

CATALYSE BIFONCTIONNELLE—V RECONJUGAISON DE LA Δ^5 CHOLESTENONE

A. KERGOMARD et M.-F. RENARD

Université de Clermont-Ferrand, 17, ter Rue Paul Collomp, 63, Clermont-Ferrand, France

(Received in France 28 July 1971; Received in the U.K. for publication 5 January 1972)

Résumé. On a étudié la reconjugaison de la Δ^5 cholesténone en solution benzénique catalysée par des acides carboxyliques et des mélanges phénols-amine. Le caractère bifonctionnel de la réaction est démontré et, pour la catalyse par les acides carboxyliques, on propose un mécanisme faisant intervenir deux molécules d'acide.

ON SAIT DEPUIS LONGTEMPS que la mutarotation du glucose et du tétraméthylglucose (TMG) est catalysée dans l'eau par les acides et les bases.¹ Dans les solvants aprotiques, de nombreux auteurs^{2, 3, 4} ont montré que la réaction était bifonctionnelle. Nous mêmes avons étudié^{5, 6} dans le benzène, l'activité catalytique des acides carboxyliques et des paires d'ions formées par les mélanges de phénols et d'amines. Nous avons également constaté que les acides et les bases monofonctionnels n'avaient seuls, aucune action catalytique alors qu'il est connu que dans l'eau ces mêmes réactifs monofonctionnels (HCl, phénols, amines, OH⁻) provoquent la mutarotation. Ces résultats ne sont contradictoires qu'en apparence, en effet, de par son caractère amphotère l'eau participe à la réaction et masque ainsi le caractère bifonctionnel.

Ainsi en catalyse basique, l'hydroxyle en 1 est attaqué par le réactif nucléophile, mais le rôle de catalyseur électrophile est joué par une molécule d'eau dont un proton est attaqué par l'oxygène pontal (Fig 1).



FIG. 1. Catalyse basique de la mutarotation du glucose dans l'eau.

C'est l'inverse en catalyse acide où l'oxygène pontal attaque le réactif électrophile, mais dans ce cas le proton de l'oxydrile en 1 est attaqué par une molécule d'eau jouant le rôle de réactif nucléophile (Fig 2).



FIG. 2. Catalyse acide de la mutarotation du glucose dans l'eau.

Le benzène au contraire ne comporte aucun site nucléophile ou électrophile pouvant participer à la réaction, ce qui rend ce solvant précieux pour l'étude de ce genre de mécanisme.

La mutarotation du TMG dans le benzène est généralement considérée comme un bon modèle pour l'étude de la catalyse bifonctionnelle, catalyse qui peut être importante dans les processus enzymatiques. C'est d'ailleurs dans cette optique que nous avons utilisé comme catalyseur de cette réaction les deux énantiomères de l'acide naphtoxypropionique.⁷ Nous avons ainsi pu mettre en évidence une stéréosélectivité qui bien que faible constitue néanmoins un résultat encourageant. Cependant, le TMG ne présente pas une stéréochimie assez fixe pour permettre une étude plus poussée des nombreux problèmes restants, en particulier du problème de la distance entre sites actifs dans les paires d'ions.

Nous avons alors pensé étudier la reconjugaison de Δ^5 céto-3 stéroïdes dont la stéréochimie très rigide se prêtait bien à l'étude des distances.

La reconjugaison de Δ^5 céto-3 stéroïdes a été étudiée par Jones et Wigfield⁸ qui ont montré, en milieu aqueux une catalyse par les acides, les bases et certaines enzymes. La détermination des paramètres thermodynamiques d'activation montre que l'activité catalytique de l'enzyme est caractérisée par une forte diminution du facteur enthalpique (Tableau 1). Comme dans le cas de la mutarotation du TMG on peut penser qu'en milieu aqueux le caractère bifonctionnel de la réaction est masqué par le caractère amphotère de l'eau. Cette réaction a également été étudiée par Ringold et Malhotra⁹ qui se sont intéressés à l'activité catalytique de l'isomérase extraite de *Pseudomonas testosteroni*. Etudiant la stéréochimie du transfert du proton du carbone 4 au carbone 6, ces auteurs ont pu montrer, par étude de produits deutériés, que ce transfert était diaxial c'est-à-dire s'effectuait par la face β , point qui peut d'ailleurs paraître surprenant à cause de l'encombrement de cette face par le méthyle 19. Par contre Torgov¹⁰ dans une étude de cette même réaction par un extrait de placenta humain a montré que dans ce cas, le transfert était diéquatorial. Plus récemment Jones et Wigfield¹¹ ont proposé un mécanisme pour l'action de l'isomérase de *Pseudomonas testosteroni*, mécanisme qui fait appel à deux sites actifs d'une chaîne protéique enzymatique, le site nucléophile serait constitué par une molécule d'imidazole (provenant sans doute d'un chaînon histidine) alors que le site électrophile serait constitué par un phénol (provenant sans doute d'un chaînon tyrosine).

