

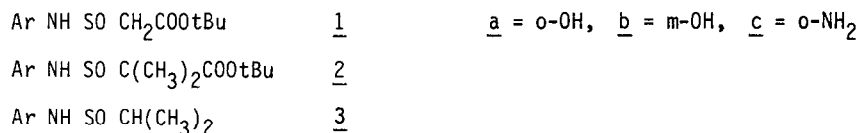
UNE NOUVELLE CLASSE D'INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES :
LES SULFINAMOYLESTERS PRÉCURSEURS DE SULFINES

Michel BALTAS, Louis CAZAUX, Liliane GORRICHON-GUIGON, Pierre MARONI et Pierre TISNES

Laboratoire de Synthèse et Physicochimie organique, Unité Associée au CNRS n° 471,
Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 TOULOUSE CEDEX (FRANCE)

ABSTRACT : Tert-butyl N-aryl sulfinamoyl acetates are hydrolyzed in aqueous basic media following a bimolecular elimination process, via an intermediate sulfine species. The use of sulfinamoyl compounds as irreversible inactivators for zinc-metallo-enzymes is emphasized.

La recherche d'inhibiteurs spécifiques de la lignification nous a conduits à rechercher pour cible une déshydrogénase à zinc et à cofacteur NADPH qui catalyse l'étape ultime de la biosynthèse des monomères des lignines ^{1,2} : la CADH, alcool cinnamylique déshydrogénase (NADP⁺) (EC 1.1.1.-). Définissant des inhibiteurs en fonction du rôle du zinc au niveau du site actif de la protéine, nous nous sommes intéressés à des nouveaux dérivés soufrés complexant du zinc ³ : les β-sulfinamoylesters 1 et 2.



Si certaines sulfinamides présentent une activité inhibitrice faible (1b) ou nulle (2 et 3), en revanche d'autres (1a et 1c) constituent des inhibiteurs sélectifs et efficaces de l'enzyme choisi ^{1a,1b}. Les résultats de dialyse et de cinétique enzymatique conduisent Boudet et al à proposer une inhibition pseudo-irréversible qui pourrait être de type suicide ^{1b}.

Comment et en quoi les sulfinamoylesters se transformeraient-ils au sein de la protéine ? La démarche suivie suppose que le site actif de la CADH est constitué essentiellement d'un ion Zn⁺⁺ auquel est lié une molécule d'eau comme dans la plupart des métalloenzymes à zinc ⁴ et que cette molécule d'eau peut intervenir dans le processus d'inactivation. Les premiers résultats rapportés ici relatifs à l'hydrolyse de ces composés suggèrent l'intervention de sulfine ester.

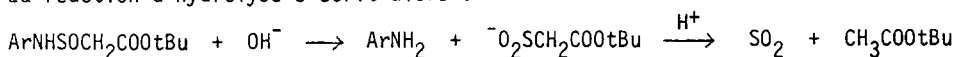
Les sulfines ⁵, électrophiles analogues soufrés des cétènes, constitueraient donc une nouvelle classe d'inhibiteurs irréversibles encore inexplorée à ce jour ⁶.

Hydrolyse des N(o-hydroxyphényl) et N(m-hydroxyphényl) acétates de tert-butyle 1a et 1b

- Conditions expérimentales : les cinétiques d'hydrolyse des sulfinamoylesters 1a et 1b ont été suivies par spectrométrie UV en enregistrant la décroissance de l'absorption à 300 nm résultant de la formation de l'aminophénol correspondant pour des pH compris entre 8,5 et 12.

- Identification des produits : l'analyse en CPG du milieu réactionnel extrait à l'éther avant et après neutralisation permet d'identifier dans le premier cas uniquement l'aminophénol, dans le second l'aminophénol et l'acétate de tert-butyle. La séparation par chromatographie liquide haute pression sur phase inverse des composants du mélange basique a permis d'isoler un produit dont les spectres sont en accord avec la structure sulfinatoacétate de tert-butyle $^+Na^-O_2SCH_2COOtBu$. SM : $m/z = 101$, CO_2tBu ; $m/z = 64$, SO_2 ; r.m.n. 1H : δ ppm ($CDCl_3$) : 1,45 (9H, s, tert-Bu) ; 3,25 (2H, s, CH_2).

