

LACTONES PHENOLIQUES HALOMETHYLEES, INHIBITEURS BIFONCTIONNELS DE PROTEASES—II^a

PREPARATION DE DERIVES HALOMETHYLES DE LA DIHYDRO-3,4 COUMARINE ET DE LA BENZOFURANONE-2

M. WAKSELMAN*, J-F. HAMON^b et M. VILKAS

Laboratoire de Chimie Organique Biologique†, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, bâtiment 420,
91405 Orsay, France

(Received in France 11 March 1974; Received in the UK for publication 6 May 1974)

Résumé—L'hydroxyméthylation des acides o-hydroxy phényl propionique et o-hydroxy phényl acétique conduit à des mélanges de sels d'acides phénoliques ortho- et para-hydroxyméthylés acidolabiles. L'action de SOCl₂ provoque une chloruration benzylique et une lactonisation, ce qui permet d'obtenir en deux étapes les dérivés para- et ortho-chlorométhylés de la dihydro-3,4 coumarine et de la benzofuranone-2. La bromométhylation des acides (nitro-3 hydroxy-2 phényl) et (nitro-5 hydroxy-2 phényl) propioniques donne, après lactonisation, les dihydro-3,4 nitro-8 bromométhyl-6 et dihydro-3,4 nitro-6 bromométhyl-8 coumarines. Des dérivés radioactifs ont également été synthétisés.

Abstract—o-Hydroxy phenyl propionic and o-hydroxy phenyl acetic acids give mixtures of ortho- and para-hydroxymethylated phenolic acid sodium salts which with thionyl chloride undergo benzylic chlorination and lactonisation; para- and ortho-chloromethylated derivatives of 3,4-dihydrocoumarin and of benzofuran-2-one are thus obtained in two steps. The bromomethylation of (nitro-3 hydroxy-2 phenyl) and (nitro-5 hydroxy-2 phenyl) propionic acids yields 3,4-dihydro-8-nitro-6-bromomethyl- and 3,4-dihydro-6-nitro-8-bromomethyl-coumarins. Some radioactive derivatives have also been synthesised.

Parmi les réactifs utilisés pour modifier sélectivement les résidus d'acides aminés constituant le centre actif des enzymes ("active-site directed reagents"^{2,3}), certains ressemblent à un substrat de l'enzyme ("pseudo-substrats") et possèdent en outre une fonction réactive. Ils forment un complexe non-covalent avec l'enzyme (complexe de Michaelis) et provoquent ensuite une modification covalente. D'autres sont des réactifs bifonctionnels qui forment un dérivé covalent instable ayant une plus longue durée de vie que le complexe de Michaelis, puis créent une deuxième liaison covalente stable. A ce dernier type appartient le réactif de la chymotrypsine mis au point par Lawson et Schramm, qui possède une fonction acylante et une fonction alkylante.^{1,4}

La probabilité et la sélectivité de formation de la deuxième liaison covalente sont théoriquement encore plus grandes si la deuxième fonction du réactif est potentielle et n'est activée in situ dans le centre actif qu'après formation du premier

intermédiaire covalent, une acyl-enzyme dans le cas des protéases-estérases.^{5,7}

Ainsi l' α -chymotrypsine catalyse l'hydrolyse du chlorure de nitro-5 acétoxy-2 benzyle **1c** et le chlorure o-hydroxybenzylique **1b** libéré réagit sélectivement avec les résidus tryptophane situés au voisinage du centre actif,⁶ le bromure **1a** correspondant est en effet un réactif coloré spécifique du tryptophane dans les protéines.⁸ L'activité enzymatique n'est toutefois pas modifiée de façon notable par l'acétate **1c**.⁶

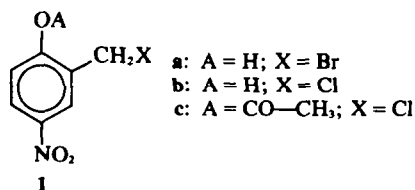


Fig 1.

^aLa référence 1 est considérée comme la première partie de cette série.

^bCe travail constitue une partie de la thèse de 3e cycle de M. J-F. Hamon, soutenue le 18.09. 1973 à Orsay.

†Equipe de recherche associée au C.N.R.S. n° 318.

Deux résidus (Ser 195 et His 57) jouent un rôle très important dans le mécanisme d'action de l' α -chymotrypsine: le noyau imidazole de l'histidine assiste l'attaque nucléophile, par l'hydroxyle de la sérine, du carbonyle du substrat amide ou

ester.⁹ L'alkylation de ce noyau imidazole provoque une diminution importante de l'activité enzymatique.^{10,11}

La grande réactivité des halogénures *o*- et *p*-hydroxybenzyliques **2** est due au départ très facile d'ion halogénure et à la formation de cation hydroxy-benzylique en équilibre avec la méthylène-quinone.^{8,12,13} Ces halogénures réagissent

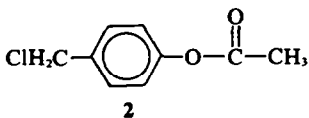


Fig 2.

avec l'imidazole dans l'eau à pH 7 et à 25°C pour donner des imidazoles N-substitués.¹⁴ Les halogénures *p*-acétoxy-benzyliques substituent également l'imidazole dans les mêmes conditions, mais cette réaction est empêchée lorsque la fonction ester est encombrée. L'hydrolyse de cette fonction ester est donc l'étape primaire de la réaction et les halogénures acyloxybenzyliques sont des agents alkylants potentiels.¹⁴

Le chlorure d'acétoxy-4 benzyle **2** possède les caractéristiques structurales d'un réactif bifonctionnel, une fonction ester acylante et une fonction halogénure *p*-hydroxy-benzylique alkylante latente, libérée *in situ* lors de la formation de l'acyl-enzyme. Il est hydrolysé par l' α -chymotrypsine mais, comme dans le cas du chlorure **1c**, l'activité catalytique n'est pratiquement pas modifiée.¹ Nous avons interprété ce résultat négatif par une trop

grande vitesse de diffusion de l'entité alkylante hors du centre actif.^{1,14}

Une chaîne carbonée reliant les fonctions acylante et alkylante devrait empêcher cette diffusion pendant toute la durée de vie de l'acyl-enzyme. En cas d'alkylation subséquente à l'acylation, il y aurait création d'un pont covalent stable entre la sérine 195 et l'histidine 57 (Fig. 3).

Cette alkylation paraissait stériquement possible car la distance entre l'oxygène de l'hydroxyle de la sérine et l'azote ϵ_2 du noyau histidine est de 3.1 Å dans l'enzyme cristallisée.¹⁵ Nous avons donc entrepris la synthèse et l'étude d'un certain nombre de dérivés halométhylés de lactones phénoliques.

Kaiser et coll. avaient montré que la 3 H nitro-5 benzofuranone-2 **13** et la dihydro-3,4 nitro-6 coumarine **5** sont hydrolysées par l' α -chymotrypsine avec formation intermédiaire d'une acyl-enzyme.¹⁶ Nous nous sommes donc proposé de préparer des dérivés ortho- et para-halométhylés de la dihydro-3,4 coumarine (benzopyranone-2) **6** et **7** et de la 3 H benzofuranone-2 (coumaranone-2) **14** et **15**.

Nos premiers essais de synthèse des composés les plus simples de cette série ayant échoué (voir ci-dessous), nous avons préparé des dérivés substitués sur le cycle lactonique. Dans un article précédent¹ nous avons décrit la synthèse de la dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl-6 coumarine **38** qui est un inhibiteur très efficace de l' α -chymotrypsine et qui a un comportement de réactif bifonctionnel; l'inhibition est très rapide, maximale à pH 7, et on observe la disparition d'un résidu histidine dans l'hydrolysate de l'enzyme modifié

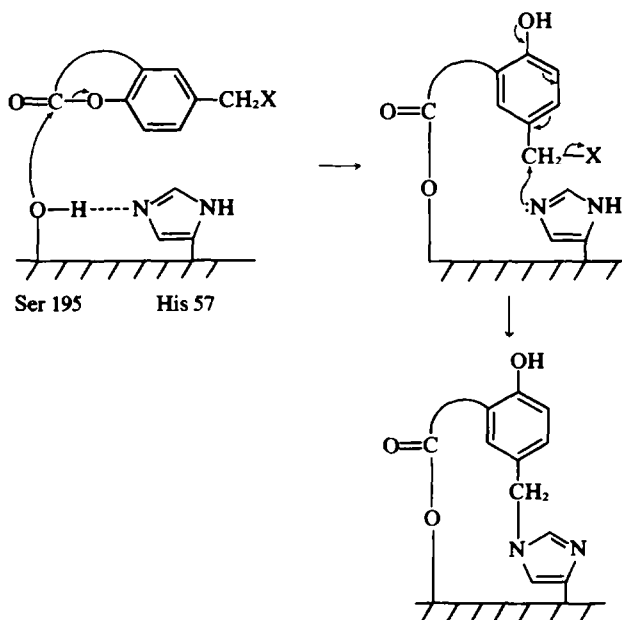


Fig 3.

inactif.¹ Cependant la présence de deux atomes de brome en 3 et 4 crée des possibilités de réaction à ce niveau et complique l'analyse des cinétiques d'hydrolyse spontanée ou enzymatique du réactif, par suite de réactions secondaires de débromhydratation.