Nous avons donc étudié la reconjugaison de la Δ^5 cholesténone en milieu benzénique en utilisant les catalyseurs déjà employés pour l'étude de la mutarotation du TMG: les acides carboxyliques et les paires d'ions.

Catalyse par les acides carboxyliques

Nous avons utilisé un certain nombre d'acides carboxyliques pour catalyser la reconjugaison de la Δ^5 cholesténone après avoir vérifié qu'en solution benzénique les acides monofonctionnels tels que les phénols ne provoquaient aucune isomérisation, même s'il s'agit de phénols aussi acides que l'acide picrique ou le dinitro-2,4 phénol. La faible vitesse de la réaction nous a obligé à limiter notre étude à des acides forts: acide trifluoracétique, trichloracétique, dichloracétique. Pour chacun de ces acides nous déterminons la vitesse de reconjugaison par des mesures polarimétriques,

les valeurs des pouvoirs rotatoires des deux cholesténones étant très différentes ($\alpha_{20}^D = 5^\circ$ pour la Δ^5 , $\alpha_{20}^D = +88^\circ$ pour la Δ^4).^{1,2}

Nous écrivons la loi cinétique sous la forme

$$v = k' (\text{cholesténone}) (\text{acide})^n = k (\text{cholesténone}).$$

Expérimentalement les mesures polarimétriques conduisant à

$$k_{\text{exp}} = \frac{v}{(\text{cholest})} = k' (\text{catalyseur})^n$$

α_∞ rotation au temps ∞

$$k_{\text{exp}} t = 2.3 \log \frac{\alpha_\infty - \alpha_0}{\alpha_\infty - \alpha_t}$$

α_0 rotation au temps 0

α_t rotation au temps t

' Nous avons déterminé k_{exp} pour un certain nombre de valeurs de la concentration d'un même acide. On trouvera ces valeurs en partie expérimentale (Tableau 2). Si nous reportons ces valeurs sur le graphique de la Fig 3 nous constatons que la courbe

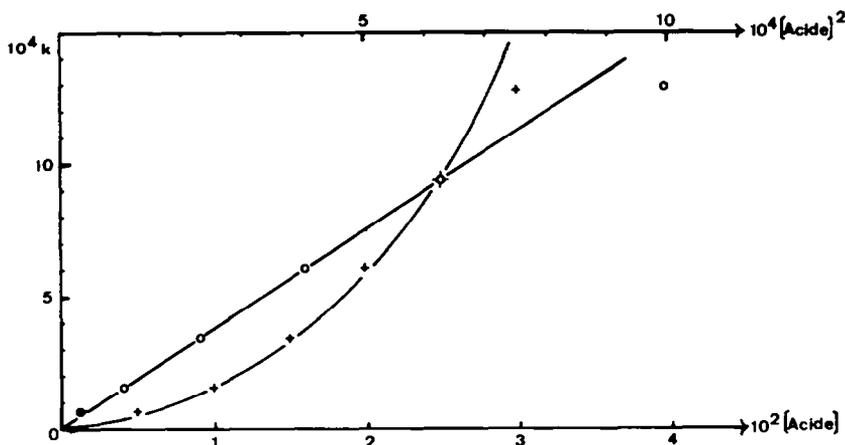


FIG. 3. Vitesse de rejonction en fonction de la concentration (+) du carré de la concentration (0).

en fonction de la concentration à une allure parabolique alors qu'en fonction du carré de la concentration les points sont alignés pour les faibles concentrations. Par contre, lorsque la concentration augmente la courbe s'incurve vers le bas à cause de la dimérisation des acides carboxyliques dans le benzène; ce phénomène est le même que celui précédemment étudié pour la mutarotation du TMG.⁶

Ces déterminations conduisent à faire $n = 2$ dans la loi cinétique précédemment donnée et à écrire

$$v = k' (\text{cholesténone}) (\text{acide})^2$$

les valeurs de k' sont données en partie expérimentale pour les acides étudiés (Tableau 3).

