

Aminolyse de Carbamates Cycliques analogues de la Carboxybiotine ; Catalyse Métallique et Modélisation de Transfert de Carboxyle

par Jean-Marie BOTELLA*, Alain KLAEBE*, Jacques PERIE* et Eric MONNIER**

* Groupe de Chimie Organique Biologique rattaché aux Laboratoires I.R.M.C.P. (URA CNRS 470) et S.S.R.M.P. (URA CNRS 454), Université P. SABATIER, 31062 TOULOUSE CEDEX, FRANCE.

** Laboratoire de Chimie Générale, (URA CNRS 1103), Conservatoire National des Arts et Métiers, 75141 PARIS CEDEX 03, FRANCE.

(Received in Belgium 17 April 1992)

Key Words : aminolysis ; mechanism ; cyclic carbamates ; metallic catalysis ; carboxybiotin analogues.

Abstract

Aminolysis of carbamic esters, a model of the intermediate carboxybiotin in enzymatic carboxylations was studied in organic medium in the presence of a divalent cation. This study establishes electrostatic catalysis of aminolysis, the rate determining step of which is the collapse of the tetrahedral intermediate principally by carbon-nitrogen bond breaking. The results also account for the role of the divalent cation present in the carboxytransferase subunit of carboxylases.

Introduction

Malgré l'abondance des études menées sur ce sujet depuis plus de trente années¹, le mode d'action du coenzyme biotine continue de susciter de nombreux travaux. En effet l'une et l'autre demi-étape (schéma 1) de ces réactions de carboxylation enzymatique, dans lesquelles ce cofacteur est impliqué, continuent de poser un certain nombre de questions demeurées pour l'instant sans réponse ; pour la première demi-étape, celle concernant la nature de l'intermédiaire actif, carboxyphosphate ou phosphobiotine n'est toujours pas résolue²; de même la réponse à la question de la nature du donneur effectif de carboxyle, anion bicarbonate ou anhydride carbonique, considérée précédemment comme acquise, a été récemment remise en cause¹. Concernant la deuxième demi-réaction, s'il a été montré que celle-ci procède par étapes et non par un mécanisme concerté³, la question de la force motrice de la rupture de la liaison carbone-azote dans la carboxybiotine reste ouverte ; il a en particulier été montré qu'un cation divalent est nécessaire à cette réaction de transfert^{4,5} sans qu'il soit établi si ce cation participait à la réaction ou bien jouait seulement un rôle structural^{6,7}.

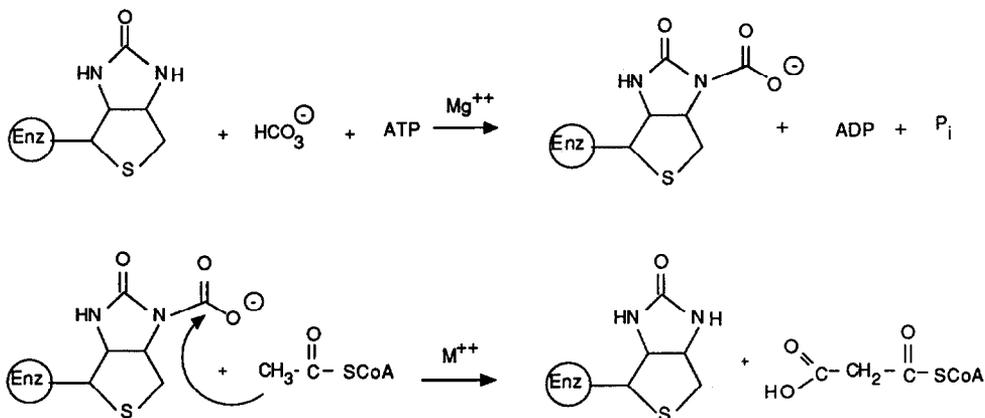
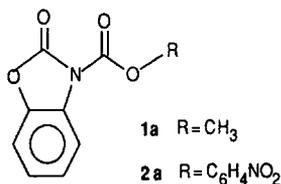


schéma 1

Dans le but d'apporter une contribution à cette dernière question, nous avons étudié une réaction modèle de transfert de carboxyle de la carboxybiotine à l'accepteur (2° demi-étape) : celle de l'aminolyse d'analogues de carboxybiotine, l'amine jouant le rôle de l'accepteur de la réaction enzymatique. Nous avons plus précisément cherché à déterminer l'effet d'un cation métallique sur la partition de l'intermédiaire tétraédrique résultant de l'attaque de l'amine sur le groupement carboxyle d'esters de type carbamate cyclique. Afin de permettre une forte interaction entre substrat ou intermédiaire et cation métallique, l'étude a été réalisée en milieu solvant organique. Cette situation a également permis d'apporter une contribution à l'étude de l'aminolyse des esters en milieu non aqueux.

