

This article was downloaded by:

On: 30 January 2011

Access details: Access Details: Free Access

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713618290>

PHOSPHORYLATION COMPÉTITIVE DE DÉRIVÉS D'URÉES/THIOURÉES ET DE CARBAMATES/THIOCARBAMATES EN RELATION AVEC LE MODÈLE O-PHOSPHBIOTINE

G. Etemad-moghadam^a; A. Klaebe^b; J. J. Perie^a

^a ERA 264; UER PCA, Université Paul Sabatier, Toulouse Cedex, (France) ^b Bat IIR1, UER PCA, Université Paul Sabatier, Toulouse Cedex, (France)

To cite this Article Etemad-moghadam, G. , Klaebe, A. and Perie, J. J.(1981) 'PHOSPHORYLATION COMPÉTITIVE DE DÉRIVÉS D'URÉES/THIOURÉES ET DE CARBAMATES/THIOCARBAMATES EN RELATION AVEC LE MODÈLE O-PHOSPHBIOTINE', Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 12: 1, 61 — 74

To link to this Article: DOI: 10.1080/03086648108078290

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/03086648108078290>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

PHOSPHORYLATION COMPÉTITIVE DE DÉRIVÉS D'URÉES/THIOURÉES ET DE CARBAMATES/THIOCARBAMATES EN RELATION AVEC LE MODÈLE O-PHOSPHOBIOTINE.

G. ETEMAD-MOGHADAM,† A. KLAEBE‡ and J. J. PERIE†

†ERA 264; ‡ERA 926, Bat IIR1, UER PCA, Université Paul Sabatier, 118, Route
de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex (France)

(Received May 26, 1981; in final form August 11, 1981)

The phosphorylation of a number of heterocyclic substrates, such as ureas and carbamates, and their sulfur analogues, has been investigated with the object of clarifying previous results concerning the site of phosphorylation of this type of substrate, which can also be considered as synthetic models for O-phosphobiotin.

Among the different phosphorylation reagents used, those of the general type $(\text{ArO})_2\text{P} \begin{smallmatrix} \nearrow \text{X} \\ \searrow \text{Cl} \end{smallmatrix}$ (X = O, S)

appear to be the most suitable for this type of reaction.

Reactions carried out with various substrates show that the phosphorylation is controlled by structural factors, in both the substrate and reagent, which lead to stabilization of the negative charge in the activated form. In the majority of cases studied, the products observed are those arising from N-phosphorylation which probably result from the rearrangement of an O(S) phosphorylated intermediate.

In the case of the sulfur derivatives, an S-phosphorylated intermediate was in fact isolated and characterized but the rearrangement, S → N, was not observed. This can be considered as an analogue for the desired model of "O-phosphobiotin." In the case of the oxygen derivatives, we have found indirect evidence for the existence for a kinetically formed O-phosphorylated species, from its ability to act as a competitive phosphate transfer agent.

La phosphorylation de substrats hétérocycliques de type urées et carbamates, ainsi que celle de leurs analogues soufrés, a été étudiée dans le but de clarifier les résultats antérieurs relatifs au site de phosphorylation de ce type de substrat et par ailleurs en vue de synthétiser des modèles de O-phosphobiotine.

Parmi les différents réactifs employés, les composés du type $(\text{ArO})_2\text{P} \begin{smallmatrix} \nearrow \text{X} \\ \searrow \text{Cl} \end{smallmatrix}$ (X = O ou S) s'avèrent être

les mieux adaptés à la réaction.

Ces réactions effectuées avec différents substrats montrent que la phosphorylation est contrôlée par les facteurs (tant dans le substrat que dans le réactif), qui stabilisent la charge négative de la forme activée.

Les produits de phosphorylation sont, dans la plupart des cas étudiés, des produits N-phosphorylés, ceux-ci résultant vraisemblablement du réarrangement d'une forme O(S) phosphorylée.

Dans le cas des dérivés soufrés, un produit S-phosphorylé, analogue au modèle "O-phosphobiotine" a pu être caractérisé et isolé mais le réarrangement du groupement phosphorylé, S → N, n'est pas observé. Dans le cas de substrats oxygénés, le produit cinétique O-phosphorylé est indirectement mis en évidence par ses propriétés d'agent de transfert de groupe phosphate.

INTRODUCTION

Parmi les différentes hypothèses relatives au mécanisme d'action de la biotine,¹ co-enzyme des carboxylases et transcarboxylases, un des modèles proposé implique l'activation par O-phosphorylation du cycle uréido par une molécule d'ATP associée au système enzymatique (Figure 1):

