

102. Influence de composés à hétérocycle azoté et particulièrement d'azoles non condensés sur des réactions «prébiotiques» de condensation d'acides α -aminés induites par les polyphosphates en milieu aqueux

par Joseph Rabinowitz et Aïoub Hampai¹⁾

Centre universitaire d'écologie humaine et des sciences de l'environnement de l'Université de Genève,
CH-1211 Genève 4

(14.IV.80)

Influence of Nitrogen Heterocyclic Compounds and of Non Condensed Azoles in Particular on 'Prebiotic' Condensation Reactions of α -Amino Acids Induced by Polyphosphates in Aqueous Solution

Summary

In previous experiments aqueous solutions of α -aminoacids in the presence of cyclic or linear polyphosphates, pH range 7–11, yielded up to 40% of dipeptide but only 0.3–0.5% of tripeptide [1] [2]. By addition of imidazole the yield of tripeptide could be increased about ten times [2]. Therefore, we have studied for the condensation reaction of glycine the influence of the addition to aqueous solutions 0.1M in glycine and 0.1M in trimetaphosphate at room temperature, pH range 6.7–8.9, of several azoles (pyrrole, pyrazole, imidazole, 1,2,4-triazole and tetrazole), of adenine, guanine, uracil, cytosine, and of several nucleosides (adenosine, guanosine, uridine and cytidine). Among the products studied, only 1,2,4-triazole and imidazole improve appreciably, by a factor of about 15, the yield of triglycine (up to 7.8%). While it is very likely that imidazole has played an important role during prebiotic chemical evolution, it is not clear at present whether 1,2,4-triazole has a prebiotic significance.

Nous avons montré que dans la réaction «prébiotique» de condensation d'acides α -aminés induite par les polyphosphates en milieu aqueux [1] [2], l'addition d'imidazole à une solution aqueuse d'acide aminé et de trimetaphosphate à des pH voisins de la neutralité décuplait à peu près le rendement auparavant très faible (0,3–0,5%) en tripeptide [2]. Il nous a paru dès lors intéressant d'examiner l'influence de toute une série d'azoles non condensés (avec 1, 2, 3 et 4 atomes de N), de bases puriques et pyrimidiques ainsi que de nucléosides sur cette réaction dans le cas de la glycine.

Les azoles choisis, leur pK_a (basique et acide) ainsi que les constantes de vitesse d'hydrolyse de leurs dérivés *N*-monoacétylés (azolides) [3] figurent dans le

¹⁾ Laboratoire central de chimie clinique, division de pédiatrie, Hôpital cantonal, 1211 Genève 4.

Tableau 1. pK_a de quelques azoles et constantes de vitesse d'hydrolyse (k') et temps de demi-scission ($t_{1/2}$) des azolides monoacétylés correspondants à pH 7,0 et 25° d'après [3]

Azole	pK_a		Acétyl-x-azole x	$k' \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	$t_{1/2} \text{ min.}$
	Basique	Acide			
Pyrrole	–	16,5	1	$\rightarrow 0$	$\rightarrow \infty$
Pyrazole	2,5	–	1	1,27	908
Imidazole	6,95	14,52	1	28,1	41
Triazole-1,2,4	1	~ 10	1	180	6,4
Tétrazole	–	4,8	2	> 2000	$\sim 0,5$

Tableau 1. Quant aux glycinazolides, on connaît les constantes de vitesse de scission dans l'eau du glycyl-1-imidazole [4], mais non celles des dérivés des autres azoles du *Tableau 1*, les constantes en question de ces azolides n'ayant pas été déterminées ou les composés eux-même n'étant pas connus. L'intérêt du glycyl-1-imidazole réside dans le fait qu'il donne dans l'eau un maximum de tri- et poly-glycines entre pH 6 et 9, rangée de pH particulièrement importante en chimie prébiotique, et qu'il pourrait être un des produits intermédiaires conduisant à la formation de tripeptide dans la réaction citée plus haut [2].

