

MIGRATION REVERSIBLE DE PHOSPHORYLE S-P \rightleftharpoons N-P CONTROLÉE PAR TRANSFERT
 DE PROTON, MODELE D'ACTIVATION PAR PHOSPHORYLATION

par C BLONSKI⁺, M B. GASC, A KLAEBE⁺⁺, J J PERIE⁺

+ Equipe de Recherche Associée du Centre National de la Recherche Scientifique n°264

++ Equipe de Recherche Associée du Centre National de la Recherche Scientifique n°926

Bat IIR1, Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne

31062 Toulouse Cedex France

This work describes the reversible C-addition of a sterically hindered-P thiophosphoric ester to a carbodiimide, as a model of activated biotin

The formed intermediate, is found to be in equilibrium with the corresponding N-phosphorylated thiourea

The entire system is controlled by proton transfer and reversible

Nous avons récemment décrit ¹ l'isolement d'une forme énolique de thiourée S-phosphorylée, obtenue par réaction d'un thiodiester phosphorique sur le dicyclohexyl carbodiimide (DCC) composé qui constitue un modèle satisfaisant de O-phosphobiotine ² Cette dernière serait la forme activée de ce coenzyme par réaction avec l'ATP dans les réactions de carbonatation enzymo-catalysées (figure 1). Par ailleurs, nous avons montré ³ que certains analogues simplifiés de la biotine, urées et (thio) carbamates cycliques se comportent, en présence de réactifs phosphorylants, comme agents de transfert de phosphate efficaces sans pour celà que l'intermédiaire O-phosphorylé n'ait été observé directement par RMN de ³¹P Par contre le remplacement de l'atome d'oxygène par un soufre nous a permis d'isoler une forme S-phosphorylée. Ces résultats préliminaires sont compatibles avec le modèle initial (fig 1).

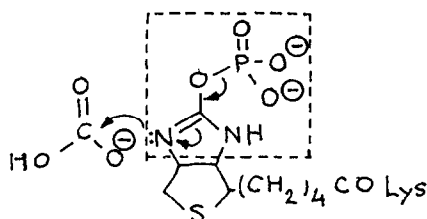


Figure 1

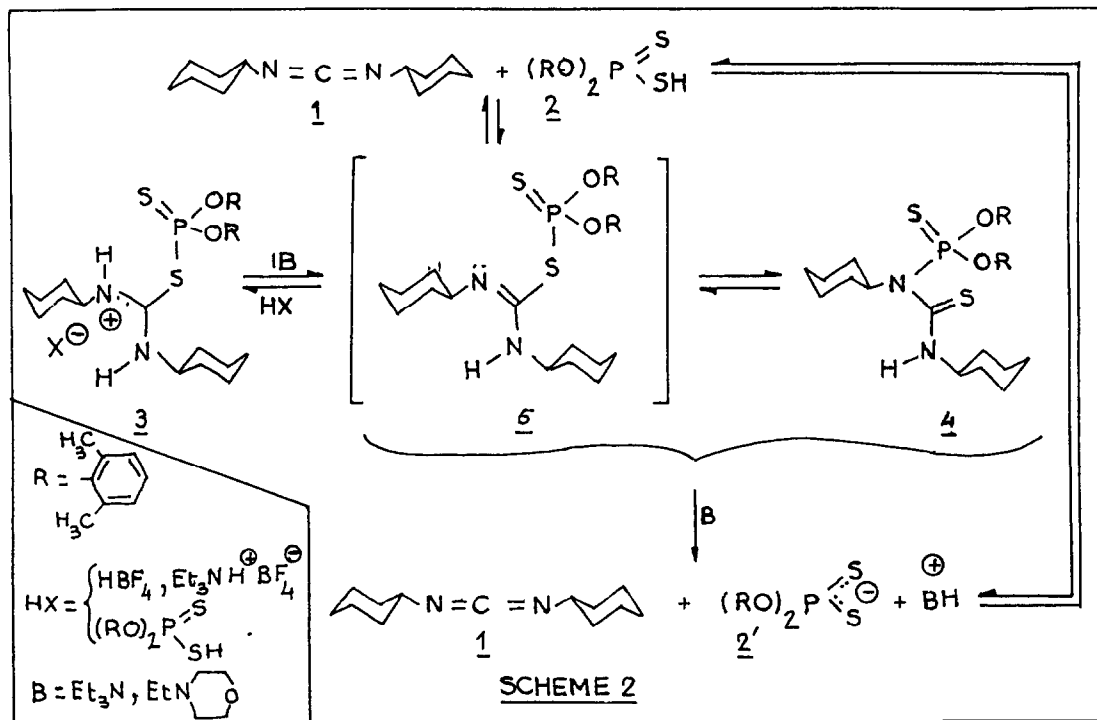
L'intérêt chimique et surtout biochimique de cette étude est essentiellement lié au rôle joué par le transfert de phosphate dans la réaction enzymatique (activation, régulation, couplage)⁴ La connaissance de la réactivité comparée des groupements phosphate et thiophosphate présente un intérêt supplémentaire étant donné l'utilisation de ces derniers comme marqueurs chimiques d'analogues d'ARN ou d'ATP (stéréochimie de la catalyse par les kinases)⁵.