MODELISATION ET CHOIX DES SUBSTRATS

Le choix des substrats a été dicté par des analogies structurales avec la biotine : ce sont des benzocarbamates cycliques. Ces composés présentent suffisamment d'analogie avec ce cofacteur pour constituer un modèle simplifié acceptable. L'hétérocycle ne comporte qu'un seul atome d'azote et le groupe benzo permet de stabiliser l'anion formé lors de l'attaque de la fonction carbamate extracyclique par l'amine, rendant en outre cet anion cinétiquement observable. Les dicarbamates **1a** et **2a** présentent une attaque univoque de la fonction extracyclique ce qui n'est pas le cas des urées cycliques⁸. Le groupe partant R a été sélectionné afin de disposer de deux substituants différents : méthanolate (mauvais groupe partant) et paranitrophénate (bon groupe partant). Le milieu réactionnel a été choisi de façon à ne pas être trop éloigné du milieu enzymatique⁹ : il s'agit du solvant acétonitrile et la réaction étudiée est l'aminolyse par la butylamine des deux carbamates mentionnés plus haut.



Les réactions sont données dans le schéma 1 pour la réaction enzymatique et le schéma 2 pour la réaction modèle ; dans les deux cas il s'agit d'une attaque nucléophile du carbonyle extracyclique de la fonction carbamate.

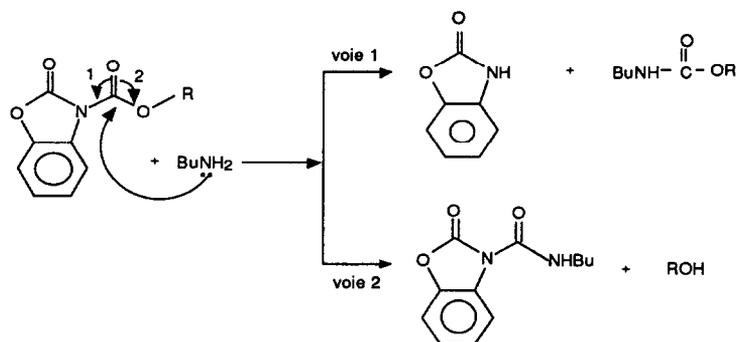


schéma 2

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1 - Aminolyse du Substrat **1a** : (groupe partant OCH_3)

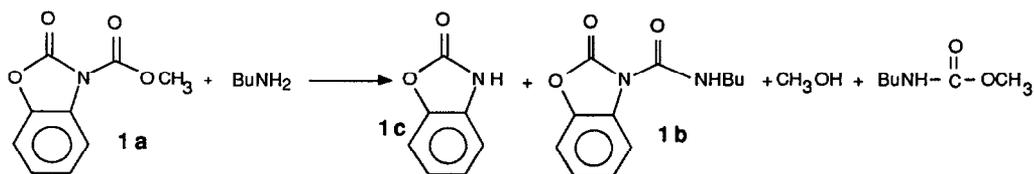


schéma 3

Etude R.M.N. préalable.

La réaction d'aminolyse de **1a**, suivie par R.M.N. du proton (concentration de **1a** et de la butylamine : 0,201 M. dans CH_3CN perdeutéié à 36°C) montre, après disparition totale du produit de départ, la formation de deux produits, ce qui correspond à deux coupures : entre azote intracyclique et carbone du carbonyle (coupure C-N) d'une part et coupure entre ce même carbone et l'oxygène du groupement partant OCH_3 (coupure C-O) avec un rapport de coupure, dans ces conditions expérimentales, C-N:C-O = 3. Ceci est en accord avec le fait que l'anion amidure correspondant à la coupure C-N doit être fortement stabilisé par sa conjugaison avec le groupe benzo.

Mise en évidence d'un intermédiaire réactionnel.

Le suivi de la réaction par R.M.N. du proton permet de mettre en évidence un intermédiaire réactionnel. On peut en effet observer l'évolution, en fonction du temps, des différents signaux méthyle en utilisant cette spectroscopie. Au fur et à mesure de l'avancement de la réaction on observe la disparition d'un signal à 4 ppm correspondant au méthoxy de **1a**, l'apparition de deux signaux à 3,28 et 3,56 ppm correspondant respectivement au méthanol et au butylcarbamate de méthyle qui sont les produits de la réaction et dont la concentration croît avec le temps; un dernier signal, non attribué, est observé à 3,66 ppm. Ce dernier, relativement important au moment de l'enregistrement du premier spectre, voit son intensité diminuer puis s'annuler au fur et à mesure de l'avancement de la réaction (figure 1). Ce signal correspond à un intermédiaire réactionnel qui s'accumule dans le milieu et qui disparaît en fin de réaction. Ce signal pourrait correspondre à l'intermédiaire tétraédrique analogue à celui envisagé lors de l'aminolyse des esters¹⁰ et qui a pu être observé par spectrographie de R.M.N.¹¹. D'autres arguments sont en faveur de cet intermédiaire commun aux deux produits de la réaction : l'observation d'un rapport constant de coupure dans le temps sensiblement égal à 3 (voir figure 1), le fait que le déplacement chimique du groupement méthoxyle de l'intermédiaire à 3,66 ppm est situé à champ plus faible que les autres groupes. Ces

arguments vont dans le sens d'une structure tétraédrique comportant un atome de carbone central entouré de quatre atomes fortement électro-négatifs **1a₁**.

