

UNE NOUVELLE METHODE D'ACYLATION SPECIFIQUE
DES THIOLS : APPLICATION AU COENZYME A

F. LE GOFFIC, S. SICSIC et Ch. VINCENT

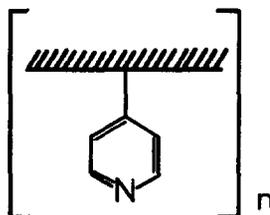
C.E.R.C.O.A. - C.N.R.S. 2 à 8, rue Henry Dunant 94320 THIAIS (France)

(Received in France 16 June 1976; received in UK for publication 2 July 1976)

Les Acyl-coenzymes A et en particulier le S-acétyl-coenzyme A constituent une plaque tournante de nombreuses voies biosynthétiques. Ces molécules ont déjà été préparées par une variété de méthodes (1 à 7) qui, en fait, ne donnent pas entièrement satisfaction. En effet, leur utilisation nécessite des extractions puis une séparation chromatographique qui sont relativement longues et surtout agressives. Nous décrivons ici une nouvelle technique d'obtention de thio-esters ne nécessitant ni extraction, ni purification, ce qui la rend beaucoup plus fiable que les voies synthétiques décrites précédemment.

L'idée directrice de la technique que nous proposons est d'utiliser le catalyseur d'acylation fixé sur une membrane possédant des propriétés mécaniques et chimiques compatibles avec le milieu utilisé.

La réalisation de cette membrane a été décrite précédemment (8). Elle répond à la formule suivante. Il s'agit en somme d'une pyridine insolubilisée.



La technique opératoire est simple : elle consiste à dissoudre dans l'eau distillée le thiol avec un excès de réactif acylant (anhydride, par exemple) et à agiter à température ordinaire pendant quelques minutes ce mélange réactionnel en présence de la membrane. La fin de la S-acylation est détectée par le test classique au DTNB (Acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)) (9). La membrane est alors enlevée du milieu, lavée, par exemple, par de l'ammoniaque à 30 %, puis à l'eau distillée afin qu'elle soit prête pour une nouvelle catalyse.

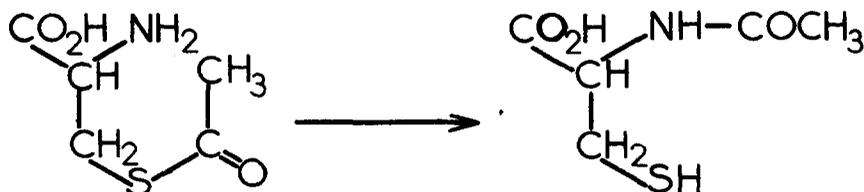
La solution résultante est lyophilisée et donne directement le thioester avec un rendement quasi-quantitatif.

L'acétyl-CoA (voir partie expérimentale) peut ainsi être obtenu soit à partir du coenzyme A libre, ce qui nécessite un relargage à l'aide de lithine à cause d'une fixation électrostatique relativement forte du coenzyme A sur la membrane, soit directement à partir de son tri-sel de lithium. Dans certains cas, il est plus avantageux d'utiliser l'une ou l'autre de ces deux variantes.

Ainsi, la succinylation du CoA se fera plus avantageusement sur l'acide libre que sur le tri-sel de lithium, puisqu'il sera possible de séparer le S-succinoyl-CoA synthétisé et fixé transitoirement sur la membrane, de l'acide succinique (non éliminable par lyophilisation) provenant de l'hydrolyse de l'anhydride correspondant dans le milieu réactionnel.

Le tableau suivant indique l'efficacité et la spécificité de la méthode envers les fonctions thiols. L'acétylation des fonctions hydroxylées n'a pas lieu puisque le coenzyme A est acylé spécifiquement au niveau de l'atome de soufre.

L'acétylation de l'azote ne se fait pas davantage, bien qu'avec la cystéine on obtient d'abord la N-acétyl-cystéine, mais cette dernière provient du réarrangement bien connu de la S-acétyl-cystéine.



