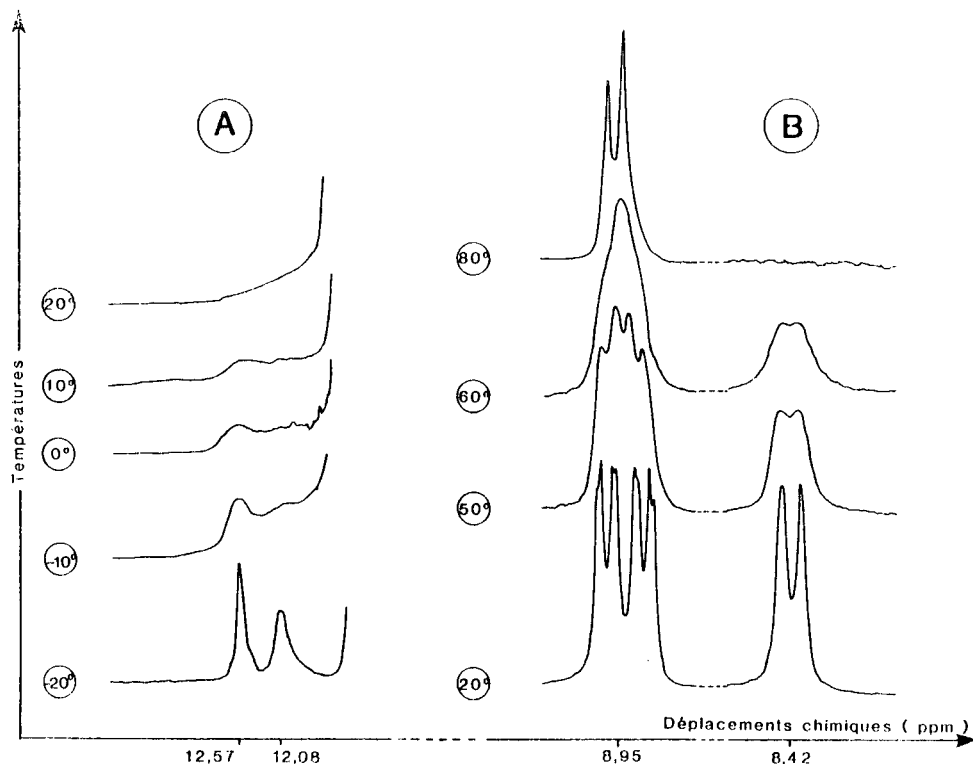


Figure 4. Spectre du phosphate d'isaxonine en solution +20° à -20°. B-de +20° à +80°.

dans l'acide sulfurique à différentes températures. A-de

du doublet libre de l'azote extracyclique et du système hétéroaromatique π , il existe une gêne à la rotation autour de la liaison $C_2-NH_{extracyclique}$, gêne dont l'observation en rmn dépend de la hauteur de la barrière de rotation. Rendant compte de la dissymétrie introduite par le

groupement isopropyle, le calcul classique [4] des enthalpies libres d'activation ΔG a conduit respectivement aux valeurs de $12,2 \pm 0,2$ Kcal/mole et de $13,0 \pm 0,2$ Kcal/mole pour l'isaxonine base et le phosphate d'isaxonine; valeurs proches des chiffres fournis dans la littérature pour des liaisons de ce type [5]. Dans le cas présent, à température ambiante, cette barrière est trop peu élevée pour que la rotation soit bloquée et l'hétérocycle est symétrique dans les conditions de l'observation rmn. Cette explication a d'ailleurs été avancée pour expliquer un problème analogue observé dans le cas d'alkylanilines [6].

Tableau 2

Déplacements chimiques (exprimés en ppm $\pm 0,01$ ppm) des protons du phosphate d'isaxonine en solution dans l'acide sulfurique (0,3 M) par rapport au DSS (température 20°)

Protons	
CH ₃	1,50
CH	4,13
H ₅	7,55
NH	8,42
H ₄ ou H ₆	8,92
H ₄ ou H ₆	8,98
Constantes de couplage (exprimées en Hertz)	
Couplages	
³ J(CH-CH ₃)	6,3
³ J(CH-NH)	7,5
J _{ortho} (H ₅ -H ₄ ou H ₆)	6,0
J _{meta} (H ₄ -H ₆)	1,5

Tableau 3

Déplacements chimiques (exprimés en ppm $\pm 0,1$ ppm) des atomes de carbone du phosphate d'isaxonine et de l'isaxonine base par rapport au TMS