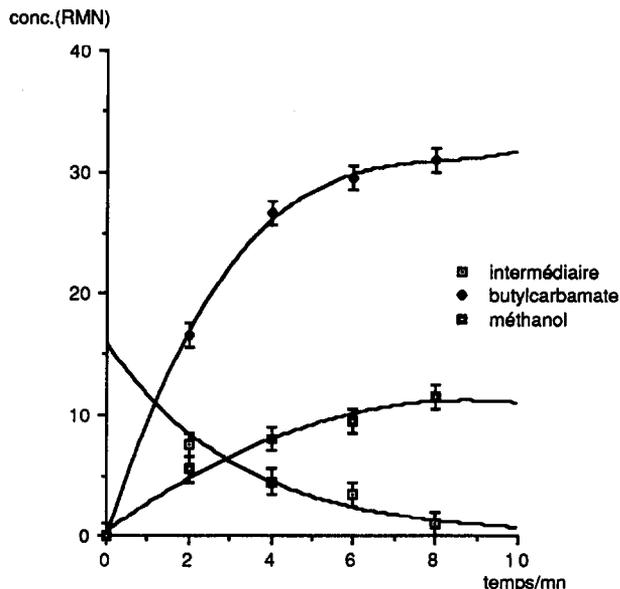
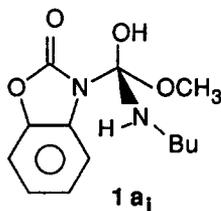


figure 1 : Suivi en RMN du proton de la variation des concentrations de l'intermédiaire réactionnel, du butylcarbamate et du méthanol en fonction du temps.



Etude cinétique de la réaction par spectroscopie U.V.

L'étude cinétique de l'aminolyse du substrat **1a** a nécessité la détermination préalable des paramètres spectroscopiques des différents réactifs et produits de la réaction d'aminolyse par la butylamine. Ceux-ci ont été synthétisés séparément et étudiés en spectroscopie U.V.. Il s'agit des composés donnés dans le tableau 1 dont la longueur d'onde du maximum d'absorption et le coefficient d'absorption moléculaire ont été déterminés. Une des difficultés du suivi cinétique de la réaction d'aminolyse vient de l'identité des maximums d'absorption des différents protagonistes de la réaction, la seule variable étant leurs différences de coefficients d'extinction moléculaire (tableau 1) ; il n'était donc pas possible, dans ces conditions, de les observer individuellement. Le seul critère pouvant être retenu est la variation d'intensité de la bande U.V. à 273 nm.. Les conditions expérimentales qui ont été utilisées sont les suivantes : $[1a] = 10^{-4} M$; $3.33 \cdot 10^{-2} \leq [BuNH_2] \leq 10^{-1} M$; $[H_2O] = 1.3 \cdot 10^{-2} M$; solvant : CH_3CN ; temp. = 20 °C ; $\lambda_{max} = 273 \text{ nm}$.

L'expérience montre qu'en excès de butylamine, la variation de la densité optique (D.O.) en fonction du temps à 273 nm, est exponentielle. Par ailleurs la constante cinétique expérimentale dépend de la concentration en amine ; ceci indique que la réaction est d'ordre 1 pour **1a**, **1b**, **1c** et **1a₁** (le rapport **1b/1c** restant constant au cours de la

réaction d'aminolyse ainsi que la somme des concentrations des différentes entités réactionnelles ; ceci est corroboré par l'observation R.M.N.). La réaction globale est du pseudopremier ordre puisque la constante de vitesse expérimentale dépend de la concentration en amine.

Deux cas de figure peuvent rendre compte des données expérimentales :

- a - la formation lente d'un intermédiaire tel que **1 a** et sa décomposition rapide en produits, ce qui est contradictoire avec le suivi par R.M.N. de la réaction où l'on observe un intermédiaire qui s'accumule et disparaît,
 b- la formation rapide d'un intermédiaire de type ci-dessus et sa décomposition lente en produits de la réaction

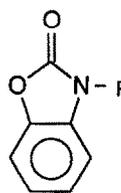
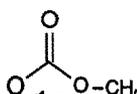
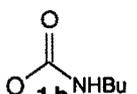
R				H 1 c	⊖ 1 d
λ_{max} (nm)		273	273	273	295 ^{a,b}
ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)		2310	2086	4333	-

Tableau 1 : Caractéristiques spectroscopiques U.V. des différents dérivés de **1 a**

a : épaulement

b : le λ_{max} de l'anion **1 d** a été mesuré par observation de l'évolution du spectre UV de la réaction de la butylamine sur **1 c** dans l'acétonitrile.