La réaction d'hydrolyse s'écrit alors :



- Principaux résultats :

- La présence d'un point isosbestique indique qu'il n'y a pas d'accumulation d'espèces intermédiaires ;
- pour tous les tampons utilisés, on observe une catalyse basique générale ;
- la variation en fonction du pH du logarithme des constantes de vitesse extrapolées à concentration nulle en tampon (k'_0) présente un profil sigmoïdal (fig. 1) en accord avec l'équation de vitesse :

$$k'_0 = k_{OH} \frac{[H^+]}{K_A + [H^+]} [OH^-] + k'_{OH} \frac{K_A}{K_A + [H^+]} [OH^-]$$

où K_A est la constante d'ionisation du groupement phénolique ; k_{OH} et k'_{OH} sont respectivement les constantes de vitesse d'attaque de l'ion hydroxyle sur les formes neutre (phénol) et déprotonée (phénate) du substrat.

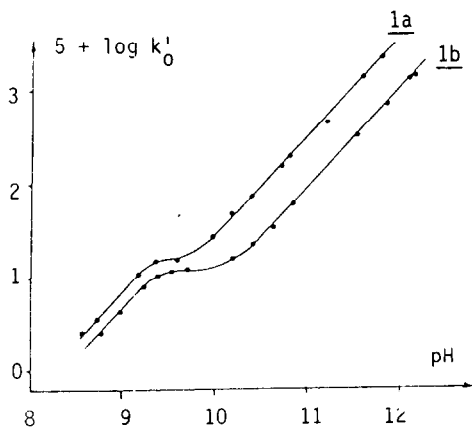


Figure 1

Graphique du logarithme des constantes de vitesse k'_0 extrapolées à concentration en tampon nulle en fonction du pH ($\mu = 1,0$, KCl ; $T = 293^\circ K$)

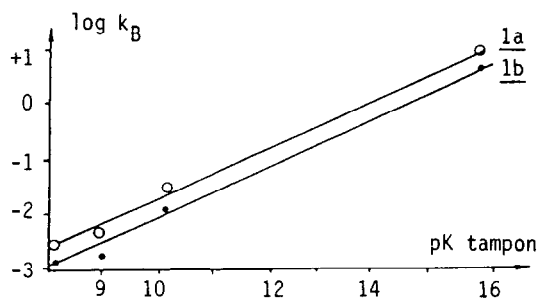


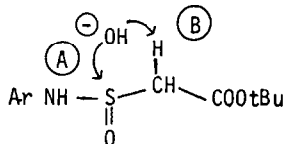
Figure 2

Droites de Brønsted pour la catalyse basique générale des composés 1a et 1b ($\mu = 1,0$, KCl ; $T = 293^\circ K$)

- Les courbes de Brønsted pour 1a et 1b (fig. 2) sont des droites de pente voisine (0,46-0,47), le point correspondant à l'ion OH^- s'alignant sur la droite définie par les tampons.
- Les effets isotopiques mesurés dans NaOH et NaOD $9,6 \cdot 10^{-3}\text{M}$ sont respectivement $k_{\text{OH}}/k_{\text{OD}} = 2,1$ et $2,3$ pour 1a et 1b ($\mu = 1,0$, KCl).