L'addition du diester thiophosphorique encombré 2 sur le DCC 1 conduit soit à une isothiourée que nous avons réussi à stabiliser par protonation et isoler 3 soit à une thiourée N-phosphorylée 4 suivant les conditions expérimentales ¹ (CH₂Cl₂, rapport molaire DCC/thioester 1, HBF₄/Et₂O)

- Réarrangement S \rightleftharpoons N du groupement thiophosphorique (3 \rightleftharpoons 4)

L'évolution d'une solution de thiourée N-phosphorylée 4 dans le dichlorométhane suivie par RMN de ^{31}P montre la disparition de celle-ci ($\delta = 57$ ppm) au profit de 3 ($\delta = 67$ ppm) lorsque l'on ajoute au milieu un acide tel que BF_4H (schéma 1). Inversement l'isurée S-phosphorylée 3 ($\delta = 67$ ppm) traitée par un équivalent de base redonne la forme N-phosphorylée 4 ($\delta = 57$ ppm)

La transformation 3 \longrightarrow 4, qui implique une migration du groupement thiophosphorique par réarrangement intramoléculaire, est contrôlée par le pH et réversible.

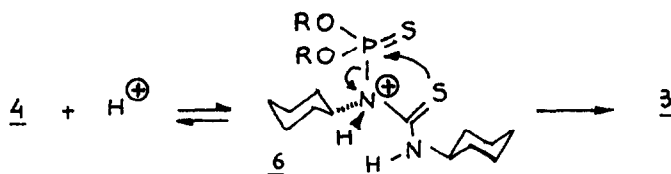


- Réversibilité totale de l'ensemble réactionnel

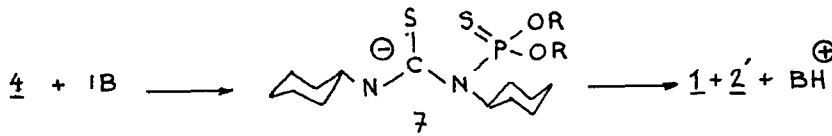
L'addition d'une base (triéthylamine ou éthyl-morpholine) à une solution de 4 ($\delta = 57$ ppm) dans CH_2Cl_2 , suivie par RMN de ^{31}P , provoque sa disparition au profit de l'anion diesterthiophosphorique 2' ($\delta = 109$ ppm) et du DCC 1 caractérisé par IR ($\nu_{\text{C=N}} = 2120 \text{ cm}^{-1}$). Le retour aux produits initiaux démontre la réversibilité complète du système.

Un certain nombre de possibilités concernant les mécanismes réactionnels sont à envisager

- le réarrangement 3 \longrightarrow 4 peut emprunter la voie décrite dans le schéma 1 c'est-à-dire passer par l'intermédiaire 5 qui est la base conjuguée de 3. La transformation 4 \longrightarrow 3 passant par un intermédiaire distinct 6 issu de la protonation de l'azote uréido N-P de 4 est également possible

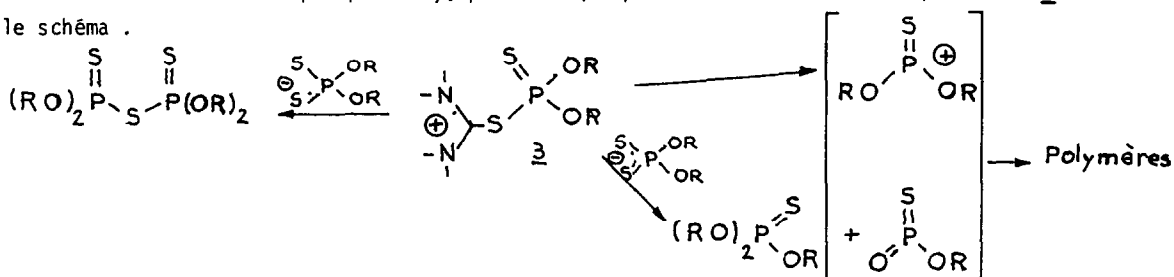


- La transformation $3 \rightleftharpoons 4 \rightarrow 1 + 2$ par action d'une base peut avoir lieu par arrachement d'un proton de l'intermédiaire 5 mais pourrait aussi se faire par la formation de l'amidure 7 à partir de 4