Nous nous sommes arrêtés à la deuxième hypothèse explicatrice : la formation de l'intermédiaire très rapide et sa décomposition lente, d'ordre 1 pendant l'observation. Nous nous sommes assurés qu'une réaction secondaire possible, celle de l'aminolyse de **1 b** par la butylamine conduisant à l'urée correspondante, n'interferait pas avec la réaction principale ; cette réaction secondaire, étudiée indépendamment, montre une évolution très lente avec un temps de demi-réaction de l'ordre d'une semaine dans les conditions expérimentales utilisées pour le substrat **1 a**.

Equation cinétique et paramètres d'activation.

La variation de la constante de vitesse en fonction de la concentration en butylamine (figure 2) obéit à une équation de type suivant :

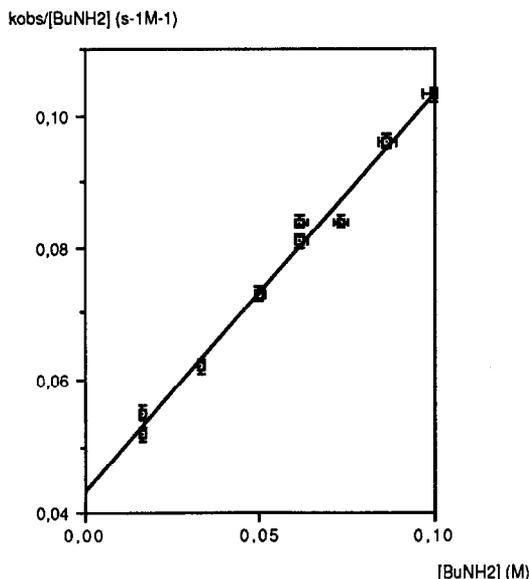
$$k_{\text{obs}} = k_1 [\text{BuNH}_2] + k_2 [\text{BuNH}_2]^2$$

Nous nous sommes assurés qu'un troisième terme en

$$k_3 [\text{H}_2\text{O}] [\text{BuNH}_2]$$

correspondant à une éventuelle hydrolyse amino ou basocatalysée du substrat était très faible, donc négligeable, par rapport aux deux premiers termes : en effet bien que faible, la concentration en eau n'est pas négligeable comparée à celle du substrat. Ceci a été montré par l'étude de l'hydrolyse basocatalysée de **1 a** en présence d'une amine tertiaire. La constante de vitesse obtenue est faible par rapport à k_1 et k_2 ¹² (tableau 2).

Nous sommes donc en présence d'une réaction d'aminolyse non catalysée à laquelle se superpose la même réaction catalysée par l'amine. C'est une situation bien décrite dans la littérature pour les aminolyses d'esters en milieu organique¹⁰. Nous avons également étudié l'effet de la température sur les constantes de vitesse ce qui permet de déterminer les paramètres d'activation des deux processus correspondant à k_1 et k_2 . Les valeurs sont donnés dans le tableau 2.

Figure 2 : Détermination des deux constantes de vitesse d'aminolyse de **1a**

T (°K)	296.1	308.1	313.1		ΔH^\ddagger kJ mol ⁻¹	ΔS^\ddagger J K ⁻¹ mol ⁻¹	ΔG^\ddagger kJ mol ⁻¹ (300 K)
k_1 (s ⁻¹ M ⁻¹)	0.0431	0.0761	0.120	k_1	41 ± 8	-130 ± 25	80.5
k_2 (s ⁻¹ M ⁻²)	0.607	0.694	1.034	k_2	13 ± 4	-196 ± 33	72.5

Tableau 2 : Constantes de vitesse (2% d'erreur) et paramètres d'activation correspondant aux deux mécanismes d'aminolyse du substrat **1a**.**2 - Aminolyse du substrat 2a : (groupe partant *p*-nitrophénate).**

Nous nous trouvons dans la situation d'une aminolyse d'un carbamate avec un bon groupe partant. L'aminolyse par la butylamine de ce substrat a été étudié dans des conditions expérimentales analogues à celles utilisées pour le précédent : $[2a] = 10^{-4}$ M ; $3.33 \cdot 10^{-2} \leq [BuNH_2] \leq 10^{-1}$ M ; $[H_2O] = 1.3 \cdot 10^{-2}$ M ; solvant CH_3CN ; temp. = 20 °C.

La réaction est suivie par spectroscopie U.V. à 420 nm. La variation observée de D.O. en fonction du temps s'effectue en deux étapes : une étape préliminaire très rapide suivie d'une étape plus lente que nous avons montré être la deuxième étape de la séquence suivante (schéma 4). En effet le tableau 3 donne les constantes de vitesse de pseudopremier ordre de l'aminolyse de **2a** et de $BuNHC(O)OC_6H_4NO_2$ dans les conditions expérimentales ci-dessus, ces deux réactions étant étudiées bien entendu séparément.