Carbones	IAPP (0,6 M)		IAP (0,15 M)
	D ₂ O	H ₂ SO ₄	D ₂ O
CH ₃	22,0	21,8	22,5
CH	44,9	50,9	43,6
C ₅	110,3	112,2	111,2
C ₂	154,7	147,2	161,4
C ₄	157,9	160,3 ou 161,8	159,3
C ₆	157,9	160,3 ou 161,8	159,3

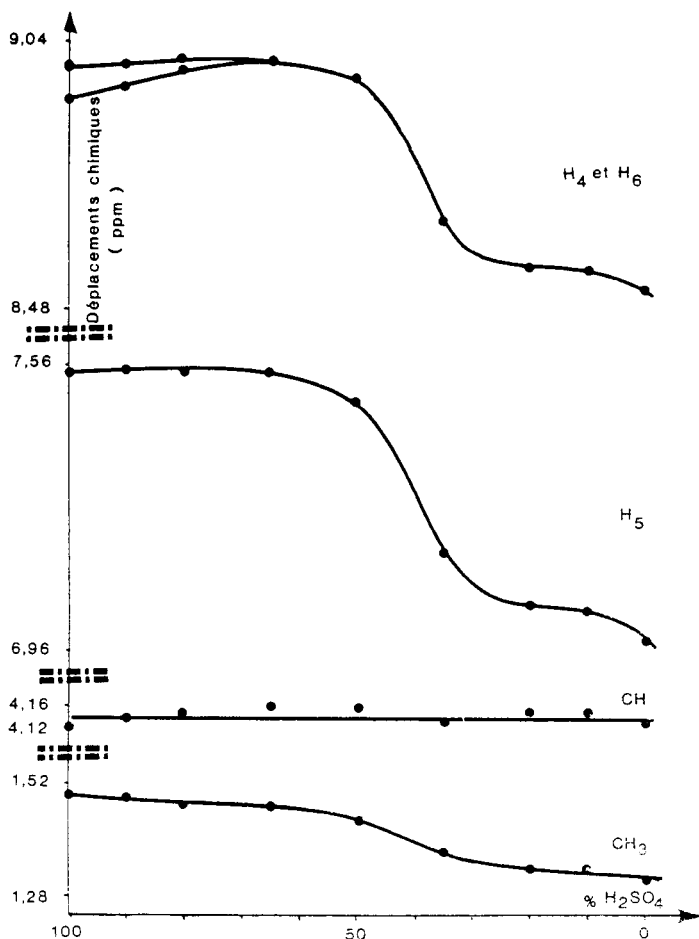


Figure 5. Variations des déplacements chimiques des protons du phosphate d'isaxonine dans des mélanges eau-acide sulfurique de composition variable.

2) Protonation de la molécule.

a) Solvant: eau lourde.

Les courbes représentées sur les figure 3 et 6 sont analogues à celles obtenues dans le cas de la thiamine qui possède également un cycle aminopyrimidinique [7,8]. Dans ce cas, elles ont été identifiées à des courbes de titration correspondant à la protonation du cycle pyrimidinique. C'est donc cette explication que nous avons adoptée: le blindage des protons observé lorsque le pH augmente est dû à la déprotonation de l'hétérocycle du phosphate d'isaxonine. Par ailleurs, le point d'inflexion de ces courbes qui correspond au pK se situe à un pH observé de valeur 4,2 qui correspond précisément au pK du phosphate d'isaxonine évalué par d'autres techniques [9]. Cette correspondance représente une preuve supplémentaire de la protonation de cette molécule.