L'étude cinétique (en cours) de ces différentes étapes permettra d'en établir le mécanisme.

Il est à remarquer que ce système ne conduit qu'à un nombre limité de produits par rapport aux réactions possibles pas de pyrothiophosphate, ni triester ou polymères (ces derniers provenant de la formation d'un métaphosphate ⁷), produits qui pourraient être formés à partir de 3 , selon le schéma .



Ces résultats sont différents de ceux obtenus avec d'autres systèmes, addition d'acide thio ou sélénophosphonique sur le DCC ⁸ ou acide dithiophosphonique sur les nitriles ^{9,10}. Ce point a donc été confirmé de la façon suivante l'intermédiaire 3 mis en présence d'un excès de l'anion $2'$ (dans CH_2Cl_2) ne donne aucun des produits décrits dans le schéma précédent.

Ce résultat est vraisemblablement lié à la structure du substrat phosphoré utilisé les groupements aryloxy sur l'atome de phosphore sont difficilement éliminables par réaction de type Arbuzov et d'autre part les substituants méthyles en position 2,6 sur les cycles benzéniques protègent efficacement l'atome de phosphore d'une attaque nucléophile

La séquence de réactions observée montre la réversibilité totale du système chimique constitué par l'ester thiophosphorique, le DCC, l'isothiourée S-phosphorylée et la thiourée N-phosphorylée. L'énergie comparable des composants du système et l'absence de produits secondaires ont permis de mettre en évidence cette réversibilité le système s'avère donc intéressant comme modèle de transfert de phosphate et adapté à une étude cinétique.

Les résultats présentés ici, en particulier ceux relatifs à la réversibilité du système ont des implications par rapport aux données de la littérature dans ce domaine

- la synthèse d'oligonucléotides par la voie DCC ¹¹, réaction généralement considérée comme irréversible ,
- le mode d'inactivation de certains enzymes par ce réactif ¹² ,
- la mise en jeu d'intermédiaires du type de ceux décrits ici dans d'autres réactions, en particulier la synthèse des carbodimides à partir d'urées ou de thiourées en présence de phosphine ¹³

REFERENCES

- (1) C. BLONSKI, M B GASC, A. KLAEBE, J J PERIE, R. ROQUES, J.P. DE CLERCQ, G GERMAIN, J chem Soc , Perkin II, 7 (1982)
- (2) a- J. RETEY, F. LYNEN, Biochem. Z., 342, 256 (1965)
b- R KLUGER, P D ADAWADKAR, J. amer chem Soc., 98, 3741 (1976)
- (3) G. ETEMAD-MOGHADAM, A. KLAEBE, J.J. PERIE, Phosphorus and Sulfur, 12, 61 (1981)
- (4) J R KNOWLES, Ann. Rev. Biochem., 49, 877 (1980)
- (5) J. STINGELIN, D.W BOLEN, Et KAISER, J Biol.Chem ,255,2022 (1980)
- (6) Les caractéristiques (Analyse, IR, RMN et Masse) sont données dans la référence (1)
- (7) La voie métaphosphate a été décrite comme réaction possible de l'ATP cf. P. HAAKE, G W ALLEN, Bioorganic chem., 9,325 (1980)
- (8) M MIKOŁAJCZYK, P. KIEŁBASINSKI, Tetrahedron, 37, 233 (1981)
- (9) S A BENNER, Tetrahedron Letters, 22, 1855 (1981)
- (10) A.N PUDOVIK, M.G ZIMIN, Pure and Applied Chem., 52, 989 (1981)
- (11) H G. KHORANA, "Some recent developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological interest", Wiley, New-York (1961)
- (12) A WILLIAMS, I T IBRAHIM, Chem Rev., 81,589 (1981)
- (13) R APPEL, Angew Chem Internat Edit , 14,801 (1975)

(Received in France 23 March 1982)