Pour étudier l'influence de la force de l'acide sur son activité catalytique, nous avons effectué une corrélation entre le pK_a dans l'eau des divers acides¹³ et le log de leur activité catalytique déterminée à la même température et pour la même concentration, les points sont correctement alignés comme on peut le constater sur la Fig 4. L'assimilation de cette relation à une corrélation de Bronsted ne nous a pas paru aller de soi dans la mesure où la concentration de l'acide intervient par son carré.

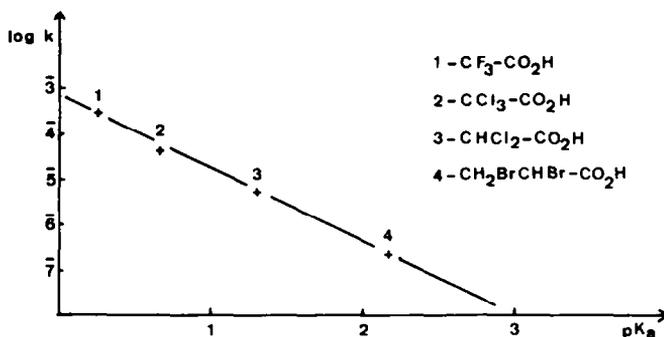


FIG. 4. Log k en fonction du pK_a .

Pour comparer avec la réaction enzymatique, nous avons également déterminé les constantes thermodynamiques d'activation pour l'acide trichloracétique, elles sont données dans le Tableau 1 avec les valeurs de ces mêmes paramètres déterminés par Jones et Wigfield⁹ pour la reconjugaison de l'androstène-5 dione 3-17 en milieu aqueux.

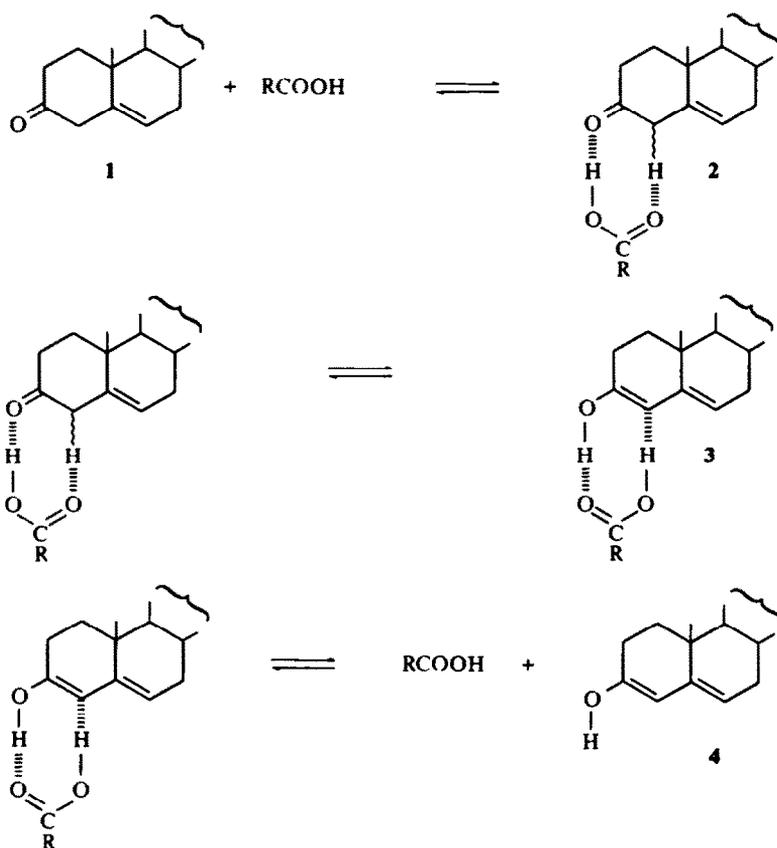
TABLEAU 1. PARAMÈTRES THERMODYNAMIQUES D'ACTIVATION POUR LA RECONJUGAISON DE L'ANDROSTÈNE-5 DIONE 3-17 ET DE LA CHOLESTÈNE 5 ONE-3