Ce tableau montre que la réaction cinétiquement observable est celle correspondant à l'étape 2 du schéma 4 et que ces deux réactions, étudiées indépendamment obéissent également à une loi cinétique de la forme :

$$k_{obs} = k_1 [BuNH_2] + k_2 [BuNH_2]^2.$$

Il est donc clair que dans les conditions expérimentales décrites, il n'est pas possible (sauf utilisation de méthodes de cinétique rapide) d'obtenir des informations cinétiques directes sur l'aminolyse de **2a**.

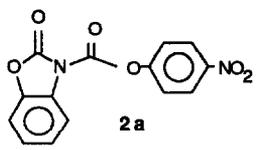
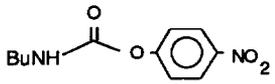
$10^3 k_{\text{obs}}$ (s^{-1}) /[BuNH_2] (M)	 2a	 3
0.1	3.27	3.27
0.062	1.65	1.57
0.033	0.651	0.654

Tableau 3 : constantes de vitesse ($\pm 2\%$) de pseudopremier ordre d'aminolyse de **2a** et **3** dans des conditions expérimentales identiques (voir texte).

Par contre si l'on considère dans le schéma 4 la fin de la première étape rapide, la densité optique (D.O.) observée à 420 nm correspond à la formation de parantrophénol de la voie 2 (rupture C-O), alors que le phénomène cinétique lent qui succède au précédent (2^e étape) observé à la même longueur d'onde, correspond à la formation de parantrophénol à partir de l'aminolyse du carbamate **3** formé par la voie 1 (rupture C-N). Le rapport des densités optiques infinies (D.O._∞) des deux étapes (dont les vitesses sont très différents) permet de déterminer les rapports de coupure C-N/C-O. dans le cas du substrat **2a**.

Le tableau 4 donne les rapports de coupure pour **1a** et **2a** ; on remarque que ce rapport est fortement dépendant de la qualité du groupe partant ce qui est en faveur du mécanisme dans lequel l'étape déterminant la vitesse serait l'effondrement de l'intermédiaire tétraédrique (voir plus bas).

3 - Aminolyse des substrats **1a** et **2a** en présence d'ion magnésium. Effet de l'eau résiduelle et sélectivité .

Substrat **1a**.

Des essais préliminaires en présence d'ion Zinc (ZnCl_2) montrent des effets faibles et peu reproductibles sur la cinétique de la réaction d'aminolyse, à faible concentration en amine. A forte concentration en amine on observe une inhibition de la réaction sans doute due à la complexation de l'ion par l'amine.

En ce qui concerne l'ion magnésium introduit sous forme de perchlorate, une étude préliminaire montre qu'il est nécessaire de sécher soigneusement le solvant acétonitrile pour éviter la formation d'un trouble colloïdal. Le séchage du solvant sur tamis moléculaire 3Å permet de descendre la teneur en eau résiduelle à environ $2 \cdot 10^{-2}$ mol/l ce qui fait disparaître cet inconvénient. Dans ces conditions, l'aminolyse de **1a** conduit aux constantes de vitesse de pseudopremier ordre données dans le tableau 5. Un séchage plus drastique de l'acétonitrile (chauffage à reflux en présence de diisopropylamine et perchlorate de magnésium suivi d'une distillation) permet de diminuer la concentration en eau à $3 \cdot 10^{-3}$ M. Dans ces conditions les constantes de vitesse d'aminolyse sont augmentées de façon appréciable en présence d'ion magnésium (voir tableau 5). L'accélération observée, lorsque l'on diminue la concentration de l'eau résiduelle dans l'acétonitrile en présence de l'ion magnésium, doit être vraisemblablement liée à une diminution de la solvation par l'eau de ce cation le rendant plus disponible pour une action catalytique (voir plus bas). Concernant les effets de l'ion magnésium sur la sélectivité de la coupure deux types d'expériences ont été effectués.

- La première qui considère les D.O._∞ en spectroscopie U.V., permet de déterminer la variation de la sélectivité de la réaction dans les conditions suivantes :

coupure C-N par rapport à la coupure C-O (voir tableau 4).

		sans Mg ⁺⁺	avec Mg ⁺⁺
1 a	C - N	66	80
	C - O	33	20
2 a	C - N	10	18
	C - O	90	82

Tableau 4 : Taux en % de coupure C - N par rapport à la coupure C - O en présence et en absence d'ion Mg⁺⁺.