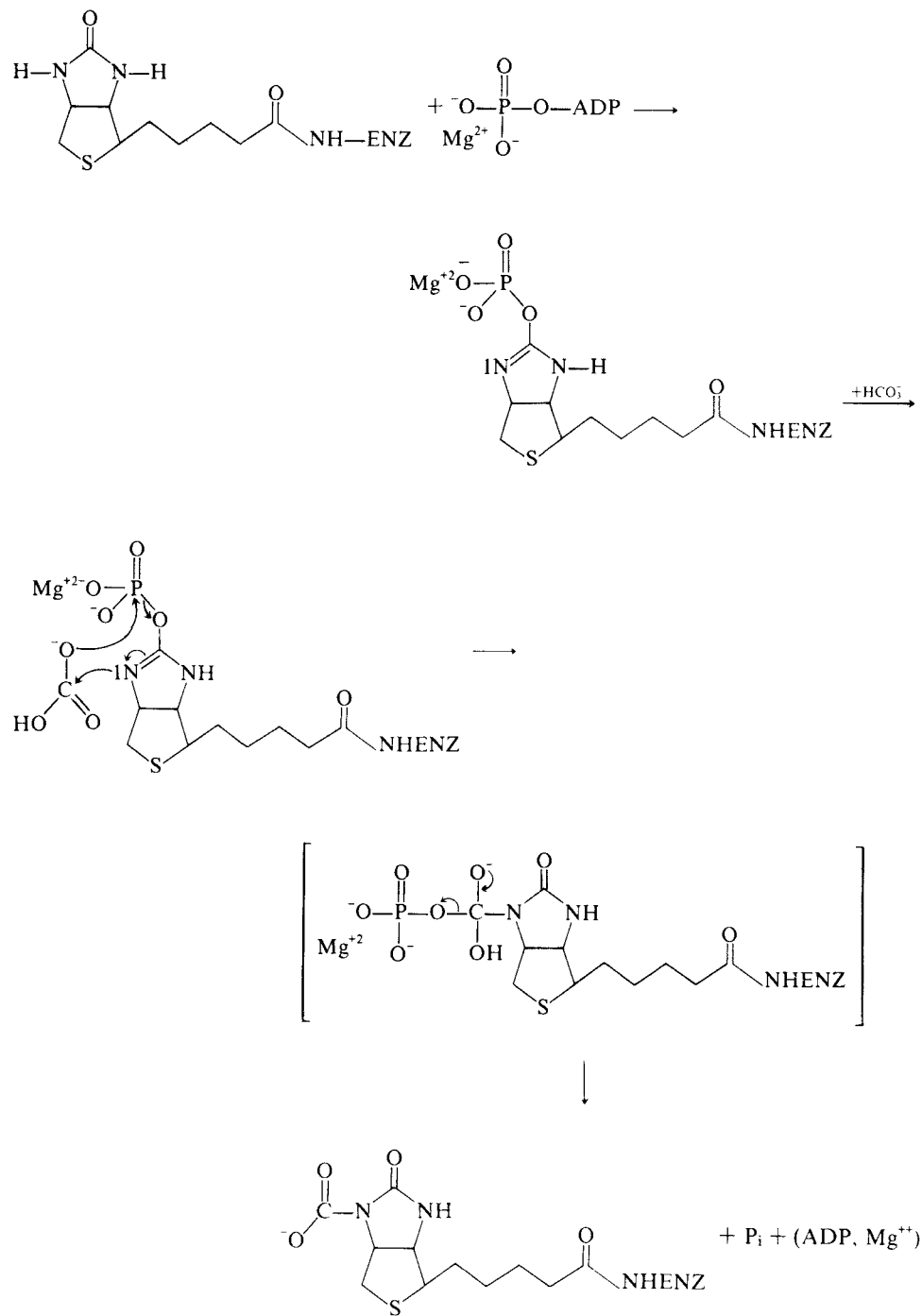


FIGURE 1

A notre connaissance, la seule tentative de modélisation de cette réaction a été proposée par Kluger *et coll.*:² il s'agit de l'hydrolyse d'un diester phosphonique porteur d'un groupement uréido, réaction dans laquelle il est montré le passage par un intermédiaire *O*-phosphonylé.

Le but de ce travail est la synthèse de *O*- ou *S*-phospho(thio)urées, modèles de la forme activée de la biotine dans l'hypothèse présentée, en vue d'étudier par la suite leur réactivité vis à vis de la carboxylation.

Le problème posé par ces synthèses est celui du choix d'un réactif de phosphorylation et de la régiosélectivité de cette réaction.

Ce dernier point, c'est à dire la nature du produit cinétique (*O*-P ou *N*-P), est controversée dans la littérature. En effet Reznik *et coll.*³ indiquent une *O*-phosphorylation de sels de sodium d'uracile; Ning *et coll.*⁴ par action du dimorpholinyldichlorophosphate obtiennent avec les quinazolines et les 1,4-benzodiazépines une *O*-phosphorylation suivie d'un réarrangement thermique *O* → *N*, alors que le même réactif conduit à une *N*-phosphorylation avec les benzoxazolidones. Wakselman *et coll.*⁵ signalent une *N*-phosphorylation dans le cas des 4-hydroxypyridines alors que la 2-hydroxypyridine conduit à un produit *O*-phosphorylé stable. Il faut également citer le réarrangement particulier observé par Cadogan *et coll.*,⁶ de l'azote vers l'oxygène, de phosphinates d'aminophénols substitués. Enfin, il existe dans la littérature de nombreux dérivés phosphorylés des (thio)urées et des (thio)carbammates insecticides, dont les déterminations structurales et les conditions d'obtention sont insuffisamment détaillées.^{7,8}

En ce qui concerne le choix d'un agent de phosphorylation, leur réactivité est interprétée selon les auteurs:

—en terme d'effet de groupement partant sur le caractère dur/mou (polarisabilité) du phosphore par rapport au réactif:⁹ les fluoro et cyanophosphates conduisent à la *O*-phosphorylation, les chlorophosphates à la *N*-phosphorylation d'éthanolamines par exemple.

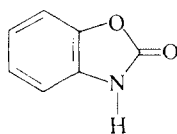
—en terme de conjugaison $p_{\pi}-d_{\pi}$ entre orbitales p du groupe partant et d du phosphore; la diminution de cette conjugaison dans le cas des phosphoguanidates,¹⁰ par complexation métallique, les rend agents efficaces de transfert de phosphoryle.

RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

Le schéma réactionnel de la phosphorylation d'urées, de thiourées, de carbammates et de thiocarbammates cycliques par des agents de phosphorylation variés est représenté Figure 2.

A Réactivité comparée des agents de phosphorylation

Cette réactivité relative a été établie par dosage des produits obtenus, par RMN de ³¹P, lors de la phosphorylation par les réactifs **1** à **8** (Figure 3) de la benzoxazolidone **1a**, substrat de référence, qui ne présente que deux sites nucléophiles (*O* et *N*).



1a

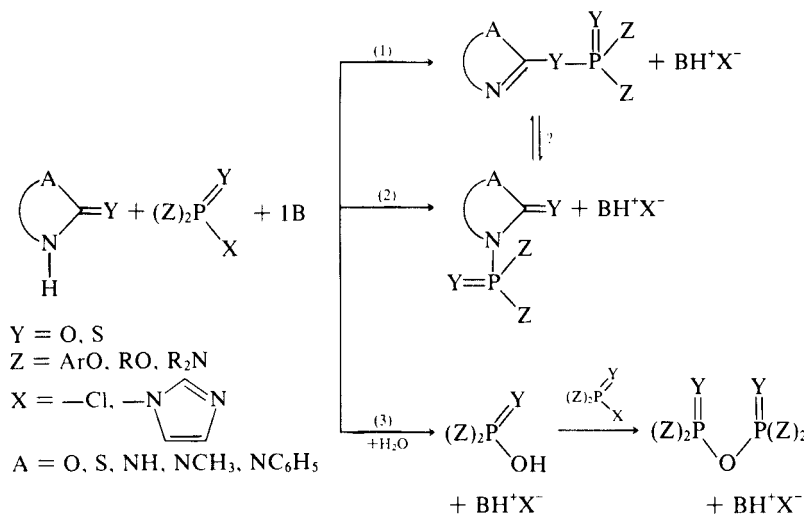
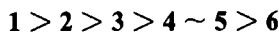


