

N-DEMETHYLATION SPECIFIQUE DE METHYL-10 ISOALLOXAZINE MODELES

Georges STURTZ, Jean-Jacques YAOUANC et Jean-Louis KRAUS*

Université de Bretagne Occidentale
Faculté des Sciences et Techniques
6, Avenue Victor Le Gorgeu, 29283 BREST

Les flavines et flavoprotéines jouent un rôle prédominant dans les différents aspects du métabolisme énergétique, mais demeurent surtout des "bancs d'essais" pour tester les différents concepts élaborés lors de l'étude des mécanismes de réactions enzymatiques. A ce titre, pour interpréter les faits observés lors de l'étude du mécanisme d'inhibition de la sarcosine oxydase et de la diméthylglycine oxydase par des inhibiteurs du type "substrat-suicide" (1,2), nous avons été amenés à élaborer différents modèles d'isoalloxazines.

De nombreuses études (3) s'accordent à confiner l'activité redox du système flavine aux positions C-4a, N-5, C-8 et N-1, les deux dernières positions étant plus spécifiques des réactions photochimiques (4), en particulier, il a été montré que la photodégradation de modèles isoalloxazines substitués en position N-10 par un groupement alkyle différent de méthyle, éthyle et néopentyle conduisait à la formation d'alloxazine et de l'oléfine correspondante (5).

Dans le cas de modèles substitués par un groupement méthyle en position N-10, si au lieu d'une irradiation photochimique, on procède à attaque nucléophile par l'anion méthylate ou par l'ion hydruure, Muller (6) a montré que la position 9a du noyau isoalloxazine est le siège de l'attaque nucléophile qui dans le premier cas conduit au composé méthoxylé en position 9a.

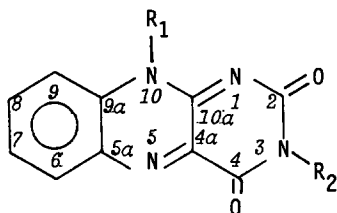
Par contre, l'hydrolyse alcaline du modèle diméthyl-3,10 isoalloxazine étudiée par Hemmerich (7) conduit à une spirohydantoïne par une attaque de l'ion OH^- au niveau de la position C-10a.

Lorsque l'atome d'azote en position 10 est substitué par un groupement stériquement plus encombrant du type diméthyl-2',6' phényle, Bruice (8) a montré que l'hydrolyse alcaline de ce modèle conduisait non plus à une spirohydantoïne mais à une structure du type quinoxaline.

D'après ces différents résultats, il apparaît que des modèles isoalloxazines substitués en position N-10 par un groupement N-méthyle, possèdent des propriétés réactionnelles spécifiques, et, à ce propos, nous rapportons une nouvelle réaction de déméthylation chimique spécifique des modèles isoalloxazines substitués en position N-10 par un groupement méthyle.

RÉSULTATS

Les différents modèles ci-dessous ont fait l'objet de cette étude de réactivité :



- | | |
|----------|---|
| <u>1</u> | $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ |
| <u>2</u> | $R_1 = \text{CH}_3 \quad R_2 = n\text{C}_5\text{H}_{11}$ |
| <u>3</u> | $R_1 = \text{C}_6\text{H}_5 \quad R_2 = \text{CH}_3$ |
| <u>4</u> | $R_1 = \text{C}_6\text{H}_5 \quad R_2 = n\text{C}_5\text{H}_{11}$ |

Lorsqu'on soumet une solution ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$) de chacun des modèles 1, 2, 3 et 4 à l'action de tBuO^-K^+ ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$) dans un mélange tBuOH/DMF anhydre sous atmosphère d'azote {conditions décrites par Hamilton (9)} on constate par spectroscopie UV-Visible la disparition instantanée de l'absorption caractéristique de la forme oxydée de la flavine $\lambda_{\text{max}} = 435 \text{ nm}$.