Pour déterminer la stoechiométrie de la réaction d'inhibition nous avons préparé un dérivé marqué de ce tribromure, la dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl [³H]-6 coumarine 38T. Nous avons aussi préparé son isomère de position, la dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl-8 coumarine 33, afin d'étudier l'influence de la distance fonction acylante-fonction alkylante sur la réactivité (vide infra).

Dans le but de confirmer le mécanisme méthylène-quinonique de la réaction, nous nous sommes surtout attachés à démontrer que la présence des deux bromes vicinaux n'était pas nécessaire à l'inhibition. Pour cela nous avons repris l'étude des dérivés simples de la série et nous avons réussi à préparer la dihydro-3,4 chlorométhyl-6 coumarine 6, ainsi que la même molécule marquée 6[¹⁴C] (étude de la stoechiométrie), la 3H chlorométhyl-5 benzofuranone-2 14, la 3H chlorométhyl-7 benzofuranone-2 15 (étude des conditions stériques de la réaction) et les dihydro-3,4 nitro-8 bromométhyl-6 et dihydro-3,4 nitro-6 bromométhyl-8 coumarines 22 et 29 (stoechiométrie de la réaction et introduction d'un "groupement rapporteur" nitrophénol¹⁶ dans le centre actif).

L'étude enzymatique de l'action de ces réactifs a été effectuée par MM. J. J. Béchet et A. Dupaix et Mlle J. Yon, du Laboratoire d'Enzymologie Physico-chimique et Moléculaire d'Orsay, et sera publiée par ailleurs.¹⁷

MÉTHODES DE SYNTHÈSE

La préparation de la dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl-8 coumarine 33 a été effectuée selon une voie de synthèse analogue à celle employée pour la préparation de son isomère de position 38.¹ La dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl [³H]-6 coumarine 38T a été obtenue par réduction de la formyl-6 coumarine 37 au moyen de borotritiure de sodium, bromuration par HBr gazeux de l'alcool obtenu puis addition de brome. Les dihydro-3,4 nitro-8 bromométhyl-6 coumarine 22 et dihydro-3,4 nitro-6 bromométhyl-8 coumarine 29 ont été préparées par bromométhylation des acides (nitro-3 hydroxy-2 phényl) propionique 19 et (nitro-5 hydroxy-2 phényl) propionique 24 puis lactonisation des acides bromométhylés 21 et 28 ainsi obtenus.

Les plus grandes difficultés ont été rencontrées dans la préparation des dérivés monohalogénés 6 et 14. La chlorométhylation de la dihydro-3,4

coumarine 4, soit directement, soit par la méthode de Sommelet,¹⁸ ne donne que des polymères.¹⁹ L'action du NBS sur la dihydro-3,4 méthyl-6 coumarine 10, qui possède deux carbones benzyliques susceptibles d'être bromés, donne un mélange complexe de dérivés coumariniques par suite de réactions secondaires de débromhydratation.²⁰ Les hydroxyméthylphénols se résinifient en milieu acide et les produits provenant de l'hydroxyméthylation de l'acide o-hydroxyphénylpropionique (acide méliotique) 3 ne sont pas extractibles en milieu neutre et se polymérisent en milieu acide. Cependant le traitement par le chlorure de thionyle des sels alcalins provenant de l'hydroxyméthylation de l'acide méliotique nous a permis d'effectuer à la fois une lactonisation et une chloruration benzylique et d'obtenir le produit cherché 6, accompagné de son isomère 7, en deux étapes à partir de produits commerciaux.

Cette méthode de lactonisation de sels d'hydroxy-acides est valable également dans le cas des acides γ -hydroxylés et conduit à partir de l'acide o-hydroxy phényl acétique 11 aux dérivés halométhylés 14 et 15 de la benzofuranone-2.

Dihydro-3,4 chlorométhyl-6 coumarine 6 et dihydro-3,4 chlorométhyl [¹⁴C]-6 coumarine 6[¹⁴C]

L'hydroxyméthylation^{21,22} de l'acide o-hydroxy phénylpropionique 3 peut conduire à un mélange de dérivés ortho- et para-hydroxyméthylés, de dérivé bis-hydroxyméthylé et de produits de condensation du type diphénylméthane.

Une acidification de ce mélange A jusqu'à pH 2 ne donne que des polymères. Un traitement du sel sec en suspension dans du benzène par de l'acide bromhydrique gazeux ne donne pas les dérivés bromométhylés attendus, mais des résines.¹⁹

La fermeture du cycle lactonique nous a permis de résoudre ce problème. En effet, les halométhyl phénols non substitués sont instables²³ alors que les acétates d'halométhyl-phényle sont distillables.²⁴

Afin d'éviter un milieu trop acide, nous avons employé la réaction du chlorure de thionyle sur le mélange des sels de sodium obtenus à pH 7. La préparation de chlorures d'acides par action de SOCl₂ sur les sels de sodium des acides carboxyliques est une méthode connue mais peu employée.^{25,26} Dans le cas des acides o-hydroxy phényl propioniques la proximité de l'hydroxyle phénolique et du chlorure d'acide formé intermédiairement provoque une estérification intramoléculaire rapide; ainsi l'acide méliotique 3 conduit directement à la dihydrocoumarine 4.

Avec les acides hydroxyméthylés nous pouvions en outre espérer que le chlorure de thionyle en excès provoquerait simultanément la chloruration de la fonction alcool benzylique. L'analyse du mélange B obtenu après hydroxyméthylation de l'acide méliotique et action de SOCl₂ sur le

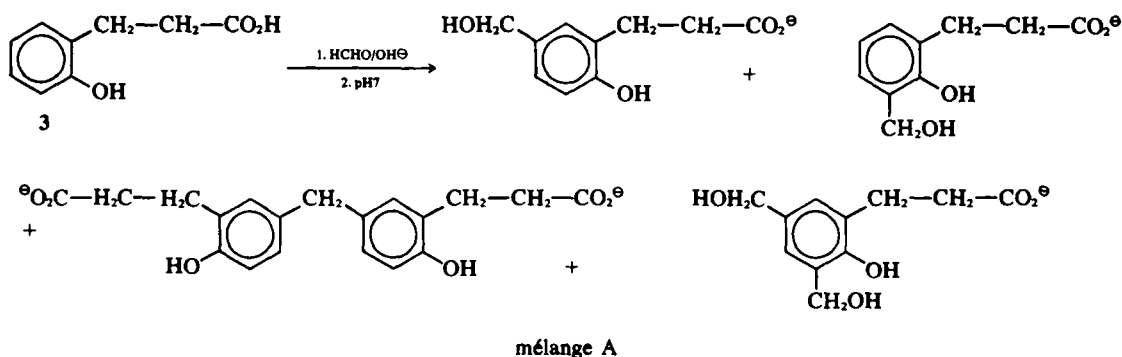


Fig 4.

mélange de sels alcalins A a confirmé cette attente (Fig 5).

La première fraction du distillat est constituée de dihydrocoumarine 4. La deuxième fraction contient un mélange des deux dérivés monochlorométhylés de la dihydrocoumarine, 6 et 7. Par recristallisation on obtient la dihydro-3,4 chlorométhyl-6 coumarine 6 pure dont la structure a été établie par hydrogénolyse du chlore benzylique et comparaison du produit ainsi formé avec un échantillon témoin de dihydro-3,4 méthyl-6 coumarine 10. La troisième fraction est constituée par la dihydro-3,4 bis (chlorométhyl)-6,8 coumarine 8, de structure non ambiguë. La structure du bis(dihydro-3,4 coumarinyl-6)méthane 9 présent dans la quatrième fraction a été déterminée par comparaison avec le produit d'hydrogénation du bis (coumarinyl-6) méthane.⁴⁶

Dans cette synthèse en deux temps, l'emploi de formol marqué sur le carbone conduit à la dihydro-3,4 chlorométhyl [¹⁴C]-6 coumarine 6[¹⁴C] (voir Partie Expérimentale).

Le dérivé ortho-chlorométhylé 7 n'a pas pu être obtenu à l'état pur. Un essai d'hydroxyméthylation sélective, par catalyse au moyen d'acide bori-

que,^{27,28} conduit seulement à un enrichissement en cet isomère de la fraction 2.