FIGURE 2

1) *Chlorophosphates et chlorophosphoramidates*. Ces réactifs se classent par ordre de réactivité décroissante suivant la séquence ci-dessous:



La forte réactivité de **1**, utilisé dans la synthèse des oligonucléotides,¹¹ est liée à la stabilisation de l'état de transition pentacoordiné.¹² A l'autre extrême, la faible réactivité des phosphochloramidates **4** à **6**, déjà observée lors de leur réaction avec des nucléosides,¹³ des amidines, des alcools,¹⁴ peut être liée à un fort recouvrement $p_\pi-d_\pi$ entre azote et phosphore qui diminue l'électrophilie de ce dernier. Les résultats obtenus montrent que l'agent phosphorylant qui conduit aux plus faibles quantités de produits secondaires tout en étant suffisamment réactif, est le diphenylchlorophosphate **2**.

2) *Thiochlorophosphate*. Le remplacement de l'oxygène phosphoryle dans **2** par un atome de soufre pouvait conduire à une stabilisation des produits de *O*-phosphorylation de **1a**, en diminuant le caractère électrophile de l'atome de phosphore dans le produit. A cet effet, le diphenylchlorothiophosphate **7** a été testé; ce réactif

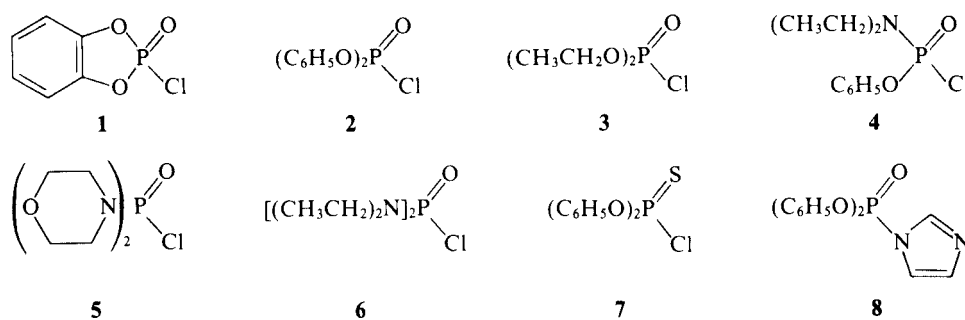


FIGURE 3

TABLEAU I

Etude comparative de la réactivité de différents agents phosphorylants en fonction de la nature du groupement partant et celle des hétéroatomes doublement liés au phosphore vis à vis de la benzoxazolidone **1a**

agent de phosphorylation	% de produit <i>N</i> -phosphorylé (δ ^{31}P)
2	60 (−17,3 ppm)
7	5 (+46,1 ppm)
8	20 (−17,3 ppm)

Solvant: CH_2Cl_2 ; base: Et_3N ; l'agent phosphorylant, le substrat et la base sont en quantité stoechiométrique; temps: 45 mn.

présente une nette diminution de réactivité par rapport à son homologue **2** sans pour autant permettre la détection d'un intermédiaire *O*-phosphorylé de **1a** (Tableau I). La réaction est cependant plus sélective (peu de produits secondaires) et nous avons isolé et caractérisé le produit de phosphorylation formé: l'absence du vibreur ν_{NH} , la présence d'une bande $\nu_{\text{C=O}} = 1800 \text{ cm}^{-1}$, l'analyse du spectre de masse et les déplacements chimiques en RMN de ^1H et ^{31}P sont en accord avec une structure *N*-thiophosphorylée. De toute évidence l'introduction d'un atome de soufre sur le phosphore ne permet pas d'observer le produit de *O*-phosphorylation mais stabilise le produit *N*-phosphorylé.

3) *Diphénylimidazolylphosphoramidate*. Les phosphates,¹⁵ les phosphonates et les phosphinates,¹⁶ porteurs du groupe partant imidazole, sont d'excellents agents de phosphorylation. Le composé **8** réagit sur **1a** en donnant un produit de *N*-phosphorylation (Tableau I) avec un rendement modeste, sa trop grande sensibilité à l'humidité le rend de manipulation difficile et conduit aux produits d'hydrolyse (réaction 3, Figure 2).

4) *Formation de pyrophosphate*. Malgré les précautions prises, les réactifs de phosphorylation que nous avons étudiés subissent tous une hydrolyse partielle conduisant à la formation de pyrophosphate (réaction 3, Figure 2). Cette facilité d'hydrolyse est vraisemblablement liée à une catalyse basique générale due à la présence d'une base dans le milieu réactionnel (vide infra). Le pyrophosphate formé peut lui-même jouer le rôle d'agent de phosphorylation; cette réaction secondaire a été signalée dans la littérature.¹⁷⁻²² Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées, l'observation par RMN de ^{31}P de l'évolution au cours du temps, des concentrations relatives des entités en présence, nous permettent d'exclure une telle réactivité du pyrophosphate formé.

5) *Influence des conditions expérimentales sur les réactions de phosphorylation.*

(a) *le solvant*. Les solvants employés: la pyridine, le DMF, l'acétonitrile, le chlorure de méthylène et le THF sont aprotiques. Les solvants protiques qui conduisent eux-mêmes à des produits de phosphorylation stables, ont été écartés. Il a été postulé que les trois premiers solvants cités forment des intermédiaires phosphorylés très réactifs qui n'interfèrent pas avec la nature des produits de la réaction mais qui participent à leur formation.^{10,23} Par ailleurs, dans les conditions expérimentales utilisées (présence d'une base forte), la polarité du solvant a peu d'effet sur la nature et le rendement des produits de phosphorylation obtenus.