	Androstène-5 dione 3,17			Cholesténone			
	HCl pH = 0.88	tampon pH = 8.82	Enzyme	CCl ₃ COOH dans C ₆ H ₆	3.5 di Cl φ OH NEt ₃ dans C ₆ H ₆	4NO ₂ φ OH NEt ₃ dans C ₆ H ₆	CCl ₃ COOH dans C ₆ H ₆
ΔH^\ddagger kcal/mole	14 ± 0.1	11,4 ± 0.1	5,0 ± 0.1	8 ± 2	10 ± 3	7 ± 2	11 ± 2
ΔS^\ddagger u.e	-19.6 ± 0.4	-15.5 ± 0.4	-16.8 ± 0.4	-60 ± 10	-45 ± 10	-50 ± 10	-38 ± 4

On peut constater sur ce tableau que, si en milieu aqueux la forte activité catalytique de l'enzyme semble due à la diminution du facteur enthalpique, en milieu benzénique la très forte valeur négative de l'entropie d'activation (pour la réaction catalysée par les acides carboxyliques) permet de penser que l'on a à faire à un état de transition très organisé.

Hypothèses sur le mécanisme. Dans une note préliminaire¹⁴ nous avons proposé, pour rendre compte des résultats expérimentaux, un mécanisme en deux stades successifs: un premier stade comportant l'énolisation de la cétone et un deuxième dans lequel l'énol précédemment formé 3 était attaqué par un dimère ouvert de l'acide carboxylique. Des résultats expérimentaux nouveaux et une étude plus poussée des diverses étapes nous ont amené à modifier quelque peu ce mécanisme que nous allons maintenant étudier point par point.

Dans le benzène, solvant aprotique et non polaire, qui ne peut par conséquent intervenir dans la réaction, l'énolisation de la Δ^5 cholesténone exige une attaque simultanée par un réactif unique sur deux sites. L'oxygène en 3 est protoné tandis que le proton en 4 est arraché pour conduire à un énol lié à l'acide par deux liaisons hydrogène.



C'est ce que nous avons admis précédemment avec une attaque de cet énol par un dimère ouvert des acides carboxyliques.

Or cette dernière hypothèse ne tient pas compte de la double liaison 5-6 qui se conjugue avec la double liaison 3-4 en formation. On peut donc admettre aussi l'apparition d'une charge négative sur le carbone 6 et la formation d'une liaison hydrogène schématisée en 5 entre le carbone 6 et l'oxyhydrile d'une deuxième molécule

d'acide, de plus en plus forte au fur et à mesure que la réaction évolue vers la forme énolique.

On a donc un intermédiaire **6** qui peut évoluer vers la Δ^4 cholesténone par addition d'un proton en **6** et basculement de la double liaison.

Cette hypothèse mécanistique rend compte de la très forte entropie d'activation. On peut expliquer ainsi l'intervention nécessaire de deux molécules d'acide carboxylique jouant toutes les deux un rôle de catalyseur bifonctionnel. Aucune d'entre elles ne peut être remplacée par un acide monofonctionnel tel qu'un phénol. Ainsi l'addition de quantités relativement importantes d'acide picrique à un milieu réactionnel contenant un acide carboxylique ne modifie en rien la vitesse de reconjugaison.