3H Chlorométhyl-5 benzofuranone-2 14 et 3H chlorométhyl-7 benzofuranone-2 15

La 3H benzofuranone-2 12, homologue inférieur de 4, possède un cycle lactonique plus tendu, ce qui se traduit par une fréquence du carbonyle plus élevée en IR et par une vitesse d'hydrolyse plus grande.¹⁶ Par hydroxyméthylation suivie de traitement au chlorure de thionyle comme ci-dessus, nous avons isolé à partir de l'acide o-hydroxy phénylacétique 11 les produits représentés sur la Fig 6.

La 3H chlorométhyl-5 benzofuranone-2 14 est le produit majoritaire. Nous avons isolé une fois une fraction très riche en son isomère de position la 3H chlorométhyl-7 benzofuranone-2 15. La structure de 14 a été démontrée par hydrogénolyse du chlore benzylique et comparaison (F, IR, RMN) de la 3-H méthyl-5 benzofuranone-2 17 obtenue avec un échantillon témoin préparé par la méthode d'Aubert.²⁹ Dans cette réaction il se forme aussi un produit de condensation auquel nous avons attribué la structure 16 en raison de ses caractéristiques spectrales proches de celles de 9.

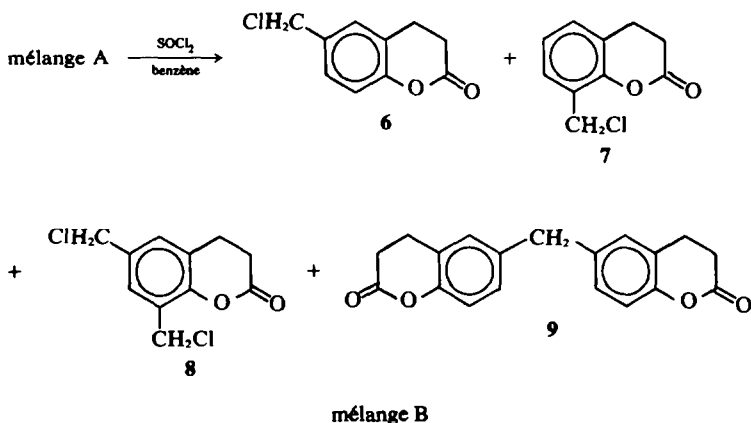


Fig 5.

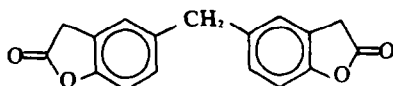
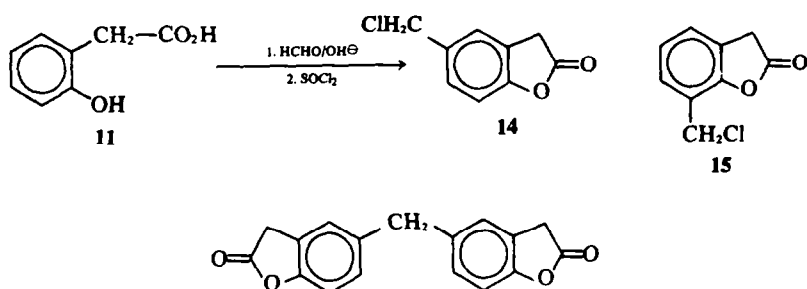


Fig 6.

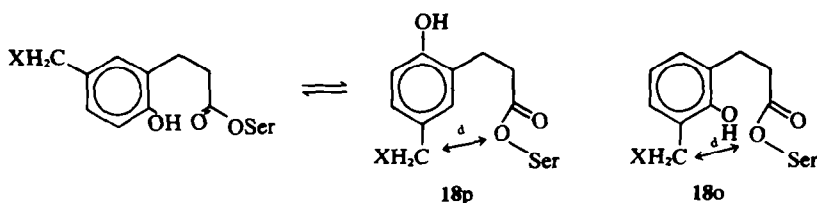


Fig 7.

L'examen des modèles moléculaires compacts CPK des esters 18 (Fig 7) montre que le repliement de la molécule est plus facile dans les dérivés de la série dihydrocoumarinique; la distance minimale¹ entre la fonction alkylante et la fonction ester est donc plus faible. Par ailleurs pour les dérivés d'un même hétérocycle, par suite de la gêne stérique due à l'hydroxyle phénolique, cette distance est plus courte pour le dérivé para-halométhylé 18p que pour le dérivé ortho 18o. Le pouvoir inhibiteur¹⁷ est d'autant plus important que cette distance est faible.²⁰

Dihydro-3,4 nitro-8 bromométhyl-6 coumarine 22

Dans les conditions de la réaction d'halométhylation, les phénols ne possédant pas de substituants électroattracteurs conduisent à des

polymères.³⁰ Par contre les nitrophénols donnent des dérivés halométhylés avec de bons rendements.³⁰⁻³³

Nous avons donc synthétisé la dihydro-3,4 nitro-8 bromométhyl-6 coumarine 22 et la dihydro-3,4 nitro-6 bromométhyl-8 coumarine 29, isomère de la précédente, par bromométhylation des acides nitro-3 et nitro-5 hydroxy-2 phénylpropionique 19 et 24 ou de leurs esters éthyliques 20 et 25. L'acide 24 a été obtenu par hydrolyse de la dihydro-3,4 nitro-6 coumarine 5 qui provient elle-même de la nitration de la dihydrocoumarine 4.³⁴

Pour préparer l'acide 19 nous avons effectué une nitration de l'acide méliotique 3 à -30°C , condition dans laquelle le phénol donne une proportion importante d'ortho-nitrophénol.³⁵ La bromométhylation donne l'acide (nitro-3 hydroxy-2

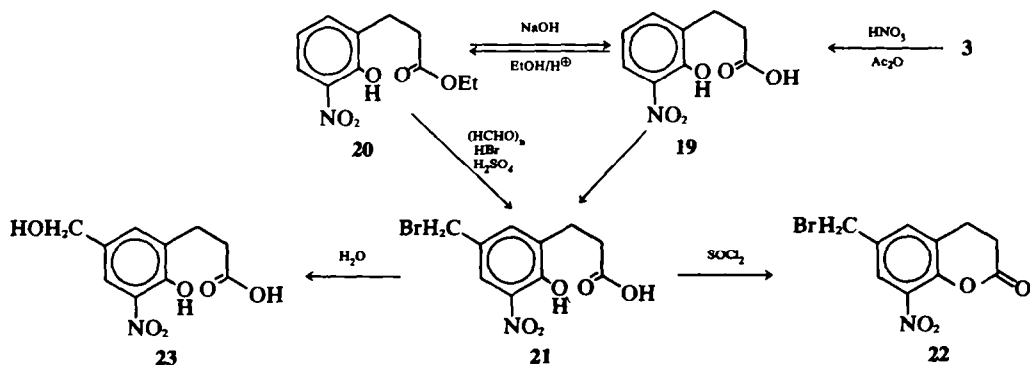


Fig 8.

bromométhyl-5 phényl)propionique **21** qui est cyclisé par le chlorure de thionyle en dihydro-3,4 nitro-8 bromométhyl-6 coumarine **22**. L'hydrolyse de **21** donne l'acide (nitro-3 hydroxy-2 hydroxyméthyl-5 phényl)propionique **23**. La bromométhylation de l'ester éthylique correspondant **20** s'effectue avec hydrolyse acide de la fonction ester et donne également **21** mais avec un rendement plus faible. L'étape de saponification est cependant évitée, de sorte que ces deux voies de synthèse sont pratiquement équivalentes.

Dans les mêmes conditions la bromométhylation de l'acide (nitro-5 hydroxy-2 phényl)propionique **24** ou de son ester **25** ne donnent pas directement l'acide (nitro-5 hydroxy-2 bromométhyl-3 phényl)propionique attendu **28**, mais un produit ayant incorporé deux molécules de formol. Les caractéristiques spectrales de ce produit correspondent à la structure **26** dont les modèles moléculaires

Dreiding et CPK ont pu être construits sans tensions excessives. Par action du diazométhane **26** donne un éther phénolique **27**.

En effectuant la bromométhylation de l'acide **24** en présence d'un très gros excès d'acide bromhydrique concentré, ou en traitant **26** par HBr, on obtient l'acide (nitro-5 hydroxy-2 bromométhyl-3 phényl)propionique cherché **28**. Le traitement de **28** par le chlorure de thionyle donne finalement la dihydro-3,4 nitro-6 bromométhyl-8 coumarine **29**. L'hydrolyse de **28** conduit à l'acide (nitro-5 hydroxy-2 hydroxyméthyl-3 phényl)propionique **30**.

Dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl-8 coumarine 33

Ce produit a été préparé de la même façon que son isomère **38'** par bromation benzilyque de la méthyl-8 coumarine **31**³⁶ au moyen du NBS³⁷ puis

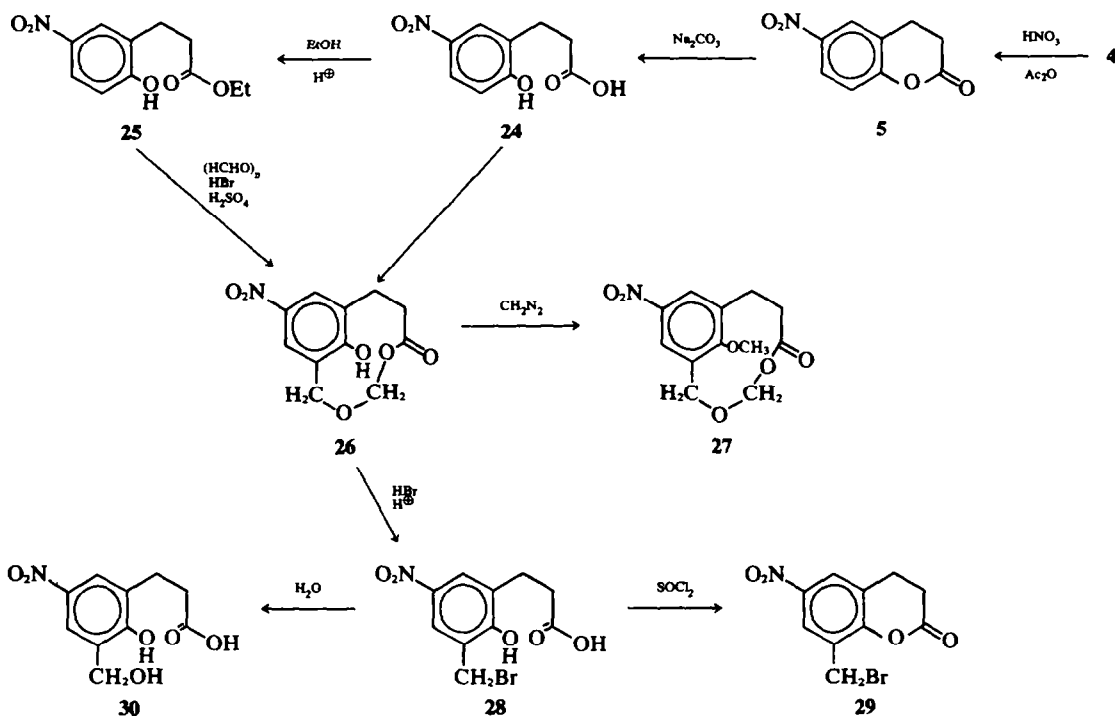


Fig 9.

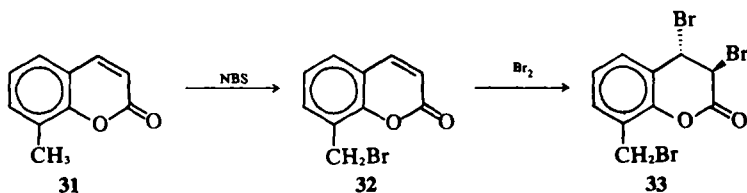


Fig 10.

addition de brome sur la double liaison coumarinique, réaction connue dans le cas de la coumarine.³⁸

Le spectre de RMN confirme que le brome s'est additionné en trans.

Dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl [¹H]-6 coumarine 38^T

Pour préparer ce dérivé tritié de l'inhibiteur 38 nous avons été obligés de mettre au point une voie différente de celle suivie pour synthétiser 38 froid.¹ Il a été obtenu par réduction de la formyl-6 coumarine 37 au moyen de borotritiure de sodium, bromuration de l'alcool 36^T par HBr gazeux suivie d'addition de brome. La formyl-6 coumarine²⁹ a été préparée par hydrolyse de la bromométhyl-6 coumarine 35^{1,40} en hydroxyméthyl-6 coumarine 36⁴¹ et oxydation de celle-ci par le bichromate de sodium.⁴²

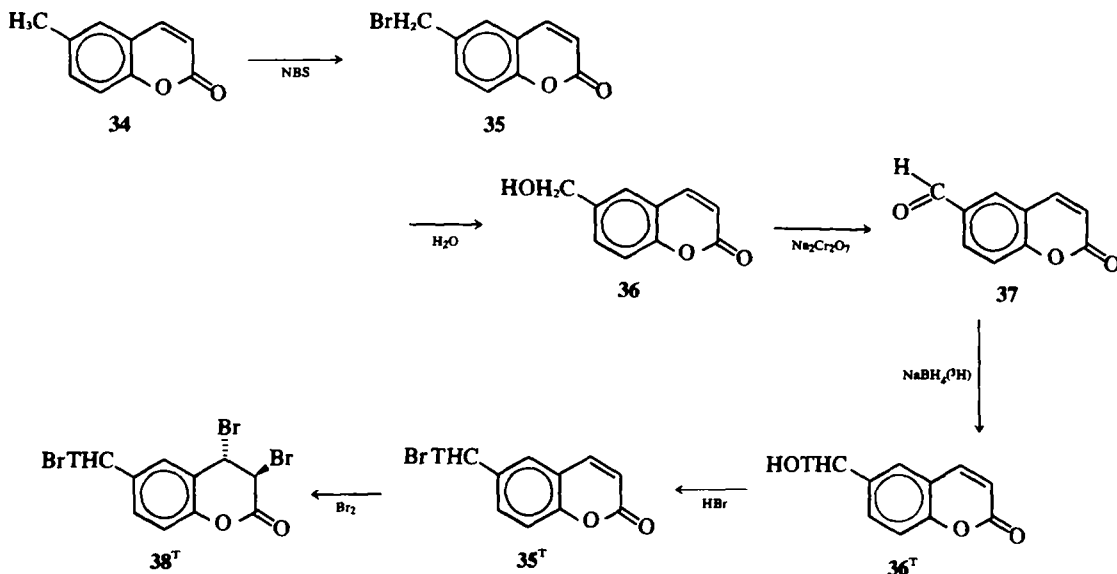


Fig 11.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion ne sont pas corrigés. Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Infracord 257 Perkin Elmer (ν en cm^{-1}), et les spectres RMN sur un appareil Jeol C60H (δ en millionièmes, J en Hz, s = singulet, etc.) Tous les composés pour lesquels le mot Analyse est indiqué, suivi d'une formule moléculaire explicite, ont fourni des résultats analytiques correspondant à la formule à $\pm 0.2\%$ au plus.

Matières premières

La dihydro-3,4 coumarine 4 et la méthyl-6 coumarine 34 sont des produits commerciaux EGA. L'hydrolyse de 4 par le carbonate de sodium conduit à l'acide (hydroxy-2 phényl) propionique (acide mélilotique) 3, F 83-84° (litt.⁴³ F 82-84). L'acide (hydroxy-2 phényl) acétique 11 est un produit Fluka; le formol [¹⁴C] et le borohydrure tritié proviennent du CEA.

Dihydro-3,4 chlorométhyl-6 coumarine 6, dihydro-3,4 chlorométhyl-8 coumarine 7, dihydro-3,4 bis(chlorométhyl)-6,8 coumarine 8 et bis (dihydro-3,4 coumarinyl-6) méthane 9.

Hydroxyméthylation de l'acide (hydroxy-2 phényl) propionique 3. 11.84 g (0.08 mole) de dihydro-3,4 coumarine 4 sont agités pendant 2 h dans 400 cm^3 de soude 0.5 N. La solution du sel de sodium de l'acide mélilotique ainsi obtenue est ensuite refroidie dans un bain d'eau glacée et 6 cm^3 de formol à 40% (0.08 mole) sont ajoutés goutte à goutte. Le mélange est laissé 4 à 6 jours à l'obscurité. Le pH est ensuite ajusté à 7.5 par HCl 10% en refroidissant dans un bain glace-eau. L'eau est évaporée à 20° et le résidu solide est séché au dessiccateur.