(b) *la base*. Dans le cas où l'agent de phosphorylation est un halogénophosphate, la présence d'une base tertiaire est nécessaire pour capter le proton libéré par

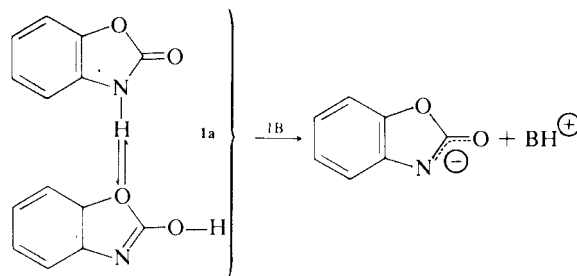


FIGURE 4

la réaction (déplacement d'équilibre). Aucune réaction de phosphorylation n'étant observée en absence de base, même dans le cas du réactif **8** pour lequel le groupe partant est un anion imidazolyle fortement basique, on peut en conclure que celle-ci intervient surtout en tant qu'activateur du substrat. Ce dernier, en présence d'une base doit former un anion délocalisé plus réactif que la forme neutre (Figure 4). Les résultats regroupés dans le Tableau II vont dans ce sens.

La valeur du pK_a de la base joue un rôle déterminant sur l'avancement de la réaction. L'anomalie apparente, relative à l'utilisation de l'hydruide de sodium, est due au fait qu'environ 25% du substrat **1a** disparaît par réduction en orthoaminophénol.²⁴

(c) *la température*. Les résultats rassemblés dans le Tableau II ont été obtenus à 25°C et seule la forme *N*-phosphorylée est observée dans ces conditions. Nous avons tenté, en opérant à basse température (−40 à −80°C suivant le solvant) de détecter l'hypothétique produit cinétique (O-P) et mettre éventuellement en évidence son réarrangement (N-P);⁴ l'observation s'étant avérée négative, d'autres approches de ce problème seront envisagées par la suite.

6) *Discussion*. Les résultats que nous venons de présenter conduisent à envisager comme étape déterminante de la réaction, l'attaque de l'atome de phosphore par le réactif nucléophile (Figure 5). Ce mécanisme est cohérent avec les deux observations suivantes:

—la réaction est plus rapide avec **2** qu'avec **7**; ceci est dû à une meilleure stabilisation de la charge négative de l'état de transition par l'oxygène plus électronégatif.

—le fait que le pyrophosphate formé ne soit pas agent phosphorylant alors que les chlorophosphates le sont, indique que l'étape lente ne dépend pas de la nature du groupe partant donc ne peut être postérieur à l'étape 1 (le groupe phosphate étant bien meilleur groupe partant que l'anion chlorure).

TABLEAU II

Avancement de la phosphorylation de **1a** par l'agent phosphorylant **2** en présence d'une base après 20 minutes. Les réactifs employés sont en quantités stoechiométriques.

Concentration. 10 ³ M	Solvant	Base	% Produit <i>N</i> -phosphorylé
2	pyridine	pyridine	25
2	pyridine	NaH	73
2	pyridine	Et ₃ N	100
0,5	THF	pyridine	traces
0,5	THF	Et ₃ N	74

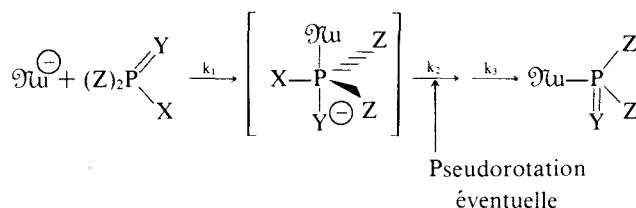


FIGURE 5

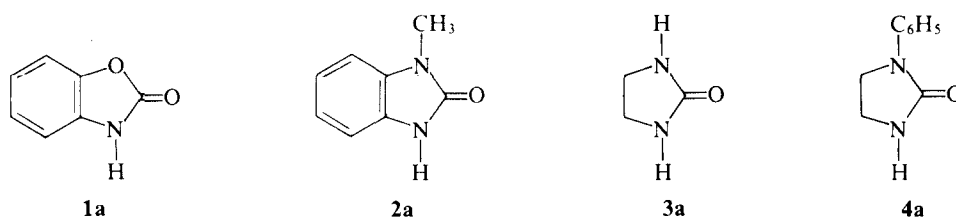
Une conclusion importante de cette étude est que la réactivité d'un agent de phosphorylation serait peu sensible à la stabilité du groupe partant mais très dépendante de la stabilisation de la charge négative de l'état de transition par les substituants de l'atome de phosphore.

B Etude de la phosphorylation de substrats dérivés d'urées et de carbamates.

1) *Choix des substrats.* Nous avons recherché des substrats de structure simple et comportant les mêmes sites réactionnels que la biotine. Ceux-ci sont figurés ci-dessous:

Les substrats **2a**, **3a**, **4a**, **6a** et **7a** sont des urées et des thiourées présentant deux ou trois centres nucléophiles (O et N). Le substrat **8a** (isothiourée) possède un seul site réactif fortement basique et qui peut modéliser une isobiotine (biotine activée). Les substrats **1a** et **5a** sont des (thio)carbamates cycliques porteurs de deux seuls centres réactifs. Le choix des homologues soufrés a été guidé par la littérature. En effet lors d'acylation d'isoimides, il a été montré par Bruice et Hegarty^{25,26} un réarrangement rapide O → N, alors que Pratt et Bruice²⁷ ont montré que le réarrangement S → N des homologues soufrés est fortement ralenti. Par ailleurs, en ce qui concerne les transferts de groupe phosphate, Mikolajczyk *et coll.*²⁸ ont observé en RMN de ³¹P, à -80°C, des intermédiaires de thiophosphorylation de carbodiimides; nous avons donc étendu cette étude à des substrats soufrés.

—Substrats oxygénés



—Substrats soufrés

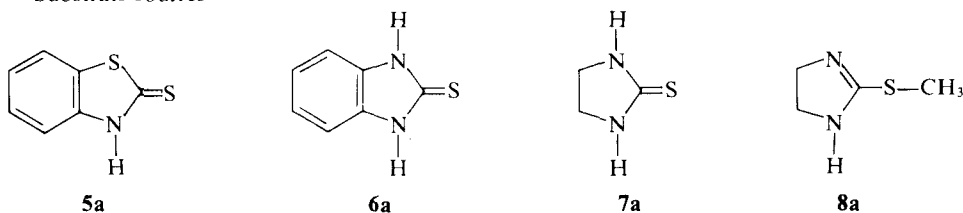


FIGURE 6

2) *Etude comparée de 1a, 5a et 8a.* Le Tableau III présente l'essentiel des résultats obtenus avec les agents phosphorylants 2 et 7.