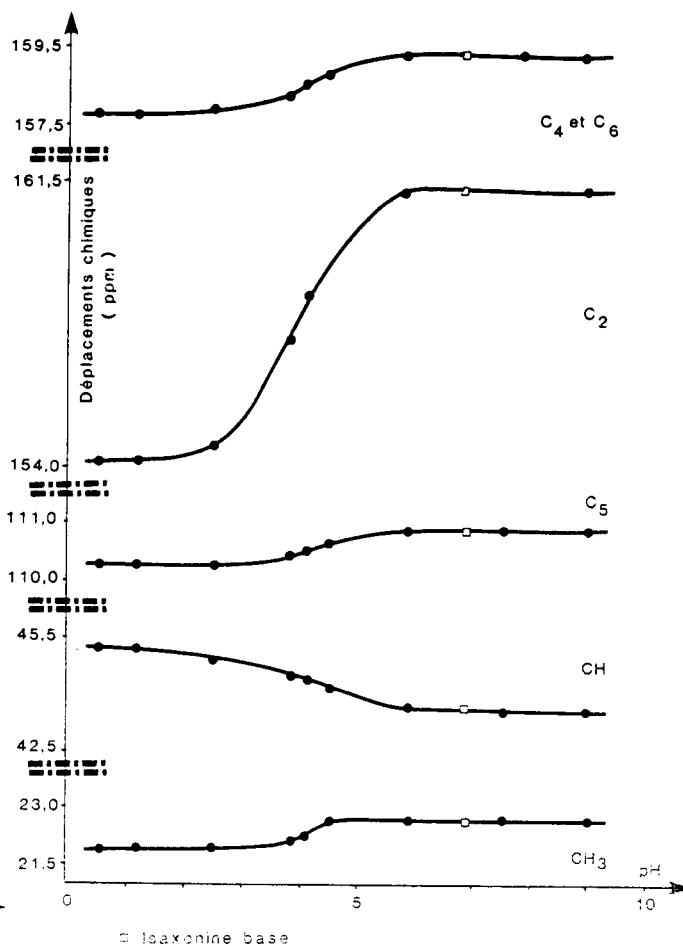


Figure 6. Variations des déplacements chimiques des atomes de carbone du phosphate d'isaxonine en solution dans l'eau lourde en fonction du pH.

En outre, le phosphate d'isaxonine en solution aqueuse présente un pH de 2,72 valeur qui se situe dans la zone où la molécule est protonée. Donc en solution aqueuse le phosphate d'isaxonine existe sous forme monoprotée, l'hydrogène de protonation étant emprunté à l'acide phosphorique dont les pK valent respectivement 2,12; 7,21 et 12,67.

D'ailleurs cette protonation intracyclique est confirmée par deux faits expérimentaux:

- même dans l'acide sulfurique pur le signal du proton NH extracyclique présente une intégration toujours égale à 1,

- le carbone en position 2 du phosphate d'isaxonine résonne à champs plus forts que les carbones en position 4 ou 6 (tableau 3) au contraire de l'isaxonine base. Ce fait ne peut s'expliquer que par la protonation des azotes intracycliques ainsi qu'il l'a été montré dans le cas de certaines

aminopyrimidines [10].

Enfin, cette protonation intracyclique est en accord avec les résultats obtenus par Wagner et Coll. [11] sur des molécules apparentées.

Comme la rotation autour de la liaison C₂-NH est trop rapide par rapport à l'échelle des temps de la rmn, le cycle apparaît comme étant symétrique ainsi que le montre l'équivalence des protons et des carbones 4 et 6. Dans ces conditions, la probabilité de protonation est identique pour les deux atomes d'azote intracycliques. Il est enfin à noter que même dans le DMSO, ce proton n'apparaît pas sur les spectres en raison de son échange avec les hydrogènes de l'anion phosphorique.

b) Solvant: acide sulfurique.

Les courbes de la figure 5 montrent que les déplacements chimiques des protons décrivent des courbes de type courbe de titration, analogues à celles obtenues pour la thiamine, lorsque le pourcentage d'acide sulfurique varie [12]. Or pour ces solutions, les fonctions d'acidité de Hammett H⁰ et H⁺ [13,14] sont parallèles et jouent un rôle analogue au pH en solution diluée [15]. De plus, ces fonctions sont proportionnelles à la concentration en acide pour les solutions étudiées [14,16]. Donc les courbes décrites dans la figure 5 sont des courbes de titration et les variations de déplacement chimique sont dues à la deuxième protonation du cycle pyrimidique. Une preuve supplémentaire de cette protonation est fournie par l'existence des deux signaux d'intégration 1 observés à 12,57 et 12,08 ppm sur le spectre du phosphate d'isaxonine dans l'acide sulfurique à -20° qui peuvent donc être attribués à deux protons de protonation, ces protons n'étant pas équivalents.

Cette différence entre les protons de protonation montre que dans l'acide sulfurique la molécule de phosphate d'isaxonine présente une structure dissymétrique, ce qui est confirmé par la non-équivalence des protons et des carbones en position 4 et 6 (figure 2B). Cette dissymétrie est due à un blocage conformationnel au niveau de la liaison C₂-NH. En effet, d'une part la barrière de rotation est supérieure à celle de l'inversion de l'azote [6], d'autre part le blocage de l'inversion de l'azote ne peut expliquer à lui seul la dissymétrie observée pour les protons et les carbones 4 et 6 car ces derniers posséderaient alors dans l'espace le même environnement électronique.