Action du chlorure de thionyle. Le sel sec ainsi obtenu est mis en suspension dans 200 cm^3 de benzène anhydre et additionné goutte à goutte d'un excès de chlorure de thionyle (10 cm^3) en agitant et en refroidissant à 0°. La solution est agitée à température ambiante pendant 24 h, puis le chlorure de sodium formé est

filtré et le benzène évaporé. L'huile jaune obtenue est distillée sous 0.3 mm de Hg. On obtient ainsi les quatre fractions suivantes: Fraction 1: E_0 , 90°C. Cette fraction est constituée par 2 g de dihydro-3,4 coumarine 4. Fraction 2: E_0 , 135-145°C: mélange de dihydro-3,4 chlorométhyl-6 coumarine 6 et de dihydro-3,4 chlorométhyl-8 coumarine 7. RMN du mélange (CDCl_3): δ 2.80 (m, 4, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 4.55 (s, 2, CH_2Cl); 4.63 (s, 2, CH_2Cl); 7-7.40 (m, 3, ArH). Par recristallisation dans un mélange CCl_4 -cyclohexane (1:1) on isole 1.5 g de dihydro-3,4 chlorométhyl-6 coumarine 6 pure. Rendement (Rdt): 10% par rapport à 4. F 89-90°C. IR (CHCl_3): ν_{CO} 1775. RMN (CDCl_3): δ 4.55 (s, 2, CH_2Cl). Analyse: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_2\text{Cl}$. Fraction 3: E_0 , 170-180°C. Cette fraction contient de la dihydro-3,4 bis(chlorométhyl)-6,8 coumarine 8, qui est purifiée par recristallisation dans un mélange cyclohexane- CCl_4 (1:1). Rdt: 12%. F 69-71°C. IR (CHCl_3): ν_{CO} 1765. RMN (CDCl_3): δ 3.00 (m, 4,

$\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 4.58 (s, 2, CH_2Cl); 4.69 (s, 2, CH_2Cl); 7.26 (d, 1, H_3); 7.40 (d, 1, H_7). Analyse: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{Cl}_2$. Fraction 4: E_0 , 230–240°C. Elle contient du bis(dihydro-3,4 coumarinyl-6) méthane 9, qui est purifié par recristallisation dans un mélange benzène-cyclohexane (1:1). Rdt: 8%. F 159–160°C. IR (Nujol): $\nu_{\text{C=O}}$ 1765. RMN (CDCl_3): δ 2.85 (m, 8, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3.98 (s, 2, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$); 7.00 (s élargi, 6, ArH). Analyse: $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$.

Dihydro-3,4 méthyl-6 coumarine 10

100 mg (0.5×10^{-3} mole) de dihydro-3,4 chlorométhyl-6 coumarine 6 dissous dans 6 cm^3 d'acide acétique glacial sont ajoutés à 200 mg de palladium sur charbon à 10%. On agite pendant 3 h dans une atmosphère d'hydrogène, puis l'acide acétique est évaporé sous 1–2 mm de Hg. Le produit est chromatographié sur plaque préparative de gel de silice Merck PF 254 (éluant: acétate d'éthyle-cyclohexane 30:70) et recristallisé dans un mélange éthanol-cyclohexane. Rdt; 60%. F 77°C. IR (CHCl_3): $\nu_{\text{C=O}}$ 1765. RMN (CDCl_3): δ 2.37 (s, 3, Ar-CH_3); 2.90 (m, 4, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 7.10 (m, 3, ArH). Analyse: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$; calc. C 74.05 H 6.22; tr. C 73.89 H 6.46%. Les spectres RMN et IR ci-dessus sont superposables à ceux de la dihydro-3,4 méthyl-6 coumarine⁴⁴ obtenue par hydrogénation catalytique⁴⁵ de la méthyl-6 coumarine.

Bis(dihydro-3,4 coumarinyl-6) méthane témoin 9

Ce produit a été préparé par hydrogénation catalytique (Pd/C, AcOH) du bis(coumarinyl-6) méthane correspondant⁴⁶ et a été recristallisé dans un mélange benzène-cyclohexane. Rdt: 80%. F 159–160°C. Caractéristiques spectrales IR et RMN identiques à celles du produit de condensation 9 obtenu dans la fraction 4.

Dihydro-3,4 chlorométhyl [¹⁴C]-6 coumarine 6¹⁴C

1.48 g (10^{-2} moles) de dihydro-3,4 coumarine 4 est agité dans 100 cm^3 de soude 0.25 N pendant 2 h. 0.25 cm^3 d'une solution contenant 0.5 mCi de formaldéhyde [¹⁴C] (activité spécifique 6 mCi/mM) est ajouté et le mélange est laissé deux jours à l'obscurité. On y ajoute ensuite 0.75 cm^3 d'une solution à 40% de formol (10^{-2} M). La suite de la synthèse est la même que pour la dihydro-3,4 chlorométhyl-6 coumarine non marquée. Par distillation sous vide puis recristallisation dans un mélange cyclohexane- CCL_4 1:1, on obtient 110 mg de produit marqué 6¹⁴C. Rdt: 8%. F 89–91°C. Radioactivité spécifique: 6.5 $\mu\text{Ci/mM}$.

Hydroxyméthylation de l'acide (hydroxy-2 phényl) propionique 3 catalysée par l'acide borique

10 g d'acide méliotique, 5.4 g de paraformaldéhyde et 5.58 g d'acide borique sont chauffés à 93–97°C sous agitation pendant 6 h dans 10 cm^3 de toluène. Le toluène est ensuite évaporé, le résidu repris par une solution de bicarbonate et le pH ajusté à 7.5. Après évaporation de l'eau, le sel sec est mis en suspension dans du benzène anhydre, puis on ajoute 10 cm^3 de chlorure de thionyle en refroidissant à 0°. La solution est ensuite agitée à température ambiante pendant 24 h, filtrée et le filtrat évaporé. L'huile jaune ainsi obtenue est distillée sous 0.3 mm de Hg. Le mélange d'isomères ortho- et para-chlorométhylés bout à 135–145°C. En RMN le mélange obtenu contient 60% d'isomère ortho-chlorométhylé 7 et 40% d'isomère para-chlorométhylé 6 au lieu de 40% de 7 et 60% de 6 dans l'hydroxyméthylation catalysée par la soude en milieu aqueux.

3H Chlorométhyl-5 benzofuranone-2 14, 3H chlorométhyl-7 benzofuranone-2 15 et bis (3H one-2 benzofuranyl-5) méthane 16

Nous avons appliqué à l'acide (hydroxy-2 phényl) acétique 11 le même mode opératoire que pour l'hydroxyméthylation en milieu aqueux alcalin de l'acide (hydroxy-2 phényl) propionique 3. Le distillat est scindé en trois fractions. Fraction 1: E_0 , 80°C. Elle contient de la 3-H benzofuranone-2 12. Fraction 2: E_0 , 130–135°C. Elle contient un mélange des 2 isomères ortho- et para-monochlorométhylés. Lors d'une distillation, nous avons obtenu une fraction très riche en 3H chlorométhyl-7 benzofuranone-2 15. Ce produit a été purifié par recristallisation dans un mélange CCL_4 -cyclohexane (1:1). F 88–89°C. IR (CHCl_3): $\nu_{\text{C=O}}$ 1810. RMN (CDCl_3) δ 3.75 (s, 2, $\text{Ar-CH}_2\text{-CO}$); 4.67 (s, 2, $\text{Ar-CH}_2\text{Cl}$); 7.25 (m, 3, ArH). Le produit majoritaire généralement obtenu est la 3-H chlorométhyl-5 benzofuranone-2 14 purifiée par recristallisation dans un mélange CCL_4 -cyclohexane (1:1). Rdt: 15%. F 74–75°C. IR (CHCl_3): $\nu_{\text{C=O}}$ 1810. RMN (CDCl_3): δ 3.75 (s, 2, $\text{Ar-CH}_2\text{-CO}$); 4.60 (s, 2, ArCH_2Cl); 7.30 (m, 3, ArH). Comme dans la série dihydrocoumarinique le o- CH_2Cl résonne à champ plus fort que le p- CH_2Cl . Analyse $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_2\text{Cl}$ calc. C 59.20; H 3.87; O, 17.53; Cl 19.42; tr. C, 59.04; H, 4.40; O, 17.81; Cl, 19.28%.

La structure de 14 a été déterminée par hydrogénolyse en 3H méthyl-5 benzofuranone-2 17 (voir ci-dessous). Fraction 3: E_0 , 220–240°C. Elle contient un produit de condensation, le bis(3H one-2 benzofuranyl-5) méthane 16 qui est recristallisé dans le chloroforme. F 177–178°C. IR (Nujol) $\nu_{\text{C=O}}$ 1810. RMN (CDCl_3 , DMSO): δ 3.75 (s, 4, $\text{Ar-CH}_2\text{-CO}$); 3.95 (s, 2, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$); 7.07 (m, 6, ArH). Analyse: $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{O}_4$. Ses caractéristiques spectrales IR et RMN sont proches de celles du bis(dihydro-3,4 coumarinyl-6) méthane 9; c'est pourquoi nous lui attribuons la structure 16.