[1a] = $1.15 \cdot 10^{-4}$ M ; [BuNH₂] = $3.33 \cdot 10^{-2}$; temp. = 20°C ; λ = 282 nm

[Mg ⁺⁺] (M) \ [BuNH ₂] (M)	0	10^{-3}	4.10^{-3}
$1.67 \cdot 10^{-2}$	0.69	6.55	-
$3.33 \cdot 10^{-2}$	1.61	11.8	83.1
$10 \cdot 10^{-2}$	8.25	26.4	-

Tableau 5 : Influence de la concentration en ion Magnésium sur le k_{obs} d'aminolyse de **1 a** pour une concentration en [H₂O] = 2.10^{-2} M ; [1a] = $2.3 \cdot 10^{-4}$ M ; temp. : 20°C ; $10^3 \cdot k_{\text{obs}}$ (s⁻¹) (erreur \pm 2%)

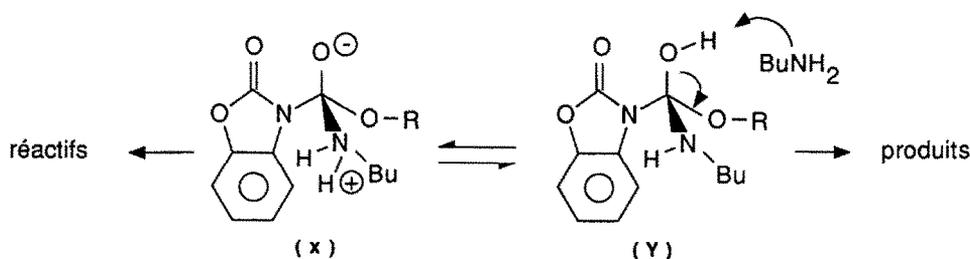
DISCUSSION

1- la réaction d'aminolyse

Deux mécanismes d'aminolyse des esters carboxyliques ont été proposés dans la littérature, compatibles avec une loi de vitesse contenant plusieurs termes par rapport à la concentration en amine, loi analogue à celle que nous avons mise en évidence pour les deux carbamates cycliques étudiés dans ce travail :

- un premier correspondant à la formation lente d'un intermédiaire tétraédrique, pouvant être assistée par une catalyse basique générale. La décomposition de cet intermédiaire tétraédrique est rapide et conduit aux produits de la réaction ;

- un deuxième mécanisme pour lequel la formation de l'intermédiaire s'effectue par un prééquilibre rapide, l'étape déterminant la vitesse étant dans ce cas la décomposition de cet intermédiaire, cette dernière étant assistée par une molécule d'amine qui jouerait le rôle de base générale. Plus précisément l'EDV pourrait être la déprotonation de l'intermédiaire neutre (y) formé rapidement par prototropie à partir de (x) et le départ du groupe RO⁻. L'intermédiaire (x) ne peut se décomposer qu'en direction des réactifs et la décomposition de l'intermédiaire neutre (y) conduit dans ce cas à l'éjection d'un amide neutre. Ce mécanisme a déjà été proposé dans le cas d'aminolyse d'esters carboxyliques en milieu non aqueux¹⁰. Ce schéma est en accord avec le fait que la réaction a lieu dans l'acétonitrile et que dans ces solvants aprotiques polaires les pK_a augmentent et de ce fait la qualité de groupe partant diminue considérablement ce qui a pour effet de diminuer la vitesse de décomposition de l'intermédiaire¹³. Ce mécanisme est cohérent également avec les paramètres d'activation déterminés dans le cas du substrat **2a**. La réaction catalysée est favorisée par 12 kJ mol⁻¹ (3 kcal mol⁻¹), malgré une consommation d'origine entropique de 20 kJ mol⁻¹ (4.8 kcal mol⁻¹), compensée par un gain enthalpique de 32 kJ mol⁻¹ (6.7 kcal mol⁻¹).



L'enthalpie de ce processus doit être relativement abaissée ce qui est en accord avec une décomposition basocatalysée de l'intermédiaire tétraédrique alors que les variations d'entropie sont élevées ce qui implique une réorganisation du solvant importante dans l'état de transition ; ceci a été déjà observé dans ces milieux et pour ce type de réaction¹¹. Cette variation d'entropie est encore plus marquée dans le cas de la réaction catalysée étant donné les réorganisations supplémentaires des réactifs entre eux.

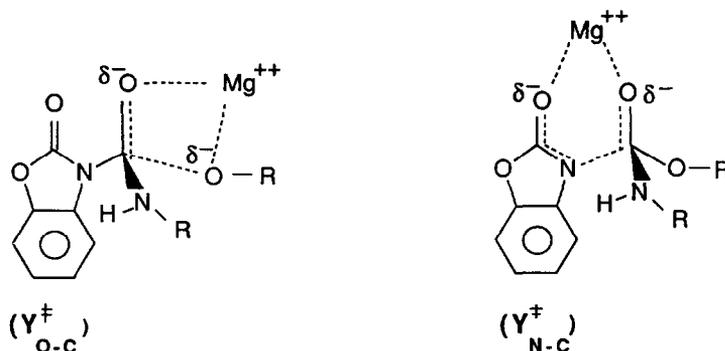
2- catalyse par l'ion magnésium

Nous observons que les ions magnésium rajoutés au milieu réactionnel interviennent par deux effets : d'une part la vitesse de réaction d'aminolyse est augmentée et d'autre part le pourcentage de coupure entre atome d'azote de l'hétérocycle et groupement carboxyle est également augmenté.