DISCUSSION

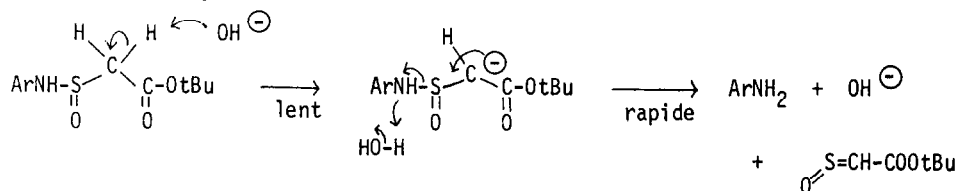
Compte-tenu de l'analyse des produits finaux, deux mécanismes peuvent être éliminés : l'hydrolyse de la fonction ester et un mécanisme d'attaque de base sur la fonction NH ; deux mécanismes sont en revanche compatibles avec cette analyse : un mécanisme $\text{B}_{\text{AC}}2$ d'attaque nucléophile sur l'atome de soufre (A) ou une élimination avec attaque de base sur le groupe méthylénique (B)



. Pour un mécanisme $\text{B}_{\text{AC}}2$ de type (A), d'une part l'effet isotopique devrait être voisin de 1, d'autre part l'ion hydroxyle devrait agir comme nucléophile et non comme base générale et le point correspondant devrait s'écarter notablement de la droite de Brønsted définie par les tampons, ce que nous n'avons pas observé.

Nous proposons donc un mécanisme (B) impliquant l'arrachement lent par la base d'un atome d'hydrogène méthylénique activé à la fois par les groupes ester et sulfinamoyle situés en position α et α' .

. Il y aurait, dans une étape ultérieure rapide, protonation de l'azote, concertée ou non avec le départ de l'amine aromatique et formation intermédiaire de la sulfine $\text{O}=\text{S}=\text{CH}-\text{COOtBu}$. Celle-ci est ensuite rapidement hydrolysée pour donner le produit final, l'ion sulfinato-acétate de tert-butyle :



Ce mécanisme est compatible avec un effet isotopique de 2 traduisant un transfert lent de proton et avec la pente de la droite de Brønsted, l'ion hydroxyle agissant bien comme base générale en accord avec sa position sur cette droite. D'autre part, le comportement très semblable des composés 1a et 1b indique que la position du substituant hydroxyle en ortho ou méta a une incidence mineure sur le déroulement de la réaction. Par contre, le mécanisme $\text{B}_{\text{AC}}2$ est le seul envisageable pour le composé 2 possédant un proton en α du groupe sulfinyle faiblement activé et pour 3 qui ne porte aucun proton dans cette position. Pour ces derniers, nous avons constaté une vitesse d'hydrolyse considérablement plus lente que celle des composés 1a et 1b. Ce changement de mécanisme pourrait éventuellement rendre compte de leur inactivité biologique.

En conclusion, les sulfinamides L-NH-SO-^lCH-A comportant à la fois un groupe labile (L) et un proton activé en α du groupe sulfinyle peuvent être de bons précurseurs de sulfines et permettre d'accéder, dans des cas favorables, à une nouvelle classe d'inhibiteurs irréversibles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1) a - A. Boudet, L. Cazaux, L. Gorrichon, C. Grand, Brevet Français 1984, n° 8402582 (en cours d'extension)
b - C. Grand, F. Sarni et A.M. Boudet, Planta, 1985, 163, 232
c - M. Baltas, Doctorat de 3^{ème} cycle, Toulouse, 1984
- 2) D. Wyrambik et H. Grisebach, Eur. J. Biochem., 1975, 59, 9
- 3) a - M. Baltas, J.D. Bastide, L. Cazaux, L. Gorrichon, P. Maroni et P. Tisnès, Spectrochim. Acta Part A, 1985, 41A, 793
b - M. Baltas, J.D. Bastide, A. de Blic, L. Cazaux, L. Gorrichon, P. Maroni, M. Perry et P. Tisnès, Spectrochim. Acta Part A, 1985, 41A, 789
- 4) M.F. Dunn, "Structure and Bonding", Springer Verlag, 1975, vol. 23, 61
- 5) B. Zwanenburg, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1982, 101, 1
- 6) C. Walsh, Tetrahedron, 1982, 38, 871

(Received in France 10 June 1985)