3H méthyl-5 benzofuranone-2 17

L'hydrogénolyse de la 3H chlorométhyl-5 benzofuranone-2 14 s'effectue dans l'acide acétique en présence de palladium sur charbon, de la même façon que pour son homologue 6, et conduit à la 3H méthyl-5 benzofuranone-2 17. F 70–71°C. IR (CHCl_3) $\nu_{\text{C=O}}$ 1810. RMN (CDCl_3) δ 2.32 (s, 3, Ar-CH_3); 3.67 (s, 2, $\text{Ar-CH}_2\text{-CO}$); 7.05 (m, 3, ArH). Les spectres IR et RMN de 17 sont entièrement superposables à ceux de la 3H méthyl-5 benzofuranone-2 témoin [F 71°C (litt.²⁹ F 74°)] obtenue par la méthode de Aubert.²⁹

Par hydrolyse alcaline les deux échantillons de 17 conduisent au même acide (hydroxy-2 méthyl-5 phényl) acétique: F 123°C (litt.²⁹ F 123.5°C); IR (CHCl_3) $\nu_{\text{C=O}}$ 1700. RMN (CDCl_3) δ 2.25 (s, 3, CH_3); 3.60 (s, 2, CH_2); 6.90 (m, 3, ArH); 8.55 (s, 2, OH).

Dihydro-3,4 nitro-8-bromométhyl-6 coumarine 22

Nitration de l'acide (o-hydroxyphényl)-3 propionique 3. 7.47 g (4.5×10^{-2} moles) d'acide méliotique 3 dissous dans 0.1 mole d'anhydride acétique (9.44 cm^3) sont agités mécaniquement dans un réacteur maintenu à –30°C par un bain acétone-carboglace. Un mélange de 5.25×10^{-2} moles d'anhydride acétique et de 6.5×10^{-2} moles d'acide nitrique concentré est ajouté goutte à goutte. L'addition dure environ 1 h, puis le mélange est agité 3 h 30 à –30°C. L'anhydride acétique est évaporé sous 1–2 mm de Hg. Le mélange réactionnel est repris à l'éther puis lavé avec une solution de NaCl. La phase organique est séchée sur

Na₂SO₄ puis évaporée. Elle contient principalement l'acide (nitro-3 hydroxy-2 phényl)-3 propionique 19.

(Nitro-3 hydroxy-2 phényl)-3 propionate d'éthyle 20. Le mélange réactionnel brut ainsi obtenu est repris par 50 cm³ d'éthanol sec dans lequel on fait barboter HCl gazeux jusqu'à saturation. Après avoir laissé au repos pendant une nuit, l'éthanol est évaporé et le produit repris par de l'éther et lavé par une solution de bicarbonate glacée. Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation de la phase étherée, le mélange est chromatographié sur colonne de Florisil 60/100. L'ester 20 est élué par un mélange hexane-éther (98:2). On recueille ainsi 3.1 g d'une huile jaune. Rdt global à partir de 3: 33%. IR (liq. pur) $\nu_{C=O}$ 1700; ν_{NO_2} 1535 et 1335. RMN (CDCl₃): δ 1.32 (t, 3, CH₂-CH₃); 2.90 (m, 4, CH₂-CH₂); 4.08 (q, 2, CH₂-CH₃); 6.87 (q, 1, H-5), 7.52 (q, 1, H-6), 7.95 (q, 1, H-4), 10.85 (s, 1, OH). Analyse: C₁₁H₁₃NO₆ calc. C 55.23 H 5.48 N 5.86; tr. C 54.59 H 5.43 N 6.18%.

Acide (nitro-3 hydroxy-2 phényl)-3 propionique 19. Le (nitro-3 hydroxy-2 phényl) propionate d'éthyle 20 est saponifié par la soude normale à reflux pendant 1 h. Après acidification à pH 2 par HCl concentré, puis extraction au chloroforme suivie d'un séchage sur Na₂SO₄ on obtient l'acide 19 qui est recristallisé dans du tétrachlorure de carbone. Rdt: 65%. F 118-119°C. IR (CHCl₃) $\nu_{C=O}$ 1705. RMN (CDCl₃) δ 2.80 (m, 4, CH₂-CH₂); 6.80 (q, 1, H-5); 7.45 (q, 1, H-6); 7.95 (q, 1, H-4); 10.20 (m, 2, OH). Analyse: C₉H₉NO₆.

Acide (nitro-3 hydroxy-2 bromométhyl-5 phényl)-3 propionique 21

Bromométhylation du (nitro-3 hydroxy-2 phényl)-3 propionate d'éthyle 20. Dans un réacteur tricol muni d'un agitateur mécanique et d'un réfrigérant 2.15 g (3 × 10⁻³ moles) de 20 et 1.21 g (0.0135 mole) de paraformaldéhyde sont dissous dans 7.5 cm³ de HBr à 48-50% et 0.1 cm³ de H₂SO₄ 36 N. Le mélange est chauffé à 66 ± 1°C; un précipité apparaît au bout de 15 min. Après 3 h de chauffage le précipité est essoré sur verre fritté, repris par de l'éther et séché sur MgSO₄. Après évaporation de la phase étherée, l'acide 21 est recristallisé dans le benzène. Rdt: 30%. F 159-160°C. IR (CHCl₃) $\nu_{C=O}$ 1710; ν_{NO_2} 1535 et 1370. RMN (CDCl₃) δ 2.80 (m, 4, CH₂-CH₂); 4.75 (s, 2, Ar-CH₂Br); 7.52 (d, 1, ArH); 7.95 (d, 1, ArH); 9.45 (m, 1, OH); 10.80 (m, 1, OH). Analyse: C₁₀H₁₀NO₆Br.

Bromométhylation de l'acide (nitro-3 hydroxy-2 phényl)-3 propionique 19. Même mode opératoire que précédemment, mais le temps de chauffe est porté à 6 h. Le produit bromométhylé 21 obtenu avec un rendement de 50% a le même point de fusion et les mêmes caractéristiques spectrales que celui obtenu à partir de l'ester 20.

Acide (nitro-3 hydroxy-2 hydroxyméthyl-5 phényl) propionique 23. 100 mg (0.3 × 10⁻³ mole) d'acide (nitro-3 hydroxy-2 bromométhyl-5 phényl) propionique 21 sont dissous dans 10 cm³ d'un mélange acétone-eau. Après 1 h d'agitation, l'acétone est évaporée et la phase aqueuse extraite à l'éther, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée. L'acide 23 est recristallisé dans le chloroforme. Rdt: 85%. F 113-114°C. IR (Nujol) $\nu_{C=O}$ 1705. RMN (CD₂COCD₂) δ 2.85 (m, 4, CH₂-CH₂); 4.62 (s, 2, Ar-CH₂); 7.57 (d, 1, ArH); 7.92 (d, 1, ArH); 10.5 (m, 3, OH). Analyse: C₁₀H₁₁NO₆ calc. C 49.79 H 4.60 N 5.81; tr. C 49.13 H 4.62 N 5.62%.

Dihydro-3,4 nitro-6 bromométhyl-6 coumarine 22. 228 mg (10⁻³ moles) d'acide (nitro-3 hydroxy-2 bromométhyl-5 phényl) propionique 21 sont mis en suspension dans 70 cm³ de benzène sec. A cette suspen-

sion on ajoute 2 cm³ de chlorure de thionyle et le mélange est chauffé à reflux pendant 6 h. Après évaporation du solvant et de l'excès de SOCl₂ on obtient une huile incolore qui est constituée par la dihydrocoumarine 22 pratiquement pure. IR (liq. pur) $\nu_{C=O}$ 1795. RMN (CDCl₃) δ 3.00 (m, 4, CH₂-CH₂); 4.48 (s, 2, Ar-CH₂Br); 7.52 (d, 1, ArH); 7.80 (d, 1, ArH).

Dihydro-3,4 nitro-6 bromométhyl-8 coumarine 29

Acide (nitro-5 hydroxy-2 phényl)-3 propionique 24. Cet acide est obtenu par hydrolyse de la dihydro-3,4 nitro-6 coumarine 5th par une solution de Na₂CO₃, suivie d'acidification par HCl concentré et extraction à l'éther. Rdt: 90%. F 154°C (litt.³⁴ F 154°C).

(Nitro-5 hydroxy-2 phényl)-3 propionate d'éthyle 25. Nous avons employé le même mode opératoire que pour l'estérification de l'acide (nitro-3 hydroxy-2 phényl)propionique 9. L'ester 25 obtenu est recristallisé dans le benzène. Rdt: 80%. F 88-89°C [litt.³⁷ 89, 5-90°C]. IR (CHCl₃) $\nu_{C=O}$ 1710. RMN (CDCl₃) δ 1.30 (t, 3, CH₂-CH₃); 2.90 (m, 4, CH₂); 4.20 (q, 2, CH₂-CH₃); 6.90 (d, j = 10.5, 1, H-3); 7.00 (d + s, 2, ArH).