Ceci est confirmé par la S-acétylation de la N-acétyl-cystéine et la S-acétylation du glutathion dans lequel la fonction aminée susceptible d'être acylée intramoléculairement ne se trouve pas à bonne distance de la fonction thioester. La S-benzyl-cystéine ne donne pas de réaction.

A titre d'exemple et pour illustrer notre méthode, nous décrivons la préparation de l'acétyl- et du succinoyl-coenzyme A.

ACETYL CoA

A 20 ml d'eau distillée contenant la membrane (5 cm²), on ajoute 60 mg de CoA (tri-sel de lithium) puis, par fractions de 20 μl, de l'anhydride acétique jusqu'à obtention d'un test au DTNB négatif. La membrane est alors enlevée du milieu réactionnel, lavée à l'eau et la solution obtenue est lyophilisée, ce qui conduit à 57 mg (95 %) d'acétyl-coenzyme A sous forme de tri-sel de lithium.

SUCCINOYL CoA

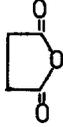
A 20 ml d'eau distillée contenant la membrane (5 cm²), on ajoute 80 mg (104 μM) de CoA-SH (acide libre) puis par petites fractions 370 mg (3,7 millimoles) d'anhydride succinique. On agite à température ordinaire (15 minutes) jusqu'à obtention du test au DTNB négatif. On enlève la membrane du milieu réactionnel, on la lave à l'eau, puis on décroche le succinoyl-CoA par 4 équivalents d'hydroxyde de lithium. Après enlèvement de la membrane, on lyophilise la solution obtenue. On obtient ainsi 82 mg (96 μM) (92 %) de succinoyl CoA pur.

L'acétyl-CoA et le succinoyl-CoA sont caractérisés par chromatographie en couche mince par spectrographies U.V. et de R.M.N., puis par un test enzymatique (citrate synthase pour l'acétyl-coenzyme A) (10).

Cette méthode simple et spécifique est extrapolable à la synthèse de thioesters divers et, par exemple, à l'acylation du coenzyme A par des acides gras.

Remerciements : Les auteurs remercient particulièrement le Professeur CHAPIRO d'avoir bien voulu mettre à leur disposition la membrane de pyridine utilisée dans ce travail. Ils remercient aussi le Centre National de la Recherche Scientifique et la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (contrat n° 75-7-0142) pour l'aide matérielle qui leur a été apportée.

EXEMPLE DE SYNTHÈSE DE THIOESTERS

Réactif acylant	Thiol	Thioester obtenu	Rendement %
$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	CoA-SH (acide libre)	CoA-S-COCH ₃	95
$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	CoA-SH (tri-sel de lithium)	CoA-S-COCH ₃	95
	CoA-SH (acide libre)	CoA-S-COCH ₂ CH ₂ COOH	92
$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	Glutathion	Glutathion-S-COCH ₃	88
$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	Cystéine	N-acétyl-cystéine	95
$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	N-acétyl-cystéine	N,S-diacétyl-cystéine	95
$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	S-benzyl-cystéinate d'éthyle	-	0

- 1 - WILSON B.I. (1952). *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 3205.
- 2 - SIMON E.J. et SHEMIN D. (1953). *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 2520.
- 3 - SEUBERT W. (1960). *Biochem. Prep.*, 7, 80.
- 4 - GOLDMAN P. et VAGELOS P.R. (1961). *J. Biol. Chem.*, 236, 2620.
- 5 - AL-ARIF A. et BLECHER M. (1969). *J. Lipid. Res.*, 10, 355.
- 6 - YAMADA I. (1974). *J. Org. Chem.*, 39, 3303.
- 7 - MASAMUNE, KAMATA S., DIAKOR J., SUGIHARA Y. et BATE S.G. *Can. J. Chem.* (1975), 53, 3693.
- 8 - CHAPIRO A., GORDON A. et JENDRYCHOWSKA-BONAMOUR A.M. *Eur. Polym. J.*, (1973), 975.
- 9 - GRUNERT R.R. et PHILLIPS P.H. (1951). *Arch. Biochem.*, 30, 217.
- 10 - BADDILEY J. (1955). *Advances in Enzymology*, 16, 1.