Cette catalyse traduit une stabilisation des états de transition conduisant aux produits dans l'hypothèse où l'étape déterminant la vitesse consiste en l'effondrement de l'intermédiaire tétraédrique.

Cette dernière observation est également cohérente avec la sélectivité de la réaction en absence ou en présence d'ions magnésium. En effet si l'on considère les deux états de transition de la figure ci-dessous, il en ressort que celui correspondant à la coupure C-N ($Y^{\ddagger}_{C,N}$) sera plus stabilisé par un ion magnésium que celui correspondant à la coupure C-O ($Y^{\ddagger}_{C,O}$) (cycle à six chaînons, participation de l'oxygène amidique).

La sélectivité observée en présence d'ions magnésium, confirme bien l'assistance de ce cation à la coupure de la liaison azote-carbone.



En transposant ces résultats à la réaction enzymatique, on peut donc penser qu'un ion métallique, cofacteur de la sous-unité carboxyle-transférase aurait un rôle non seulement structural⁷, mais qu'il participerait directement à la réaction de transfert et jouerait un rôle décisif en ce qui concerne le contrôle du transfert du carbonate de la carboxybiotine à un accepteur.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les cinétiques ont été suivies à l'aide d'un spectrophotomètre U.V. UNICAM S.P. 1800 ou BECKMAN U.V. 5260, les cuves sont thermostatées à ± 0.1 °C. Les cinétiques très rapides ont été suivies par la méthode d'écoulement arrêté (stopped flow) à l'aide d'un appareil DURUM D110. Les spectres I.R. ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre PERKIN ELMER 683. les spectres de R.M.N. 1H ont été enregistrés sur VARIAN T60 et ^{31}P BRUCKER WH (90 Mz), référence PO_4H_3 85%. L'acétonitrile utilisé est de qualité spectroscopique : UVASOL MERCK. La teneur en eau de l'acétonitrile a été déterminée à l'aide d'un aquamètre beckman fonctionnant selon la méthode de KARL-FISHER. Le composé **1c** a été acheté chez JANSSEN CHIMICA, les chlorocarbonates chez ALDRICH, le perchlorate de magnésium chez ALFA.

Synthèse de 1a : Dans une solution chloroformique (50 ml, le solvant est préalablement séché sur hydrure decalcium puis distillé) contenant $1,1 \cdot 10^{-2}$ mole de benzoxazolidinone (1,5 g.) et $1,18 \cdot 10^{-2}$ mole de triéthylamine (1,19 g.) on ajoute à la température ambiante, goutte à goutte et en agitant, 25 ml. de chloroforme contenant 0,04 mole de chlorocarbonate de méthyle (3,78 g.). Après 30 minutes le mélange est évaporé. On purifie ensuite le composé **1a** par passage du résidu sur une colonne de gel de silice élué par un mélange chloroforme/pentane : 9/1 v/v. Rendement 75%. Analyse élémentaire : trouvé C : 55,66 ; H : 3,75 ; N : 7,12 ; O : 30,78 . Calculé pour $C_9H_7N_1O_4$: C : 55,96 ; H : 3,65 ; N : 7,25 ; O : 33,13 .R.M.N. 1H : ($CDCl_3$) : δ 4,2 (3H, s) ; 7,4 (3H, m) ; 7,8 (1H, m) ppm. IR (KBr) ν_{CO} : 1750 intracyclique, 1830 extracyclique, cm^{-1} . UV voir tableau 1. $F^\circ C = 192$.

Synthèse de 2a : Dans une solution benzénique (50 ml, le solvant est préalablement séché sur sodium en présence de benzophénone puis distillé) contenant $7,4 \cdot 10^{-3}$ mole de benzoxazolidinone (1 g.) et $7,4 \cdot 10^{-3}$ mole de chlorocarbonate de paranitrophényle (1,49 g.), on ajoute goutte à goutte en agitant et sous argon sec 25 ml. de benzène contenant $7,4 \cdot 10^{-3}$ mole de triéthylamine séchée, le précipité est filtré en atmosphère contrôlée puis recristallisé dans un mélange éther/pentane 9/1 v/v. Rendement 20%. Analyse élémentaire : trouvé C : 55,01 ; H : 2,70 ; N : 8,84 ; O : 29,70 . Calculé pour $C_{14}H_8N_2O_6$: C : 56,01 ; H : 2,69 ; N : 9,33 ; O : 31,97 .R.M.N. 1H : (CD_3CN) : δ 7,4 (3H, m) ; 7,5-7,6 (2H, m) ; 7,8 (1H, m) ; 8,4-8,5 (2H, m) ppm. IR (KBr) ν_{CO} : 1750 intracy-

clique, 1830 extracyclique, cm^{-1} . UV voir tableau 1. $F^\circ\text{C} = 192$.