Acide (nitro-5 hydroxy-2 bromométhyl-3 phényl)-3 propionique 28. Nous avons d'abord repris le même mode opératoire que celui que nous avons employé pour préparer son isomère ortho-nitré 21. Le produit 26 obtenu avec 60% de rendement à partir de l'acide (nitro-5 hydroxy-2 phényl)propionique 24 et avec 45% de rendement à partir de l'ester éthylique 25, est recristallisé dans le benzène. F 160-162°C. IR (CHCl₃) $\nu_{C=O}$ 1710. RMN (CDCl₃ + DMSO) δ 2.70 (m, 4, CH₂-CH₂); 5.00 (s, 2, Ar-CH₂-O); 5.40 (s, 2, O-CH₂-O); 7.85 (d, 1, ArH); 7.96 (d, 1, ArH); 9.75 (m, 1, OH). Spectre de masse m/e 253. Analyse C₁₁H₁₁NO₆ calc. C, 52.17; H, 4.38; O, 37.91; N, 5.53; tr.% C, 52.04; H, 4.41; O, 37.15; N, 5.57%. Spectre UV: dans EtOH, λ_{max} 312 nm (ϵ 8700); dans NaOH 0.1 N, λ_{max} 320 nm (ϵ 800) et 425 nm (ϵ 2500).

L'analyse élémentaire et les caractéristiques spectrales de ce produit, ainsi que sa réaction avec le diazométhane (vide infra) correspondent à la structure 26. En milieu acide il perd une molécule de formol pour donner l'acide (nitro-5 hydroxy-2 bromométhyl-3 phényl)-3 propionique 28: 300 mg de 26 sont chauffés 4 h à 66° dans un mélange de 7 cm³ de HBr à 40% et de 0.1 cm³ de H₂SO₄ concentré. Après filtration, séchage et recristallisation dans le benzène, on obtient 250 mg d'un produit fondant à 147-148°C.

Ce dernier produit 28 peut être également obtenu par bromométhylation directe de 24 dans les conditions suivantes: Un mélange de 5 g d'acide 24, de 3.5 g de paraformaldéhyde, de 40 cm³ de HBr à 40% (d = 1.49) et de 2.5 cm³ de H₂SO₄ concentré est chauffé dans un réacteur pendant 12 h à 66°. Au bout de 30 min on observe une dissolution, puis un nouveau précipité apparaît après 45 min de chauffage. Celui-ci est filtré sur verre fritté, dissous dans l'éther, séché sur sulfate de magnésium et recristallisé dans le benzène. Rdt: 50%. F 147-148°C. IR (CHCl₃) $\nu_{C=O}$ 1705. RMN (CDCl₃ + DMSO) δ 2.75 (m, 4, CH₂-CH₂); 4.50 (s, 2, ArCH₂Br); 8.00 (q, 2, ArH); 9.65 (m, 2, OH). Analyse: C₁₀H₁₀NO₆Br.

Acide (nitro-5 hydroxy-2 hydroxyméthyl-3 phényl)propionique 30. Même mode opératoire que pour l'obtention de son isomère 23. Rdt: 90%. F 143-144°C. IR $\nu_{C=O}$ 1700. RMN (CDCl₃ + DMSO) δ 2.70 (m, 4, CH₂-CH₂); 4.72 (s, 2, ArCH₂OH); 7.92 (s, 2, ArH); 8.20 (m, 3, OH). Analyse C₁₀H₁₁NO₆.

Dihydro-3,4 nitro-6 bromométhyl-8 coumarine 29. 300 mg d'acide (nitro-5 hydroxy-2 bromométhyl-3 phényl)propionique **28** sont mis en suspension dans un mélange de 100 cm³ de benzène sec et de 2 cm³ de chlorure de thionyle et chauffés 48 h à reflux. Après évaporation on obtient des cristaux légèrement jaunes qui sont recristallisés dans CCl₄. F 149–150°C. IR (CHCl₃): $\nu_{\text{C=O}}$ 1785. RMN (CDCl₃+DMSO) δ 2.95 (m, 4, CH₂-CH₂); 4.55 (s, 2, ArCH₂Br); 8.20 (q, 2, ArH). Analyse: C₁₀H₈NO₂Br.

Ethérisation de 26 par le diazométhane. Une solution de diazométhane dans l'éther est ajoutée goutte à goutte à 100 mg de **26** dissous dans du tétrahydrofurane jusqu'à coloration jaune pesante. Le mélange est agité pendant 1/2 h puis le solvant est évaporé. Le produit obtenu **27** est recristallisé dans un mélange CCl₄-cyclohexane. La réaction est quantitative. F 81–82°C. IR (CHCl₃) $\nu_{\text{C=O}}$ 1740. RMN (CDCl₃) δ 2.75 (m, 4, CH₂-CH₂); 3.62 (s, 3, CH₃); 4.88 (s, 2, CH₂); 5.30 (s, 2, CH₂); 7.85 (m, 2, ArH). UV dans EtOH λ_{max} 307 nm (ϵ 8200); dans NaOH 0.1 N λ_{max} 320 nm (ϵ 7250).

Dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl-8 coumarine 33. **Bromométhyl-8 coumarine 32.** Dans un ballon muni d'un réfrigérant, 800 mg (5×10^{-3} moles) de méthyl-8 coumarine **31**,²⁶ 890 mg (5×10^{-3} moles) de N-bromo succinimide et 70 mg de peroxyde de benzoyle sont chauffés à reflux pendant 3 h 30 dans 15 cm³ de tétrachlorure de carbone. Le succinimide formé, est filtré à chaud. La bromométhyl-8 coumarine **32** qui précipite à froid dans le filtrat est essorée et dissoute dans 50 cm³ de CHCl₃. La solution est lavée par du bicarbonate glacé, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée. La bromométhyl-8 coumarine est recristallisée dans un mélange chloroforme-CCl₄ (1:9). Rdt: 50%. F 106–107°C. IR (CHCl₃) $\nu_{\text{C=O}}$ 1730. RMN (CDCl₃) δ 4.70 (s, 2, Ar-CH₂Br); 6.42 (d, j = 9, 1, H-3); 7.68 (d, j = 9, H-4); 7.35 (m, 3, ArH). Analyse: C₁₀H₇O₂Br.

Dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl-8 coumarine 33. 0.3 cm³ de brome dissous dans 0.5 cm³ de CHCl₃ sont ajoutés goutte à goutte à 240 mg (10^{-3} moles) de bromométhyl-8 coumarine **32**. Le mélange est laissé pendant 5 h à température ambiante puis l'excès de brome est enlevé par lavage au moyen d'une solution glacée de sulfite de sodium à 10%. Après séchage de la phase chloroformique sur MgSO₄ pendant quelques minutes puis évaporation du chloroforme, le produit **33** est lavé au tétrachlorure de carbone glacé. Rdt: 66%. F 135–137°C. IR (CHCl₃) $\nu_{\text{C=O}}$ 1785. RMN (CDCl₃) δ 4.60 (d, 2, Ar-CH₂Br); 4.98 (d, j = 2, 1, H-3); 5.35 (d, j = 2, 1, H-4); 7.40 (m, 3, ArH). Analyse: C₁₀H₇O₂Br.

Dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl[³H]-6 coumarine 38T

Bromométhyl-6 coumarine 35. Elle a été préparée selon une modification de la méthode de Lecoq⁴⁰ décrite antérieurement.¹

Hydroxyméthyl-6 coumarine 36.⁴¹ Dans un ballon muni d'un réfrigérant, 10 g de bromométhyl-6 coumarine **35** sont mis en suspension dans 500 cm³ d'eau. Le mélange est chauffé à reflux pendant 2 h. Après refroidissement de la solution obtenue dans la glace, l'hydroxyméthyl-6 coumarine **36** précipite. Elle est essorée puis recristallisée dans le chloroforme. Rdt: 67%. F 145–146°C [litt.⁴¹ F 150°C]. IR (Nujol) $\nu_{\text{C=O}}$ 1715. RMN (CDCl₃) δ 4.45 (m, 1, OH); 4.66 (s, 2, ArCH₂OH); 6.62 (d, j = 9, 1, H-4); 7.30 (m, 3, ArH); 7.63 (d, j = 9, H-3).

Formyl-6 coumarine 37. Nous avons adapté à l'hydroxyméthyl-6 coumarine **36** la méthode décrite par Lee⁴² pour l'oxydation de l'alcool benzylique en benzaldéhyde. Dans un ballon muni d'un réfrigérant 1.76 g (10^{-3} moles) d'hydroxyméthyl-6 coumarine **36** et 2.98 g (10^{-3} moles) de bichromate de sodium sont chauffés à reflux pendant 3 h dans 10 cm³ d'eau en agitant. Après refroidissement, le pH est ajusté à 9 avec de la soude normale et la phase aqueuse est extraite 3 fois par 50 cm³ de CHCl₃, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée. La formyl-6 coumarine **37** obtenue est recristallisée dans un mélange éthanol-eau. Rdt: 84%. F 189–191°C [litt.³⁹ F 187°C]. IR (Nujol) $\nu_{\text{C=O}}$ aldéhyde 1695; $\nu_{\text{C=O}}$ lactone 1720. RMN (DMSO) δ 6.60 (d, j = 9, H-3); 7.55 (d, j = 9, 1, H-4); 8.10 (m, 3, ArH); 10.40 (s, 1, CHO).