(a) **1a et 5a.** La plus forte réactivité de **1a** comparée à **5a** reflète bien la différence de nucléophilie entre oxanion et anion soufré, ce qui confirme bien que l'anion du substrat est l'entité réactive. Les réactivités de ces deux substrats se distinguent également par les produits de réaction: avec les réactifs 2 et 7, **1a** conduit exclusivement à un produit *N*-phosphorylé; **5a** forme avec le réactif 2—en plus du produit *N*-phosphorylé, isolé et caractérisé—un produit *S*-phosphorylé détecté en faible quantité; par contre soumis à l'action du réactif 7, ce dernier substrat conduit uniquement au produit *S*-phosphorylé isolé et caractérisé.

(b) *Stabilité du produit S-phosphorylé.* Le produit de *S*-phosphorylation de **5a** par 7 fournit un modèle permettant d'étudier un réarrangement éventuel S → N. Ce dernier n'a pas été observé malgré un chauffage prolongé (reflux dans CH₂Cl₂ pendant une semaine). Cette absence de réarrangement, inattendue, peut être attribuée à plusieurs facteurs:

—la moindre électrophilie de l'atome de phosphore par rapport à l'analogue oxygéné dont seul le produit de *N*-phosphorylation est observé.²⁹

—les plus grandes longueurs de liaison C-S-P par rapport aux liaisons C-O-P,³⁰ facteur qui pourrait être défavorable à un tel réarrangement intramoléculaire.

—la rigidité due au cycle comparée à la flexibilité d'un système ouvert,³⁰ dans lequel un tel réarrangement est observé à basse température.

—enfin la faible basicité de l'atome d'azote du produit de phosphorylation de **5a** par rapport à celui du modèle mentionné ci-dessus puisque relatif à un produit de phosphorylation de carbodiimide, pourrait également rendre compte de la différence de comportement observé.

(c) *Réactivité de la S-méthylisothiourée 8a.* Ce substrat se distingue des deux précédents par sa grande réactivité. Le Tableau III montre qu'avec le chlorothiophosphate 7 le produit de *N*-phosphorylation est rapidement obtenu. Cette même réaction a lieu en absence de base tertiaire dans le milieu, observation allant dans le sens de l'activation par la base des substrats peu réactifs déjà mentionnée.

TABLEAU III

Etude comparative de la phosphorylation des substrats **1a**, **5a** et **8a** par différents réactifs phosphorylants.

substrats		1a		5a		8a				
Agent phosphorylant	temps	% de produit (δ ³¹ P ppm)		temps	% de produit (δ ³¹ P ppm)		temps	% de produit (δ ³¹ P ppm)		
		N-P	O-P		N-P	S-P		N-P	S-P	a)
2	45 mn	60 (-17,3)	0	2 J.	46 (-17,0)	8 (+9,5)	6 mn	0	—	80 (-11,6)
	45 mn	5 (46,2)	0	2 J.	0	38 (75,4)	20 mn	82 (52,4)	—	0
7	2 J.	87 (46,2)	0	.						

Solvant: CH₂Cl₂; base: Et₃N; les réactifs sont en quantités stoechiométriques.

a) le signal à -11,6 ppm correspond au produit d'hydrolyse $(C_6H_5O)_2P(=O)OH$.

TABLEAU IV

Etude comparative de phosphorylation des substrats oxygénés (**1a**, **3a** et **4a**) par le diphénylchlorophosphate **2**.

Substrat	temps (mn.)	% de produit <i>N</i> -phosphorylé ($\delta^{31}\text{P}$ ppm)	% de pyrophosphate ($\delta^{31}\text{P} = -25,7$ ppm)
sans	7	0	39
1a	7	40 (-17,3)	40
3a	4	0	95
4a	6	0	57

Solvant: DMF; base: Et_3N ; les réactifs sont en quantités stoechiométriques.

Par ailleurs, la sensibilité à l'hydrolyse du chlorophosphate **2**, considérablement accrue en présence de **8a** (absence de *N*-phosphorylation) peut être due à la faculté du substrat de se comporter comme un catalyseur basique (prototropie) particulièrement efficace.

3) *Réactivités comparées des substrats oxygénés.* La réaction du diphénylchlorophosphate **2** sur les substrats **1a**, **3a** et **4a** (Tableau IV) conduit à la seule phosphorylation de **1a**. La sélectivité de cette réaction nous a conduit de tenter une phosphorylation avec un agent fortement conjugué par interaction $p_\pi-d_\pi$, donc moins réactif, le dimorpholinochlorophosphate **5**, en milieu fortement basique (NaH). Les résultats du Tableau V montrent un avancement satisfaisant de la réaction mais encore de *N*-phosphorylation, exclusivement. Ces deux tableaux permettent par ailleurs de classer ces substrats oxygénés suivant la séquence:



La plus grande réactivité de **1a** par rapport à **3a** et **4a** peut correspondre, comme il a été précédemment proposé, à une meilleure stabilisation de la charge négative dans l'état de transition par le cycle phényle. La faible réactivité de **2a** va dans le même sens en raison de l'effet donneur du méthyle.

La formation de pyrophosphate, accrue en présence des substrats **3a** et **4a** (Tableau IV), ne peut être expliquée par une catalyse basique analogue à celle proposée

TABLEAU V

Etude comparative de phosphorylation des substrats oxygénés (**1a** à **3a**) par le dimorpholinochlorophosphate **5**.

Substrat	Solvant + base	temps	% de produit <i>N</i> -phosphorylé ($\delta^{31}\text{P}$ ppm)
3a	pyridine + NaH	40 mn	23 (7,7)
2a	pyridine + NaH	40 mn	10 (6,6)
1a	THF + Et_3N + NaH	1 J.	80 (6,1)
2a	THF + Et_3N + NaH	1 J.	1 (6,6)

Les réactifs employés sont en quantités stoechiométriques.

précédemment pour la *S*-méthylisothiourée **8a** (**3a** et **4a** étant très peu basiques), mais par une *O*-phosphorylation préalable suivie d'un transfert rapide du groupe phosphorylé sur l'anion phosphate présent dans le milieu et provenant de l'hydrolyse de l'agent de phosphorylation. Ceci est proposé bien qu'aucune forme *O*-phosphorylée n'ait pu être observée même à basse température.