On isole des composés, qui soumis à une analyse structurale, présentent les caractéristiques suivantes :

. Cas des dérivés 1 et 2

Par RMN H^1 on constate :

- disparition du pic à 4,1 ppm correspondant au signal du groupement méthyle en position N-10;
- apparition d'un signal à 5,4 ppm dont l'intégration correspond à 3 protons dans CDCl_3 , DMSO et à 2 protons dans D_2O ;
- les pics correspondant au reste du noyau flavine, et au groupement alkyle fixé sur l'atome d'azote en position N-3 restent inchangés par rapport au produit initial avant l'attaque de tBuO^-K^+ ;

Enfin, lorsque le produit isolé après l'action de tBuO^-K^+ est chauffé en milieu acide, par la méthode dite du "purpald" (10) on met en évidence de façon formelle la production de formaldéhyde et formation simultanée du composé 7 qui possède les absorptions caractéristiques des noyaux alloxazines

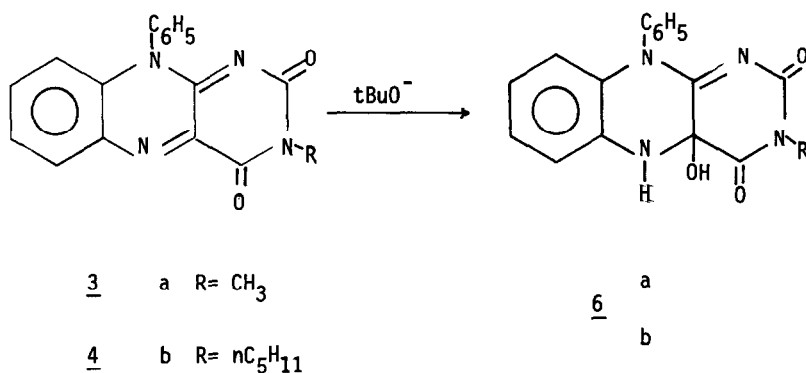
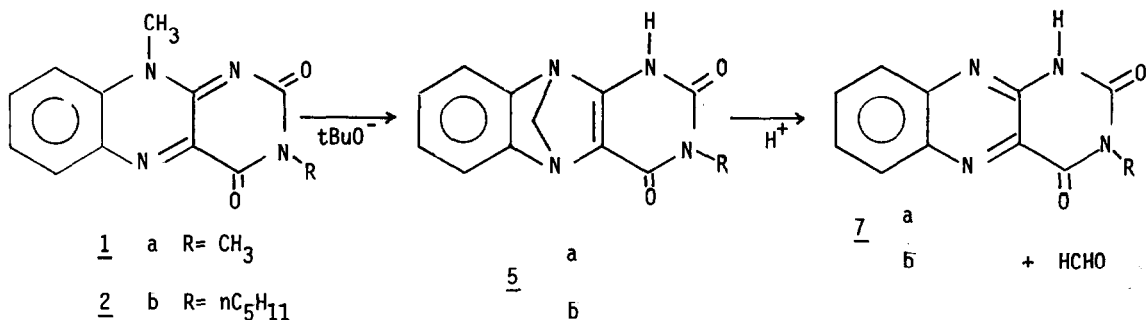
$$\lambda_{\text{max}} = 328, 382 \text{ et } 404 \text{ nm (CHCl}_3\text{)} \quad (11)$$

$$\log \epsilon (4,10; 4,08; 3,93)$$

. Cas des dérivés 3 et 4

- Par RMN H^1 , on ne constate aucune modification des signaux tant au niveau du noyau phényle situé en position N-10 qu'à celui du groupement alkyle situé en position N-3.
- Par RMN C^{13} , apparition d'un pic à 71 ppm correspondant à un atome de carbone quaternaire sp_3 .
- Par spectrographie de masse, le composé isolé présente une augmentation de masse de 18, par rapport au produit 3 ou 4.
- Enfin, la recherche de formation éventuelle du HCHO s'est avérée négative par la méthode du purpald (le dérivé 3 pouvant donner lieu à une déméthylation au niveau du groupement méthyle situé en position N-3).

Le schéma suivant illustre les résultats obtenus :



DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus avec les différents modèles étudiés, converge vers une réaction de déméthylation au niveau du groupement méthyle en position N-10, dans le cas des dérivés 1 et 2. Ce résultat exclut de façon formelle la possibilité de formation d'intermédiaires du type spirohydantoiné ou quinoxaline. De même qu'il faut exclure la possibilité d'une addition de $t\text{BuO}^-$ au niveau de la position 9a par analogie avec les travaux de Muller (6) dans le cas de l'attaque du modèle diméthyl-3,10 isoalloxazine, car d'une part par RMN on retrouverait le signal du groupement méthyle en position N-10 en même temps que devrait apparaître le signal intense du groupement tertibutyle, d'autre part pour des raisons évidentes d'ordre stérique, on ne peut envisager l'attaque de $t\text{buO}^-$ au niveau de la position C-9a.