Hydroxyméthyl[³H]-6 coumarine 36T. 174 mg (10^{-3} moles) de formyl-6 coumarine **37** sont mis en suspension dans 5 cm³ de méthanol; le mélange est agité magnétiquement et on y ajoute 10 mCi de NaBT₄ dissous dans 2 cm³ d'eau. On laisse agir 5 min pour que toute la radioactivité soit bien incorporée puis la réduction est achevée par addition de 19 mg (0.5×10^{-3} mole) de NaBH₄ non radioactif. Le mélange est agité pendant 20 min puis on ajoute 2.5 cm³ de HCl à 10%. La solution est à nouveau agitée pendant 20 min. Après évaporation du méthanol on extrait la phase aqueuse par CHCl₃. La phase chloroformique est lavée 3 fois par 10 cm³ d'un mélange acétone-eau (1:2) afin d'échanger le tritium de l'hydroxyle contre un hydrogène, et le solvant évaporé. Le produit n'a pas été purifié davantage à cette étape.

Bromométhyl[³H]-6 coumarine 35T. Le produit de réduction **36T** est mis en suspension dans 40 cm³ de CHCl₃ dans lequel on fait barboter HBr sec jusqu'à saturation et dissolution. Après 12 h à 20°C, le chloroforme est évaporé et le bromure **35T** est purifié sur plaque préparative de gel de silice Merck PF₂₅₄ (éluant acétate d'éthyle-cyclohexane 30:70). Rdt: 55% par rapport à la formyl-6 coumarine. F 147–148°C. Radioactivité spécifique 0.73 mCi/ μ M. RMN (CDCl₃) δ 4.52 (s, 2, Ar-CH₂Br); 6.50 (d, j = 9, 1, H-3); 7.65 (d, j = 9, 1, H-4); 7.45 (m, 3, ArH).

Dihydro-3,4 dibromo-3,4 bromométhyl[³H]-6 coumarine 38T. 0.21 cm³ de brome dissous dans 1.5 cm³ de CHCl₃ sont ajoutés goutte à goutte à 134 mg de bromométhyl[³H]-6 coumarine **35T** dissous dans 2 cm³ de CHCl₃. Le mélange est agité pendant 6 h puis l'excès de brome est enlevé par un lavage avec une solution glacée de sulfite de sodium à 10%. Après séchage sur MgSO₄ pendant quelques minutes, le produit est lavé par CCl₄ glacé. Rdt: F 116–117°C. RMN (CDCl₃) δ 4.52 (s, 2, CH₂Br); 5.00 (d, j = 2, 1, H-3); 5.35 (d, j = 2, 1, H-4); 7.40 (m, 3, ArH). Activité spécifique 0.73 mCi/ μ m.

Remerciements—Nous remercions le Dr. R. Azerad dont les conseils nous ont été très précieux pour la préparation des dérivés radioactifs. Ce travail a bénéficié du soutien financier de la D.G.R.S.T. (contrat n° 72.7.0062).

REFERENCES

- J. J. Bechet, A. Dupaix, J. Yon, M. Wakselman, J.-C. Robert et M. Vilkas, *Europ. J. Biochem.* **35**, 527 (1973)
- B. R. Baker, *Design of active site-directed irreversible inhibitors*, Wiley, New York, 1967
- E. Shaw in P. D. Boyer, *The Enzymes*, 3e éd., Vol. 1, Academic Press, New York 1970, p. 91
- W. B. Lawson et H. J. Schramm, *Biochemistry*, **4**, 377 (1965)

- ⁵R. J. Vaughan et F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 217 (1969)
- ⁶H. R. Horton et G. Young, *Biochim. Biophys. Acta* **194**, 272 (1969)
- ⁷P. Bodlaender et E. Shaw, *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 810 (1971)
- ⁸H. R. Horton et D. E. Koshland, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1126 (1965)
- ⁹M. L. Bender et F. J. Kezdy, *Ibid.* **86**, 3704 (1964)
- ¹⁰E. B. Ong, E. Shaw et G. Schoellmann, *J. Biol. Chem.* **240**, 694 (1965)
- ¹¹R. Henderson, *Biochem. J.*, **124**, 13 (1971)
- ¹²A. B. Turner, *Quart. Rev.*, **18**, 347 (1964)
- ¹³G. Decodts, M. Wakselman et M. Vilkas, *Tetrahedron* **26**, 3313 (1970)
- ¹⁴M. Wakselman, J.-C. Robert, G. Decodts et M. Vilkas, *Bull. Soc. Chim.*, 1179 (1973)
- ¹⁵J. J. Birkoft et D. M. Blow, *J. Mol. Biol.*, **68**, 187 (1972)
- ¹⁶P. Tobias, J. H. Heidema, K. W. Lo, E. T. Kaiser et F. J. Kezdy, *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 202 (1969)
- ¹⁷J. J. Bechet, A. Dupaix et J. Yon, résultats non publiés
- ¹⁸M. Sommelet, *Comptes Rendus Acad. Sci.*, **197**, 256 (1933)
- ¹⁹J.-C. Robert, thèse de 3e cycle, Orsay, 1971
- ²⁰J. F. Hamon, thèse de 3e cycle, Orsay, 1973
- ²¹J. F. Walker, *Formaldehyde*, 3e ed., Reinhold, N. Y. 1964, p. 304
- ²²H. P. Higginbottom, H. M. Culbertson et J. C. Woodbrey, *Anal. Chem.*, **37**, 1021 (1965)
- ²³W. H. Gray, *J. Chem. Soc.* 1150 (1925)
- ²⁴M. Wakselman et M. Vilkas, *Comptes Rendus Acad. Sci.*, **259**, 4292 (1964)
- ²⁵P. L. Southwick et L. L. Seivard, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2532 (1949)
- ²⁶T. S. Gardner, E. Wenis et J. Lee, *J. Org. Chem.* **26**, 1514 (1961)
- ²⁷H. G. Peer, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **79**, 825 (1960)
- ²⁸T. Nakamura et S. Kijima, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1681 (1972)
- ²⁹O. Aubert, E. Augdahl et E. Berner, *Acta Chem. Scand.*, **6**, 433 (1952)
- ³⁰R. C. Fuson et C. H. McKeever, *Organic React.*, **1**, 63 (1942)
- ³¹G. A. Olah, *Friedel Crafts and Related Reactions*, Vol. II, part 2, Interscience, N. Y., 1964, p. 659
- ³²C. A. Buehler, F. K. Kirchner et G. F. Deebel, *Organic Syntheses*, Coll. Vol. III, p. 468
- ³³H. R. Horton et D. E. Koshland Jr. in C. H. W. Hirs, *Methods in Enzymology*, Vol. XI, Academic Press, New York 1967, p. 556
- ³⁴T. R. Ingle et B. V. Bhide, *Journal of the University of Bombay*, Vol. XXIII, part 3, 1954, p. 33; *Chem. Abstracts* **50**, 332d (1956)
- ³⁵A. A. Spryskov, *Zhur. Org. Khim.*, 1965, 1, 1941
- ³⁶E. N. Marvell, B. Richardson, R. Anderson, J. L. Stephenson et T. Crandall, *J. Org. Chem.*, **30**, 1032 (1965)
- ³⁷L. Horner et E. H. Winkelmann in W. Foerst, *Newer Methods of Preparative Organic Chemistry*, Vol. III, Academic Press, New York, 1964, p. 151
- ³⁸R. C. Fuson, J. Wayne, K. Neisley et E. W. Kaiser, *Organic Syntheses*, Coll. Vol III, p. 209
- ³⁹R. Sen et D. Chakravarty, *J. Am. Chem. Soc.*, **50**, 2428 (1928)
- ⁴⁰J. Lecocq, *Ann. Chim.* **3**, 62 (1948)
- ⁴¹R. Stoermer et E. Oetker, *Ber.*, **37**, 192 (1904)
- ⁴²D. G. Lee et U. A. Spitzer, *J. Org. Chem.*, **35**, 3589 (1970)
- ⁴³Z. J. Kanevska et A. M. Fedorova, *Z. Anal. Chem.*, **93**, 176 (1933)
- ⁴⁴T. Nakabayashi, *J. Pharm. Soc.*, Japan, **74**, 23 (1954)
- ⁴⁵E. Spath et O. Pesta, *Ber.*, **66**, 754 (1933)
- ⁴⁶S. P. Prajapati et S. Sethna *J. Indian Chem. Soc.*, **49**, 391 (1972)
- ⁴⁷C. D. Gutsche et B. A. M. Oude-Alink, *Amer. Chem. Soc.*, **90**, 5855 (1968)