Les réactions ont été effectuées en solution 0,1 M en glycine, 0,1 M en triméthaphosphate et 0,3 M en composé organique ajouté (azole, base purique ou pyrimidique ou nucléoside); ces dérivés hétérocycliques n'étaient pas tous entièrement solubles (*cf. Tabl. 2*). Le pH de chaque solution (ou mélange) a été ajusté à 8,9 (8,6 pour les trois premiers essais) avec acide chlorhydrique conc. ou ammoniacque conc. et ramené tous les jours à ce pH par addition d'ammoniacque conc. Après 14–20 jours à température ordinaire (20°), les rendements en diglycine, triglycine, glycinamide et diglycinamide ont été déterminés par chromatographie sur des parties aliquotes de ces solutions. Les résultats, consignés dans le *Tableau 2*, montrent qu'en dehors de l'imidazole, seul le triazole-1,2,4 augmente de façon notable le rendement en triglycine (5,2% au lieu de 0,5% ou moins en absence de triazole-1,2,4). Les bases puriques et pyrimidiques ainsi que les nucléosides bien qu'augmentant légèrement le rendement en diglycine, ne semblent par contre pas avoir d'effet sur la formation de triglycine. Nous n'avons pas cherché à identifier les dérivés phosphorylés éventuellement formés lors de la réaction en présence de nucléosides. L'influence d'une addition supplémentaire d'ions magnésium est relativement faible, mais cet ion pourrait jouer un rôle intéressant en tant que catalyseur de transformation de polyphosphates linéaires en triméthaphosphate en milieu aqueux [2].

Après la période d'observation à 20°, nous avons placé huit des solutions du *Tableau 2* (*cf. Tabl. 3*) à 4°; au bout de 81 jours nous en avons choisi six (*cf. Tabl. 3*) dont chacune a été divisée en deux parties égales qui ont été gardées encore 40 jours, les unes à 4° et les autres à température ordinaire (20°) mais en ajustant alors le pH à 8,9 tous les 3–4 jours. Ensuite, toutes les solutions ont été analysées. Les résultats (*cf. Tabl. 3*) confirment que seuls l'imidazole et le triazole-1,2,4 augmentent considérablement le rendement en tripeptide, soit 5,2% de triglycine avec l'imidazole et 7,8% avec le triazole-1,2,4. Notre méthode d'analyse chromatographique (voir partie expérimentale) ne permet pas de séparer

Tableau 2. *Formation de diglycine et de triglycine*, à 20° après 14-20 jours à pH 6,0-8,9, à partir de solutions aqueuses 0,1M en glycine et 0,1M en trimétaphosphate de sodium, additionnées ou non de composés hétérocycliques azotés avec ou sans MgCl₂ de manière à rendre la solution respectivement 0,3M (ou saturée) et 0,1M en ces substances

Composé azoté additionné	pH du mélange	pH de la réaction rangée ^{c)}	Durée (jours)	Rendement en % par rapport à la glycine initiale		
				Diglycine	Triglycine	Glycinamide
-	5,9	8,2-8,6	14	9,3	≤ 0,5	0,6
Pyrrole	8,2	8,2-8,6	14	9,2	≤ 0,5	0,6
Pyrrole + MgCl ₂ ^{b)}	7,8	7,1-8,6	14	9,9	≤ 0,5	1,4
-	5,8	7,8-8,9	20	14,0	≤ 0,5	1,5
Pyrrolidine	11,5	8,2-8,9	20	8,3	≤ 0,5	0,5
Pyrazole	5,9	7,9-8,9	20	14,6	≤ 0,5	0,5
Imidazole	8,8	8,1-8,9	20	18,8	3,4	3,8 ^{d)}
Triazole-1,2,4	5,9	8,2-8,9	20	23,0	5,2	2,0 ^{d)}
Triazole-1,2,4 + MgCl ₂ ^{b)}	5,1	6,7-8,9	20	23,6	5,5	3,2 ^{d)}
Tétrazole	3,2	8,0-8,9	20	12,3	≤ 0,5	4,3
Adénine ^{a)}	6,0	8,0-8,9	20	17,9	≤ 0,5	1,3
Adénine ^{a)} + MgCl ₂ ^{b)}	5,1	6,2-8,9	20	17,0	≤ 0,5	1,6
Guanine ^{a)}	5,5	7,7-8,9	20	18,9	≤ 0,5	1,3
Thymine ^{a)}	5,9	8,1-8,9	20	18,7	≤ 0,5	1,3
Uracile ^{a)}	5,7	8,0-8,9	20	15,8	≤ 0,5	1,2
Adénosine ^{a)}	5,8	7,5-8,9	20	17,0	≤ 0,5	1,4
Adénosine ^{a)} + MgCl ₂ ^{b)}	5,0	6,0-8,9	20	17,7	≤ 0,5	2,2
Guanosine ^{a)}	5,7	7,8-8,9	20	17,2	≤ 0,5	1,2
Thymidine ^{a)}	5,7	7,9-8,9	20	17,4	≤ 0,5	1,7
Uridine	5,7	8,3-8,9	20	16,7	≤ 0,5	3,0