4) *Réactivités comparées des substrats soufrés 5a, 6a et 7a vis à vis du diphénylthiochlorophosphate 7*. Le Tableau VI indique les produits obtenus avec ces substrats: **5a** donne un produit *S*-phosphorylé comme indiqué précédemment, alors que **7a** conduit avec un faible rendement au produit *N*-phosphorylé. Dans les trois cas, la réaction s'accompagne de la formation du produit secondaire pyrophosphate.

TABLEAU VI

Etude comparative de phosphorylation des substrats soufrés (**5a** à **7a**) par le diphénylchlorothiophosphate **7**

Substrat	temps	% de produit phosphorylé ($\delta^{31}\text{P}$ ppm)		
		S-P	N-P	pyrothiophosphate ($\delta^{31}\text{P} = +46,6$ ppm)
5a	25 mn	33 (75,4)	0	15
6a	1 h.	0	0	36
7a	1 h.	0	10 (54,6)	58

Solvant: DMF; base: Et_3N ; les réactifs sont en quantités stoechiométriques.

Les réactivités relatives de ces trois substrats confirment ce qui a été observé à propos des analogues oxygénés; la réactivité dépend de l'aptitude de ces substrats à stabiliser d'une part leur anion conjugué et d'autre part la charge négative dans l'état de transition.

Un certain nombre de points restent cependant à élucider: l'obtention du produit *S*-phosphorylé avec **5a**, *N*-phosphorylé avec **7a** et la non-réactivité de **6a**.

CONCLUSION

Une série d'agents de phosphorylation et de substrats cycliques (carbamate, thio-carbamate, urée, thiourée et isothiourée) ont été étudiés. Les réactions sont d'autant plus rapides que le caractère électrophile du phosphore est plus marqué et que ses substituants contribuent à la stabilisation de la charge négative lors de la formation de l'état de transition.

En ce qui concerne les produits obtenus, dans le cas des substrats oxygénés, seul le produit *N*-phosphorylé est observé. Le produit cinétique est bien la forme *O*-phosphorylée: cela est confirmé d'une part par la mise en évidence sans ambiguïté de ce premier produit dans le cas des dérivés thio moins réactifs, et d'autre part par le taux de pyrophosphate formé, plus élevé quand ce taux est mesuré en présence de substrat; en effet, cette observation ne peut être interprétée que par l'existence, lorsque le substrat est présent, d'un donneur de groupement phosphate qui ne peut être précisément que la forme *O*-phosphorylée.

Cette réaction de transfert étant défavorisée dans le cas des dérivés thio (dont le phosphore est moins électrophile), rend possible l'isolement et la caractérisation d'une forme *S*-phosphorylée, analogue du modèle *O*-phosphobiotine cherché.

Un certain nombre d'observations expérimentales issues de ce travail, relatives aux propriétés "agent de transfert de phosphate" des substrats oxygénés par rapport à la stabilité des substrats soufrés est à rapprocher au fait que le remplacement de la biotine par la thiobiotine inhibe le processus de carboxylation enzymatique catalysé par ce coenzyme.^{1d}

PARTIE EXPERIMENTALE

Les solvants employés sont préalablement séchés, distillés et conservés à l'abri de toute trace d'humidité. Toutes les opérations sont effectuées sous atmosphère inerte (azote ou argon).

Les points de fusion sont mesurés sur un banc Kofler.

Les spectres IR sont réalisés sur un appareil Beckman IR 20A. Les spectres de RMN ³¹P sont faits sur appareils R 32 (90 MHz) et Bruker 90 MHz à transformée de Fourier. Pour le phosphore: Pulse = 3,5 μ sec.; temps d'acquisition = 0,33 sec.; temps de délai = 1 sec.; les déplacements chimiques sont déterminés par rapport à H₃PO₄ 85% (référence externe) avec signe positif, pour les valeurs se situant à champ faible par rapport à la référence. Les spectres sont découplés avec le proton et lockés sur le deutérium.

Les spectres de RMN ¹H sont réalisés sur le Bruker 90 MHz et les déplacements chimiques sont donnés par rapport au TMS.

Substrats

Le 2-imidazolidone **2a**, le 2-mercaptobenzothiazole **4a**, le 2-thioimidazolidone **5a** et le 2-mercaptobenzimidazole **6a** sont des produits commerciaux (Aldrich) et sont utilisés sans purification supplémentaire.

Les autres substrats benzoxazolone **1a**, *N*-méthylbenzylimidazolidone **3a**, phényl-1 imidazolidinone-2 **4a** et *s*-méthylisothioimidazolidone **8a** sont synthétisés selon des méthodes décrites dans la littérature.³¹⁻³⁴

Réactifs de phosphorylation

L' *O*-phénylène chlorophosphate **1**, le diphenylchlorophosphate **2** et le diéthylchlorophosphate **3** sont des produits commerciaux (Aldrich) et sont utilisés sans purification supplémentaire.

Le di-4 morpholino-chlorophosphoramidate **5** et le tétraéthylchlorophosphoramidate **6** sont préparés par action de 1 mole de l'oxychlorure de phosphore sur 4 moles d'amine (morpholine et diéthylamine respectivement) dans un solvant anhydre (éther ou benzène).³⁵

Le phényl-diéthylaminochlorophosphate **4** est préparé à partir de dichlorophosphoramidate correspondant et le phénol dans le benzène anhydre.³⁶ Le diphenylimidazolylphosphoramidate **7** est synthétisé selon la méthode de Ramirez.^{12c}

Recristallisation dans CH₂Cl₂/pentane: Cristaux blancs (F = 84-86°C). Le diphenylchlorothiophosphate **8**:

La synthèse de ce produit se fait en deux étapes:

- 1) préparation de diphenylchlorophosphite.³⁷
- 2) Synthèse de diphenylchlorothiophosphate.³⁸

Déplacements chimiques mesurés en RMN ³¹P (δ ppm) des agents phosphorylants employés par rapport à H₃PO₄ 85%.³⁹

1 CH₂Cl₂ + 19,7; **2** pyridine - 6,2; **3** pyridine + 2,8; **4** pyridine + 10,4; **5** pyridine + 22,7; **6** pyridine + 26,2; **7** CH₂Cl₂ + 58,9; **8** CH₂Cl₂ - 16,1.