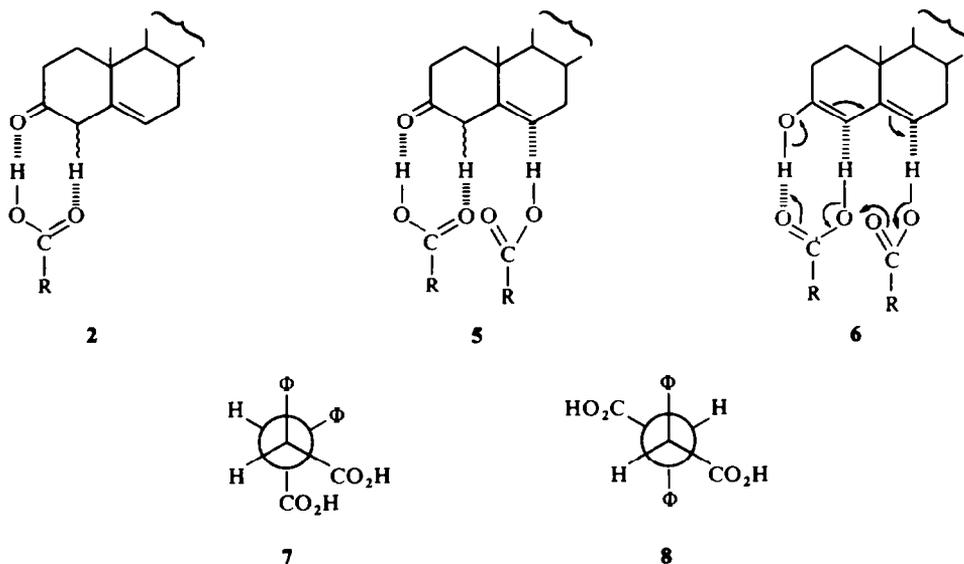
Pour vérifier l'hypothèse de la catalyse par 2 molécules d'acide carboxylique nous avons alors pensé à utiliser un diacide dont la configuration fixée correspondrait à celle des deux molécules d'acides représentées sur la formule 5. En effet avec un tel diacide on pouvait espérer avoir une relation linéaire entre la vitesse spécifique k_{exp} et la concentration de ce diacide. Malheureusement il ne nous a pas été possible de trouver un tel diacide soluble dans le benzène, les acides phtaliques substitués ou non, un grand nombre de dérivés de l'acide succinique, de l'acide maléique, des acides naphthalène dicarboxyliques, etc. . . . sont trop insolubles dans le benzène pour pouvoir être utilisés (solubilité inférieure à 10^{-3} mole. l⁻¹). Un changement de solvant ne peut être d'aucun secours puisque les seuls solvants dans lesquels ces acides sont un peu solubles sont des solvants très polaires ou basiques tels que l'acétone dans lesquels la réaction ne se produit pas.

Nous avons donc été obligés de nous borner à effectuer des mesures avec l'acide maléique sans pouvoir vérifier s'il existait une relation linéaire entre la vitesse spécifique k et la concentration. Nous avons seulement pu montrer que l'acide maléique se situe très en dehors de la corrélation $\log k_{\text{exp}}$ en fonction de pK_a . La constante catalytique pour l'acide maléique est en effet de 1.2×10^{-6} sec⁻¹ alors que d'après la corrélation la valeur attendue serait de $2 \cdot 10^{-7}$ sec⁻¹. Ce rapport de 1 à 6 entre valeur théorique et valeur expérimentale confirme l'hypothèse proposée. Remarquons à ce sujet que dans le cas du TMG pour lequel c'est le monomère qui agit, la constante catalytique de l'acide maléique est au contraire plus faible que ne le laisserait prévoir la corrélation de Bronsted (0.185 mole⁻¹ sec⁻¹ au lieu de 1.21 mole⁻¹ sec⁻¹). Nous avons également employé un autre diacide: l'acide *méso*-diphénylsuccinique dont la solubilité est un peu plus forte à la température d'ébullition du benzène. Malgré les mauvaises conditions expérimentales, nous avons pu effectuer des mesures de vitesse à diverses concentrations. Comme pour les monoacides, le graphe représentant les variations de la vitesse de reconjugaison en fonction de la concentration n'est pas une droite. Cependant, si nous représentons la vitesse en fonction du carré de la concentration on n'obtient pas non plus une droite, on peut donc admettre que la vitesse est proportionnelle à une puissance de la concentration comprise entre 1 et 2 (de l'ordre de 1.3).

On peut expliquer ce fait en considérant les conformations privilégiées de l'acide *méso*-diphénylsuccinique **7** (et son inverse optique) et **8**. Seule **7** peut être comparée à l'acide maléique, l'acide dans sa conformation **8** étant analogue à un monoacide. Le facteur de 1.3 donne une idée de l'équilibre conformationnel.

Ringold et Malhotra⁹ ont montré que la réaction était stéréospécifique et que c'était l'hydrogène en 4 β qui était transféré par l'enzyme jusqu'à la position 6 β .

Nous avons commencé une étude analogue avec une cholesténone deutériée en 4β , la réaction étant catalysée par des acides carboxyliques. L'étude de l'effet isotopique en utilisant comme catalyseur des acides carboxyliques deutériés est également en cours.