a) Produits peu solubles dans H₂O: se trouvent donc en solution saturée.

b) Apparition d'un précipité de plus en plus abondant de phosphate ammoniaco-magnésien au cours de la réaction.

c) Le pH (qui diminue en cours de réaction) est amené au début au pH de droite avec des solutions conc. de NH₃ ou de HCl et ajusté chaque jour à cette valeur avec la solution conc. de NH₃; le chiffre de gauche représente le pH minimum observé durant la réaction.

d) En outre, environ 0,5% de diglycinamide.

de la diglycine la tétraglycine éventuellement formée (qui échappe donc à l'observation).

Tout comme pour l'imidazole, on pourrait émettre l'hypothèse que des dérivés phosphorylés du triazole-1,2,4 ou encore son azolide avec la glycine pourraient jouer le rôle de produits intermédiaires dans cette formation de triglycine, et cela bien que le triazole-1,2,4 soit moins basique que l'imidazole (*cf. Tabl. 1*); par ailleurs il se trouve que, parmi les azoles étudiés, c'est le triazole-1,2,4 dont le dérivé acétylé possède la constante de vitesse d'hydrolyse la plus proche de celle du dérivé acétylé de l'imidazole, et on peut supposer qu'il en serait de même pour les dérivés aminoacétylés (glycyl-1-imidazole et glycyl-1-triazole-1,2,4) correspondants.

L'imidazole est un catalyseur de transfert des groupements phosphate et acyle dans des réactions biochimiques modèles. Son noyau joue un rôle important dans la biochimie des organismes contemporains, ce qui n'est pas le cas de celui du

Tableau 3. *Formation de diglycine et de triglycine à partir de quelques solutions du Tableau 2 après un séjour supplémentaire soit de 121 jours à 4°, soit de 81 jours à 4° et ensuite de 40 jours à 20° (pendant la réaction à 20°, on ramène tous les 3-4 jours le pH de la solution à 8,9 avec une solution de NH₃ conc.)*

Composé azoté additionné	Durée supplémentaire de réaction		pH du mélange		Rendement en % par rapport à la glycine initiale		
	A 4° d (jours)	A 20° d (jours)	Après réaction à 4°	Pendant réaction à 20°	Diglycine	Triglycine	Glycinamide
a)	81	40	7,9	7,9-8,9	17,3	≤0,5	1,9
	121	-	8,0	-	15,3	≤0,5	2,2
Pyrazole	81	40	8,0	8,0-8,9	18,6	≤0,5	2,2
	121	-	8,0	-	15,8	≤0,5	1,2
Imidazole	81	40	8,3	8,3-8,9	24,0	5,2	4,9 ^{b)}
	121	-	8,3	-	23,4	5,0	3,1 ^{b)}
Triazole-1,2,4	81	40	8,3	8,3-8,9	28,6	7,4	3,8 ^{b)}
	121	-	8,2	-	26,8	6,4	2,4 ^{b)}
Triazole-1,2,4 + MgCl ₂	81	40	8,6	8,6-8,9	29,9	7,8	5,1 ^{b)}
	121	-	8,4	-	28,9	7,7	4,5 ^{b)}
Tétrazole	81	40	8,7	8,7-8,9	15,2	≤0,5	6,7
	121	-	8,6	-	15,9	≤0,5	6,4
Adénosine	121	-	8,2	-	20,8	≤0,5	2,8
Uridine	121	-	8,7	-	19,1	≤0,5	4,9

a) Il s'agit de la 4^e solution du Tableau 2, c'est-à-dire après 20 jours de réaction à pH 7,8-8,9.

b) En outre, environ 0,5% de diglycinamide.

triazole-1,2,4. Si on peut déjà se faire une idée sur le rôle que l'imidazole et ses dérivés ont pu jouer au cours de l'évolution chimique prébiologique, il serait pour le moment prématuré de vouloir se prononcer sur l'éventuelle signification du triazole-1,2,4 en chimie prébiotique.