Méthode générale pour suivre les réactions de phosphorylation:

Afin de déterminer la réactivité des différents agents phosphorylants vis à vis des substrats, la réaction de phosphorylation est suivie en RMN ³¹P à température ambiante et à basse température.

Les échantillons sont préparés en ajoutant un équivalent (0,5 - 2 mmoles) du substrat à 1 équivalent (0,5 - 2 mmoles) du réactif phosphorylant dissous dans 1,5 ml de solvant et 1 équivalent d'une base forte.

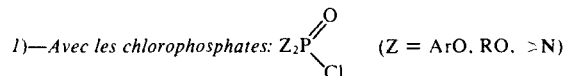
La solution est homogène au départ mais à la fin de la réaction, il y a formation de chlorhydrate qui précipite.

L'avancement de la réaction est mesuré par rapport aux pourcentages relatifs des produits formés, calculés à partir des intégrations des pics caractéristiques par atome de phosphore (reproductibilité = $\pm 3\%$).

Méthode générale de synthèse des produits phosphorylés.

A 0,01 mole de substrat dans 20 ml de dichlorométhane anhydre et 0,01 mole de triéthylamine, on ajoute 0,01 mole de l'agent phosphorylant. Le mélange est agité à température ambiante et l'avancement de la réaction est suivi en RMN ^{31}P .

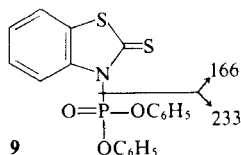
Le mélange est ensuite filtré puis évaporé. Le (les) produit(s) sont purifiés par recristallisation.



A titre d'exemple, on peut citer le cas de la réaction du diphenylchlorophosphate **2** sur le 2-mercaptobenzothiazole **5a**: le mélange réactionnel (quantités stoechiométriques) est agité pendant 24 h. à température ambiante dans dichlorométhane en présence d'un équivalent de triéthylamine. L'avancement de la réaction est suivi en RMN de ^{31}P . Après filtration, le solvant est évaporé et le résidu obtenu est recristallisé dans le pentane: cristaux jaune ($F = 94-96^\circ\text{C}$)

RMN ^{31}P (CDCl_3): $\delta = 17,0$. IR (CH_2Cl_2): $\nu_{\text{C}_6\text{H}_5} = 1585 \text{ cm}^{-1}$. Masse: $\text{M}^+ = 399$; principaux fragments: 326; 308; 243; 233; 166.

Ces données sont en accord avec une structure *N*-phosphorylée:



Cet agent phosphorylant (**2**) conduit avec tous les autres substrats employés-outre les pics du pyrophosphate et du produit d'hydrolyse qui sont identifiés sans ambiguïté à un signal ($\delta = -17,3 \pm 0,2 \text{ ppm}$) attribué au produit de *N*-phosphorylation. Ce déplacement chimique est compatible avec celui de **9** et ceux d'autres produits *N*-phosphorylés de structure similaire tel que le diphenylimidazolyphosphoramidate.

Dans le cas des autres chlorophosphates et chlorophosphoramidates, une comparaison des déplacements chimiques de produits avec ceux de la littérature,⁴⁰ permet d'identifier les produits *N*-phosphorylés obtenus.

2) Avec le diphenylchlorothiophosphate **8**

Substrat 1a (benzoxazalone):

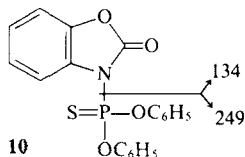
Le mélange réactionnel (quantités stoechiométriques) est agité pendant 2 jours à température ambiante dans le dichlorométhane en présence d'un équivalent de base. L'avancement de la réaction est suivi ainsi que pour tous les autres cas en RMN ^{31}P .

Le solvant est évaporé après filtration, le résidu (huile) est lavé au pentane, puis recristallisé dans CH_2Cl_2 : cristaux blancs ($F = 77-79^\circ\text{C}$).

RMN ^{31}P (CD_2Cl_2): $\delta 46,3$. RMN ^1H (CD_2Cl_2): $\delta 6,9-7,55$ (C_6H_5 , m).

IR (CH_2Cl_2): $\nu_{\text{C=O}} = 1800 \text{ cm}^{-1}$. Masse: $\text{M}^+ = 383$ (100); principaux fragments: 339 (13); 323 (24); 290 (9); 274 (42); 249 (100); 211 (67); 155 (51); 135 (73).

Ces données sont en accord avec la structure *N*-phosphorylée:



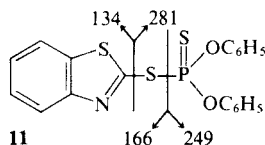
Substrat 5a (2-mercaptobenzothiazole)

Après 5 jours, le mélange réactionnel (conditions analogues à celles employées pour **1a**), est filtré puis évaporé; le résidu visqueux est lavé au pentane.

—le produit d'extraction au pentane est recristallisé dans le dichlorométhane: cristaux blancs ($F = 83-84^{\circ}\text{C}$).

RMN $^{31}\text{P}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)$: δ 75,4. RMN $^1\text{H}(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: δ 7,1–8,2 (C_6H_5 , m). IR(CH_2Cl_2): $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$: 1600 cm^{-1} . Masse: $M^+ = 415$; principaux fragments: 322 (100); 284 (12); 249 (23); 243 (64); 217 (60); 167 (55); 155 (49); 135 (7).

Ces données sont en accord avec la structure S-phosphorylée:

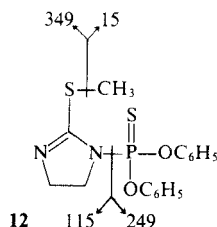


Substrat 8a (S-méthylisothioimidazolidone):

Dans les conditions analogues aux composés précédents, le mélange réactionnel est filtré puis évaporé après 5 h de réaction. La dissolution partielle du résidu obtenu conduit à deux phases liquide et solide.