Catalyse par les mélanges phénols-amine

Comme pour le TMG, nous avons étudié la catalyse de la reconjugaison de la Δ^5 cholesténone par des mélanges de phénols et d'amines. Dans le benzène, ces mélanges existent soit sous forme de paires d'ions (c'est le cas des phénols les plus acides) (Fig 6) soit sous forme d'association par liaison hydrogène (Fig 7).

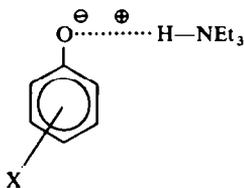


FIG. 5. Paire d'ions.

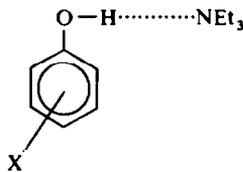


FIG. 6. Association.

Pour toutes ces espèces (paires d'ions ou association) on peut déterminer, par spectroscopie UV, la constante d'association dans le benzène. C'est également par spectroscopie UV que l'on peut se rendre compte si l'on a à faire à de vraies paires d'ions ou à des complexes d'association. En effet, le spectre de la paire d'ions est identique à celui de l'anion (déterminé sur une solution de phénate de tétraalcoylammonium). Dans le cas d'un complexe, le spectre est intermédiaire entre celui de l'anion et celui de la molécule libre.

Si nous essayons de relier la force du phénol (représentée par son pK_a dans l'eau¹³ à son activité catalytique (représentée par la vitesse de la réaction de reconjugaison à température et concentration déterminées) la courbe représentative de cette corrélation part d'une valeur très faible pour les phénols les plus acides (dinitro-2,4 phénol) passe par un maximum pour un pK_a de l'ordre de 8.25-8.5 et revient à une vitesse très faible pour les pK_a de l'ordre de 10. La poursuite de ce travail est en cours avec un grand nombre de phénols diversement substitués.

Les paramètres d'activation déterminés pour deux couples phénol-amine et pour la reconjugaison de l'androstène dione (voir Tableau 1) sont très voisins de ceux correspondant à la catalyse par les acides carboxyliques, ce qui peut laisser supposer un mécanisme voisin.

CONCLUSION

Tous les résultats dans ce travail et les hypothèses émises montrent que le problème le plus important soulevé par cette étude est celui de la distance séparant les sites actifs du substrat et du catalyseur. Lors de l'étude de la mutarotation du TMG nous avons montré⁶ que l'espèce catalysante était le monomère de l'acide carboxylique (Fig 8) nous faisons par contre intervenir deux molécules d'acide carboxylique pour la reconjugaison de la cholesténone. Si nous construisons les modèles moléculaires correspondant à ces deux réactions nous constatons que la distance séparant les

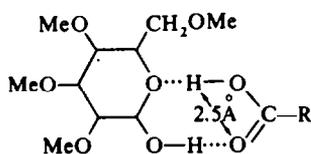


FIG. 7. Distance entre sites actifs pour la mutarotation du TMG.

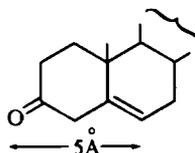


FIG. 8. Distance entre sites actifs pour la reconjugaison de la Δ^5 -cholesténone.

deux sites actifs du TMG est de l'ordre de 2.5 Å (Fig 8) de même que celle séparant les deux sites d'un acide carboxylique. Dans le cas de la cholesténone, par contre, ce sont 5 Å qui séparent les deux sites actifs (Fig 9). L'utilisation de l'acide maléique confirme ces hypothèses, sa constante catalytique est anormalement faible lorsqu'il catalyse la mutarotation du TMG et anormalement forte lorsqu'il s'agit de la reconjugaison de la cholesténone. C'est également une question de distance entre sites actifs qui peut expliquer la corrélation entre l'acidité des phénols et l'activité catalytique des paires d'ions qu'ils produisent. Avec les phénols les plus acides, la distance entre sites est trop forte, elle devient optimale pour les phénols dont le pK_a est de l'ordre de 8.5 puis devient trop forte pour les phénols de faible acidité alors que l'activité catalytique passe par un maximum. C'est dans ce sens que ce travail est actuellement poursuivi.