De plus, les résultats [17] obtenus par des calculs de chimie théorique montrent que les protonations successives du cycle pyrimidinique entraînent une augmentation du caractère sp₂ de la liaison C₂-NH. Donc la conjugaison entre le doublet de l'atome d'azote extracyclique et le système hétéroaromatique π augmente avec la protonation du cycle.

Enfin, le calcul classique [4] de l'enthalpie libre d'activation ΔG conduit à une valeur de 17,1 ± 0,2 Kcal/mole

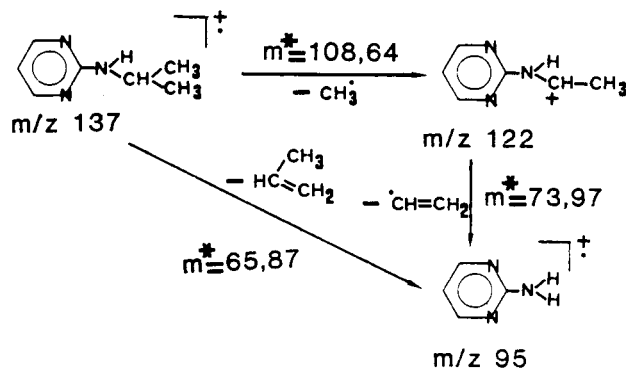


Figure 7. Schéma de la fragmentation de la molécule d'isaxonine.

pour l'isaxonine diprotonée. Cette valeur est plus élevée que les deux précédentes ainsi qu'en rend compte le blocage conformationnel observé à la température ambiante.

Donc dans cette structure bloquée, l'hydrogène de protonation situé au voisinage du groupement isopropyle subit une gêne stérique plus grande que l'autre et par conséquent s'échange plus lentement avec le milieu. Ceci est confirmé par le fait que ces deux protons apparaissent sur les spectres à des températures différentes: +10° et -10° (figure 4). L'existence de ce blocage est également compatible avec la réapparition de la symétrie de la molécule lorsque l'on élève la température.

Il convient enfin de souligner que le dédoublement des signaux n'apparaît qu'à partir d'un pourcentage en acide sulfurique supérieur à 70% (figure 5). Il semble donc que le blocage conformationnel autour de la liaison C₂-NH soit du à l'augmentation de l'acidité qui ralentit l'échange des protons de protonation avec le milieu et rend ainsi progressivement impossible la rotation. Notons que nous n'observons pas les couplages entre les protons NH⁺ et les protons du cycle en raison de la trop grande largeur des signaux: 50 Hertz pour les premiers et 15 Hertz pour les seconds.

PARTIE EXPERIMENTALE

Réactifs.

Phosphate d'isaxonine et isaxonine base: laboratoire Ipsen, Paris. Eau lourde, acide chlorhydrique deutérié, ammoniacque deutérié: CEA, Saclay. DMSO-d₆, acétone deutérié: Spectrométrie Spin et Technique. Tétraméthylsilane, Sel de sodium de l'acide (triméthylsilyl)-3 propane sulfonique, benzène deutérié: Uvasol Merck. Acide sulfurique: Prolabo.

Méthodes.

1) rmn du proton.

Les spectres sont réalisés sur un spectromètre Caméca 250 MHz et sur un spectromètre Bruker AM 200 [18]. Les spectres sont obtenus soit en solution dans l'eau lourde ou le DMSO-d₆ ou l'acétone deutériée (0,1 M), soit dans l'acide sulfurique (0,3 M). Nous avons utilisé le sel de sodium de l'acide (triméthylsilyl)-3 propane sulfonique comme référence interne.

2) rmn du carbone 13.

Les spectres sont réalisés sur un spectromètre Varian FT 80 [18], muni d'une transformée de Fourier. Les concentrations utilisées étaient de 0,6 M pour le phosphate d'isaxonine et 0,15 M pour l'isaxonine base. Les solvants utilisés étaient soit l'eau lourde soit l'acide sulfurique. L'accumulation se fait sur 8192 points, le temps d'acquisition est de 0,819 s et le temps d'impulsion de 8 μ s. La référence employée est constituée par du tétraméthylsilane en solution dans du benzène deutérié contenu dans un tube capillaire.

L'attribution des pics a été réalisée par l'utilisation des spectres en découplage partiel. Les spectres totalement découplés sont obtenus après 2500 accumulations, ceux découplés partiellement après 4000 accumulations.

3) Spectrométrie de masse.

Les spectres sont réalisés sur un spectromètre AEI-KRATOS MS 50 à double focalisation. Les paramètres expérimentaux sont les suivants: énergie d'ionisation = 70 eV; pression de la source = 10^{-6} Torr; température de la source = 150°; émission = 300 μ A; introduction chaude (système AGHIS); basse résolution.