Dans le cas de modèles substitués en position N-10 par un groupement alkyle différent de méthyle, éthyle et néopentyle, Knappe (5) expliquait la formation d'alloxazine et de l'oléfine en invoquant un possible intermédiaire cyclique à 6 atomes incluant les 2 atomes d'azote N-10 et N-1. Par contre, dans le cas où le modèle possède un groupement méthyle en position N-10, Knappe indique simplement que le rendement quantique de la photo-réduction est nul; il est probable que des contraintes stériques empêchent le passage par un intermédiaire de transition cyclique à 4 atomes.

Dans le cas des modèles 1 et 2, pour rendre compte de l'ensemble des résultats expérimentaux, nous sommes amenés à formuler l'hypothèse d'un intermédiaire diaminal impliquant les positions N-10 et N-5 du noyau flavine, diaminal sensible à une hydrolyse acide pour conduire à la formation de formaldéhyde. Les intermédiaires 5a et 5b permettent d'interpréter les résultats RMN (le pic apparaissant à 5,4 ppm étant attribué au méthylène, masqué par le signal élargi du proton fixé sur l'atome d'azote en position 1, ce dernier signal disparaît dans D₂O) et d'expliquer la formation simultanée de formaldéhyde et des dérivés alloxazines 7a et 7b, après hydrolyse acide. Un intermédiaire cyclique impliquant à la fois les positions N-10 et N-1 posséderait une structure à 4 atomes énergétiquement défavorable.

Il faut noter que cette réaction de déméthylation est spécifique des modèles isoalloxazines méthylés en position N-10, puisque dans le cas des composés 3 et 4, les résultats RMN H¹ et C¹³ et de spectrographie de masse suggèrent les structures attribuées aux composés 6a et 6b.

CONCLUSION

Seuls les modèles isoalloxazines porteurs d'un groupement méthyle sur l'atome d'azote en position 10 sont sujets à une réaction spécifique de déméthylation, la mise en évidence de production de formaldéhyde plaide en faveur d'un intermédiaire du type aminal sensible à l'hydrolyse acide, et dont la structure est en accord avec l'analyse RMN et UV.

Dans le cas précis de la diméthyl-3,10 isoalloxazine, il semble que l'atome d'azote en position 5 intervienne dans le mécanisme de déméthylation, alors que dans le cas où le substituant fixé sur l'atome d'azote en position 10 est différent de méthyl, d'autres sites d'attaque doivent être envisagés pour rendre compte des produits obtenus.

La nature du substituant fixé sur l'atome d'azote en position N-10 constitue un paramètre important sur le plan de la réactivité du noyau isoalloxazine; il faut être très prudent lors de l'extrapolation des résultats obtenus par l'étude des modèles de flavines méthylés en position N-10, aux cas de flavines biologiques, substituées en position N-10 par un groupement ribitylphosphate.

Remerciements : Nous remercions le Professeur B. BELLEAU de l'Université Mc Gill de Montréal, pour l'intérêt et les suggestions portés à ce travail. Ce travail a bénéficié de l'aide financière de la D.G.R.S.T. que nous tenons également à remercier.

BIBLIOGRAPHIE

1. J.L. KRAUS et B. BELLEAU, Can.J.Chem., 53,3241(1975).
2. J.L. KRAUS, J.J. YAOUANC et G. STURTZ, Eur.J.med.chem., 10,507(1975).
3. P. HEMMERICH, M. SCHUMANN-JORNS (1973) : Enzymes; structure and function (C.Veeger, J.Drenth et R.A.O. Osterbaun, Ed.5); FEBS Symposia, Vol.29, p.95-117, Netherlands, Amsterdam.
4. M. BRUSTLEIN, W.R. KNAPPE et P. HEMMERICH, Angew.Chem., 83,854(1971).
5. M. GLADYS et W.R. KNAPPE, Chem.Ber., 107,3658(1974).
6. F. MULLER, H.J. GRANDE et T. JARBANDHAN; Flavins and Flavoproteins, edited by T.P.SINGER (1976) Elsevier Scientific Publishing Compan., Amsterdam.
7. K.H. DUDLEY et P. HEMMERICH, J.Org.Chem., 32,3049(1967).
8. D.B. SMITH et T.C. BRUICE, J.Amer.Chem.Soc., 97,2875(1975).
9. L.E. BROWN et G.A. HAMILTON, J.Amer.Chem.Soc., 92,7225(1970).
10. J.J. YAOUANC, Thèse de 3e cycle, BREST, 1978.
11. T.P. FERISOVA, Zhur.Obshchei Khim., 40,1843,1970.

(Received in France 21 April 1978)