RESULTATS

Blocage de la réaction avec l'acide trifluoroacétique deuterie

Pour bloquer la réaction il est indispensable de n'utiliser qu'un réactif qui ne produise dans le milieu ni eau, ni aucun autre solvant polaire. Ceci exclut l'emploi

des bases telles que —OH^- , CO_3^{2-} , EtO^- , etc... La méthode la plus efficace que nous ayons trouvée consiste à traiter le milieu réactionnel par l'hydrure de calcium en excès pendant environ 30 mn, on filtre ensuite, lave et dose la cholesténone présente dans le milieu.

TABLEAU 2. VALEUR DE $10^5 k \text{ sec}^{-1}$ EN FONCTION DE LA CION EN ACIDE

Cion	0-001	0-002	0-004	0-005	0-006	0-010	0-015	0-020	0-025	0-032	0-040	0-060
CHCl_2COOH			3-2			10		42			113	195
CCl_3COOH (40°)	40			90		200	350	610	940	1300		
CF_3COOH		7			45	88		210			775	

TABLEAU 3. VALEUR DE $k' = (k/(\text{acide})^2)$.

	$k' \text{ sec}^{-1} \text{ mole}^{-2} \text{ litre}^2$
$\text{CH}_3\text{Cl}_2\text{COOH}$	0-11
CCl_3COOH (40° C)	1-4
CF_3COOH	1-0

TABLEAU 4. VALEURS DE k EN FONCTION DE LA TEMPERATURE POUR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE A LA CONCENTRATION DE 0-025 MOLE/L

T, °K	288	293	298	303	308	313
$10^4 k \text{ sec}^{-1}$	1-8	2-5	3-3	4-3	6-1	9-4

TABLEAU 5. VALEUR DE k POUR LA RECONJUGAISON DE LA Δ^5 CHLOESTENONE CATALYSEE PAR L'ACIDE DIPHENYLSUCCINIQUE A LA TEMPERATURE D'EBULLITION DU BENZENE

Cion	0-003	0-006	0-01	0-012	0-015
$10^5 k_{\text{exp}} \text{ sec}^{-1}$	1-6	4-5	9	10-5	15

La Δ^5 cholesténone est préparée à partir du cholestérol par la méthode de Fieser.¹⁶ Le benzène de qualité "pour analyses" est distillé sur sodium.

Les mesures sont faites à 25° (sauf indication contraire) pour la raie jaune du mercure ($\lambda = 578 \text{ nm}$). La concentration en cholesténone étant toujours égale à 0-025 mole/l.

Remerciements—Au cours de ce travail nous avons bénéficié de très utiles discussions avec Melle B. Tchoubar (Thiais) et M. Z. Welvart (Thiais). Nous les en remercions très vivement.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. M. Richards et T. M. Lowry, *J. Chem. Soc.* 1385 (1925).
- ² C. G. Swain et A. J. Di Milo, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5983 (1958)
- ³ C. G. Swain et J. F. Brown, Jr., *Ibid.* **74**, 2534 et 2538 (1952)
- ⁴ E. L. Blackall et A. M. Eastham, *Ibid.* **77**, 2184 (1955)
- ⁵ A. Kergomard et M. F. Renard, *Tetrahedron Letters* 769 (1968)
- ⁶ A. Kergomard et M. F. Renard, *Tetrahedron* **24** 6643 (1968)
- ⁷ A. Kergomard et M. F. Renard, *Tetrahedron Letters* 3041 (1969)
- ⁸ J. B. Jones et D. C. Wigfield, *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5294 (1967)
- ⁹ S. K. Malhotra et H. J. Ringold, *Ibid.* **87**, 3228 (1965)
- ¹⁰ I. V. Torgov, *5ème International Symposium of the chemistry of natural products*, Londres, Juillet (1969)
- ¹¹ J. B. Jones et D. C. Wigfield, *Can. J. Chem.* **47**, 4459 (1969)
- ¹² J. Jacques, H. Kagan et G. Ourisson, *Constantes Sélectionnées* vol. 14, *1a Steroides*, p. 455. Pergamon Press (1965)
- ¹³ G. Kortum, W. Vogel et K. Andrussow, *Dissociation of Organic Acids in Aqueous Solutions*, Butterworths, London (1961)
- ¹⁴ A. Kergomard et M. F. Renard, *Tetrahedron Letters* 2319 (1970)
- ¹⁵ L. F. Fieser, *Organic Syntheses*, Coll. Vol. IV, p. 195, Wiley, New York, N.Y. (1963)