Les auteurs remercient les Prof. E. Cherbuliez, H. Greppin et P. Moeschler de l'Université de Genève de leur intérêt pour ce travail.

Partie expérimentale

1. *Produits de départ et de référence*: obtenus dans le commerce. Le trimétaphosphate de sodium nous a été fourni gracieusement par *Monsanto Chemical Company* (St. Louis, Missouri).

2. *Analyses chromatographiques* de glycine, diglycine, triglycine, glycinamide et diglycinamide: effectuées à l'aide d'un analyseur d'acides aminés «*Chromaspeak Rank Hilger*» à intégrateur automatique, gradient de pH 2,2-11,3 environ. Au préalable l'appareil est calibré avec des quantités connues des 5 composants dosés, avec un programme de courte durée mis au point par nous et donnant les temps d'élution suivants (en min.): glycine 33,7; diglycine 45,6; triglycine 47,8; diglycinamide 62,2; glycinamide 64,4; ammoniac 81,7. Les azoles et autres dérivés hétérocycliques ne donnent pas de pics (pas de réaction avec la ninhydrine) dans nos conditions expérimentales. On dilue alors une partie aliquote de l'échantillon avec 49 volumes d'un tampon à pH 2,1 et analyse 150 µl de la dilution obtenue.

3. *Effets de l'addition d'azoles, de bases puriques, de bases pyrimidiques et de nucléosides respectivement sur la condensation de la glycine dans des solutions aqueuses de trimétaphosphate.* On prépare une solution de 12,24 g de trimétaphosphate dans 200 ml d'eau (0,2M) et une solution de 3,0 g de glycine dans 200 ml d'eau (également 0,2M). On prélève 5 ml de la solution de glycine, ajoute 3 mmol d'azole, de base purique, de base pyrimidique ou de nucléoside respectivement et éventuellement 1 mmol de MgCl_2 , puis finalement 5 ml de la solution de trimétaphosphate. Les solutions ou mélanges ainsi constitués sont 0,3M (ou saturés) en composé hétérocyclique et le cas échéant 0,1M en MgCl_2 . Chaque échantillon est amené au pH voulu (8,6 ou 8,9) avec des solutions aqueuses concentrées de HCl ou de NH_3 . On laisse reposer les solutions finales à température ordinaire (20°); une fois par jour, on mesure le pH et le ramène à la valeur initiale avec une solution conc. de NH_3 . Lorsqu'il s'agit de mélanges avec des composés hétérocycliques non complètement dissous, on les agite lors du contrôle du pH. Au bout de 14 jours pour les 3 premiers essais et 20 jours pour les suivants, on analyse chaque solution selon la méthode décrite sous 2; les rendements rapportés à la glycine initiale sont consignés dans le *Tableau 2*.

Ensuite huit de ces solutions (voir *Tabl. 3*) sont placées à 4°; au bout de 81 jours on en prélève 6 (voir *Tabl. 3*) qu'on divise en 2 prises dont on conserve, l'une à 4° et l'autre à température ordinaire encore 40 jours. Dans les essais à température ordinaire, on corrige le pH à 8,9 tous les 3–4 jours avec une solution concentrée de NH_3 . Ensuite, toutes ces solutions sont analysées comme plus haut. Les résultats sont résumés dans le *Tableau 3*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. Rabinowitz, J. Flores, R. Krebsbach & G. Rogers, *Nature* 224, 795 (1969); J. Rabinowitz, *Helv.* 52, 2663 (1969); 53, 1353 (1970).
- [2] J. Rabinowitz & A. Hampai, *Helv.* 62, 829 (1979).
- [3] *Comprehensive Organic Chemistry*, Vol. 4. Heterocyclic Compounds, ed. P.G. Sammes (The City University London), Pergamon Press, Oxford 1979.
- [4] A. L. Weber & J. C. Lacey, jr., *Biochim. biophys. Acta* 349, 226 (1974).