L'ionisation et la dissociation de la molécule d'isaxonine base conduisent à deux fragments principaux m/z 122 et m/z 95. Le schéma de ces fragmentations est représenté dans la figure 7. La molécule de phosphate d'isaxonine fournit un spectre identique. On obtient le fragment m/z 95 par deux réactions compétitives: l'une directe en une seule étape et l'autre indirecte mettant en jeu un fragment intermédiaire m/z 122. L'intensité des ions montrent que la voie prépondérante est la voie indirecte (environ 90% d'après le rapport des intensités des ions métastables).

Les spectres de masse montrent l'apparition d'amino-2 pyrimidine (figure 7). Il semble donc que la liaison isopropyl-amine soit un des points de moindre résistance de la molécule. Nous pouvons mettre ce résultat en parallèle avec ceux obtenus à l'aide des méthodes de calcul de la chimie théorique effectuées sur l'isaxonine (CNDO/S et CNDO/2) qui montrent que cette liaison possède l'indice de Wiberg le plus faible de la molécule [17]. Il semble en outre que la fragilité de cette liaison soit augmentée par la protonation de la molécule puisque l'indice de Wiberg calculé pour la forme protonée est plus petit que celui de la forme non protonée.

4) pH métrie.

Les mesures de pH sont effectuées avant et après l'enregistrement des spectres de rmn. L'écart observé a toujours été inférieur à $\pm 0,03$ unité pH. Lors des études à pH variable, ce dernier a été ajusté à l'aide de solutions d'acide chlorhydrique deutérié et d'ammoniaque deutériée. Les ré-

sultats sont exprimés en unités de pH observé sans effectuer la correction nécessaire en milieu deutérié [19].

Remerciements.

Nous remercions Monsieur le Docteur Sarrazin et Monsieur le Docteur Salmona pour nos discussions, ainsi que Mademoiselle Noailly, Monsieur Faure et Monsieur Bouteille pour leur assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE ET NOTES

- [1] T. Tarrade et A. Hugelin, *Neuro-Science Letters*, **1**, 545 (1978).
- [2] R. Coelho et M. Istin, *Nouv. Presse Medicale*, **16**, 1227 (1982).
- [3] A. Crevat, A. Murisasco, D. Braguer, A. M. Chauvet-Monges, J. C. Sari, R. Frayssinet et R. Elsen, 28th Meeting of American Society for Artificial Internal Organs, Chicago, Avril 1982.
- [4] M. L. Martin et G. J. Martin, "Manuel de Résonance Magnétique Nucléaire", Azoulay Ed, 1971, p 159 et réf. citées.
- [5] M. L. Filleux-Blanchard, J. Fieus et J. C. Halle, *Org. Magn. Reson.*, **5**, 221 (1973).
- [6] L. Lunazzi, C. Magagnoli et D. Macciantelli, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, 1704 (1980).
- [7] J. Suchy, J. J. Mieyal, G. Bantle et H. Z. Sable, *J. Biol. Chem.*, **247**, 5905 (1972).
- [8] A. A. Gallo et H. Z. Sable, *J. Biol. Chem.*, **249**, 1392 (1974).
- [9] Laboratoire Ipsen, Communication Personnelle.
- [10] J. Riand, M. T. Chenon et N. Lumbroso-Bader, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 6838 (1977).
- [11] R. Wagner et W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta*, **53**, 299 (1970).
- [12] J. Fournier, A. M. Chauvet-Monges et A. Crevat, *J. Chim. Phys.*, **1**, 51 (1975).
- [13] T. C. D. Brant, W. C. Horning et M. B. Thornley, *J. Chem. Soc.*, 1374 (1952).
- [14] M. A. Paul et F. A. Long, *Chem. Rev.*, **57**, 1 (1957).
- [15] T. G. Bonner et J. C. Lockhart, *J. Chem. Soc.*, 364 (1957).
- [16] R. K. Lyon et D. H. Levy, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 4288 (1961).
- [17] J. P. Monti, M. Sarrazin et P. Brouant, *Can. J. Chem.*, sous presse.
- [18] Appareillage du Service Interuniversitaire de rmn.
- [19] P. K. Glasoe et F. A. Long, *J. Phys. Chem.*, **64**, 188 (1960).

English Summary.

The ¹³C and ¹H nmr and mass spectrometry studies were performed with isaxonine phosphate. Results showed isaxonine offers two protonation sites on the pyrimidine ring of the molecule. Moreover, the mass spectra showed a lability of the isopropyl amine bond.