Synthèse de 3 : Dans une solution de benzène contenant $5,95 \cdot 10^{-3}$ mole de chlorocarbonate de paranitrophényle (1,2 g.) on verse, sous atmosphère inerte, 50 ml. d'une solution de benzène contenant $5,95 \cdot 10^{-3}$ mole de butylamine (0,434 g.) et $5,95 \cdot 10^{-3}$ mole de triéthylamine (0,601 g.). Cette manipulation est effectuée aux alentours de 0°C et l'ajout de la solution d'amine s'effectue extrêmement lentement afin d'éviter la réaction d'aminolyse du produit recherché au fur et à mesure de sa formation. Après filtration la solution est évaporée en atmosphère contrôlée. Le solide obtenu est lavé à l'alcool froid et recristallisé dans le chloroforme. Analyse élémentaire : trouvé C : 55,32 ; H : 5,94 ; N : 11,66 ; O : 26,71 . Calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_6$: C : 55,46 ; H : 5,92 ; N : 11,76 ; O : 26,86. R.M.N. ^1H : (CDCl_3) : δ 3,2 (2H, m) ; 5 (1, s) ; 7,2-7,3 (2H, m) ; 8,2-8,3 (2H, m) ppm. IR (KBr) ν_{CO} : 1710 extracyclique, ν_{NH} : 3320 cm^{-1} . UV voir tableau 1. $F^\circ\text{C} = 98$.

Synthèse de 1b : Une solution chloroformique contenant 0,01 mole de benzoxazolidinone (1,35 g.), 0,01 mole d'isocyanate de butyle (0,99 g.) et $3 \cdot 10^{-3}$ mole de triéthylamine (0,303 g.) est portée à reflux pendant 45 mn. puis évaporée à sec . Le mélange est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange chloroforme/pentane 9/1 v/v; Rendement 50%. R.M.N. ^1H : (CDCl_3) : δ 3,2 (2H, m) ; 7 (3H, m) ; 8 (1H, m) ppm. $F^\circ\text{C} = 75$.

REFERENCES ET NOTES

- 1- J. R. Knowles, *Ann. Rev. Biochem.*, (1989) **58** 195.
- 2- D. E. Hansen, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.*, (1985) **107** 8304.
- 3- P. R. Atwood, P. Tipton, W. W. Cleland, *Biochemistry*, (1986) **25** 8197.
- 4- M. C. Scrutton, M. F. Utter, A. J. Mildvan, *J. Biol. Chem.*, (1966) **241** 3480.
- 5- D. B. Northrop, H. G. Wood, *J. Biol. Chem.*, (1969) **244** 5801.
- 6- J. A. Carver, G. S. Baldwin, D. B. Keech, R. Bais, J. C. Wallace, *Biochem. J.*, (1988) **252** 501.
- 7- F. Lynen, *Biochem. J.*, (1967) **102** 381.
N. G. Wood et R.E. Barden, *Ann. Rev. Biochem.*, (1977) **385** 385.
M. J. Wimmer et J.A. Rose, *ibid* (1978) **47** 1031.
- 8- E. Monnier, A. Kláčébé et J. J. Périé, *Tetrahedron*, (1985) **41** 3269.
- 9- R. Lipscomb, *Chem. Soc. Rev.*, (1972) **1** 319.
D. E. Koshland, K. E. Neet, *Ann. Rev. Biochem.*, (1968) **37** 359.
W. P. Jencks, "Catalysis in Chemistry and Enzymology", Mc Graw-Hill, New-York (1969).
- 10- F.M. Menger, A. C; Vitale, *J. Am. Chem. Soc.*, (1973) **95** 4931
F. Rivetti et U. Tonellato, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, (1977) **9** 1176.
M. Julia et H. Mestdagh, *Tetrahedron*, (1984) **40** 327.
W. P. Jencks et A. C. Satterwait, *J. Am. Chem. Soc.*, (1874) **96** 708.
- 11- R. A. Mc Clelland et A. C. L. J. Santry, *Acc. Chem. Research*, (1983) **16** 394.
- 12 - $[\text{Ia}] = 2.3 \cdot 10^{-3}$; $[\text{Et}_3\text{N}] = 10^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}] = 1.3 \cdot 10^{-2}$; solvant : CH_3CN ;
temp. = 22.9°C ; $k_{\text{obs}} = 1.55 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et $1.58 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$;
- 13 - E. Monnier, J. M. Botella, A. Murillo, A. Kláčébé et J. Périé, *Tetrahedron* (1986) **42** 1315.