L'évaporation sous vide de la phase éthérée conduit à une huile visqueuse jaune. RMN $^{31}\text{P}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)$: δ 52,2. RMN $^1\text{H}(\text{CD}_2\text{Cl}_2)$: δ 2,47 (CH_3 , s, 3H); 3,6–4,25 ($-\text{CH}_2-$ du cycle, m, 4H); 6,9–7,6 (C_6H_5 , m, 10 H). IR (lames NaCl): $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ = 1640 cm^{-1} ; $\nu_{\text{C}_6\text{H}_5}$ = 1590 et 1480 cm^{-1} . Masse: $M^+ = 364$ (78); principaux fragments: 349 (58); 331 (84); 317 (84); 294 (51); 273 (58); 271 (84); 255 (63); 249 (38); 225 (100); 217 (96); 155 (50).

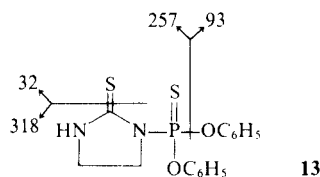
Le produit phosphorylé formé est bien de structure N-phosphorylée:



Substrat 7a (2-thioimidazolidone)

Le solvant employé dans ce cas est le DMF. Le mélange réactionnel (conditions identiques à celles déjà décrites) est filtré après deux jours. L'évaporation du solvant conduit à un résidu visqueux, difficile à purifier. Les données spectroscopiques de ce mélange, surtout les spectre de RMN ^{31}P et le spectre de masse, comparées à celles d'un échantillon pur de pyrothiophosphate, nous ont permis d'identifier les constituants et leurs pourcentages.

RMN ^{31}P (acétone): δ 46,6 (80%, pyrothiophosphate); 54,6 (20%, produit N-phosphorylé). Masse: $M^+ = 514$ (pyrothiophosphate); principaux fragments: 405; 267; 167. $M^+ = 350$ (produit N-phosphorylé); principaux fragments: 318; 257; 241; 130.



REFERENCES

- (a) H. G. Wood, R. E. Barden, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 385 (1977); (b) J. Reteý, F. Lynen, *Biochem. Z.*, **342**, 256 (1965); (c) A. F. Hegarty, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6561 (1970); (d) S. E. Polakis, R. B. Guchhait, E. E. Zwergel, M. D. Lane, T. G. Cooper, *J. Biol. Chem.*, **249**, 6657 (1974); C. M. Visser, R. M. Kellogg, *Biorg. Chem.*, **6**, 79 (1977).
- R. Kluger, P. D. Adawadkar, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3741 (1976).
- (a) V. S. Reznik, Yu. S. Shvetsov, V. S. Bakulin, I. Sh. Salikhov, *Bull. Acad. Sci. USSR, Ser. Chem.*, **24**, 6, 1290 (1975); (b) V. S. Reznik, V. S. Bakulin, Yu. S. Shvetsov, B. E. Ivanov, *Bull. Acad. Sci. USSR, Ser. Chem.*, **24**, 6, 1294 (1975).

4. R. Y. Ning, R. I. Fnyer, P. B. Madan, B. C. Sluboski, *J. Org. Chem.*, **41**, 2720 (1976).
5. E. Guibé-Jampel, M. Wakselman, *J. C. S., Chem. Comm.*, 720 (1969).
6. J. I. C. Cadogan, D. S. B. Grace, *J. Chem. Res. (M)*, 701 (1978).
7. (a) G. I. Derkach, A. V. Narbut, A. V. Kirsanov, *Zh. Obshch. Khim.*, **33**, 5, 1584 (1963); (b) R. A. Wiesboeck, *J. Org. Chem.*, **30**, 3161 (1965); (c) Yu. G. Gololobov, L. I. Kruglik, *Zh. Org. Khim.*, **14**, 10, 2225 (1978); (d) L. M. Myl'Nikova, Ya. A. Mandel'Baum, R. S. Soifer, *J. Gen. Chem.*, 237 (1979); (e) G. L. Matevosyan, R. M. Matyushicheva, S. P. Rudnik, P. M. Zavlin, *Zh. Obshch. Khim.*, **50**, 1, 64 (1980).
8. (a) R. E. Ireland, G. Pfister, *Tetrahedron Lett.*, 2145 (1969); (b) A. I. Ginak, K. A. V. 'Yunov, E. G. Sochilin, *J. Gen. Chem.*, **40**, 1410 (1970); (c) E. E. Nifant'ev, A. P. Tuseev, A. I. Val'dman, L. V. Voronina, P. A. Morozov, *Zh. Obshch. Khim.*, **48**, 1473 (1978).
9. R. Greenhalgh, R. M. Heggie, M. A. Weinberger, *Canad. J. Chem.*, **48**, 1351 (1970).
10. V. M. Clark, D. W. Hutchinson, *Prog. Org. Chem.*, **7**, 75 (1968).
11. T. A. Khwaja, C. B. Reese, *Tetrahedron*, **27**, 6189 (1971).
12. (a) F. H. Westheimer, *Accounts Chem. Res.*, **1**, 70 (1968); (b) F. Ramirez, J. F. Marecek, *Accounts Chem. Res.*, **11**, 239 (1978); (c) F. Ramirez, H. Okazaki, J. F. Marecek, H. Tsuboi, *Synthesis*, 819 (1976).
13. (a) J. Smrt, *Tetrahedron Lett.*, 4727 (1973); (b) M. J. Nemer, K. K. Ogilvie, *Tetrahedron Lett.*, 4153 (1980).
14. (a) H. A. C. Montgomery, J. H. Turnbull, J. C. S., 1963 (1958); (b) T. Koizumi, Y. Arai, E. Yoshii, *Tetrahedron Lett.*, 4763 (1973); (c) A. Kraszewski, J. Stawinski, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 2935 (1980).
15. (a) C. M. Hsu, B. S. Cooperman, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5657 (1976); (b) E. Jampel, M. Wakselman, M. Vilkas, *Tetrahedron Lett.*, 3533 (1968); (c) M. Regitz, G. Weise, U. Felcht, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1232 (1980).
16. (a) F. Cramer, H. Shaller, H. A. Staab, *Chem. Ber.*, **94**, 1612 (1961); (b) H. Schaller, H. A. Staab, F. Cramer, *Chem. Ber.*, 1621 (1961); (c) F. Cramer, H. Schaller, *Chem. Ber.*, 1634 (1961).
17. (a) R. J. Cremlyn, G. W. Kenner, A. Todd, *J.C.S.*, 4511 (1960); (b) E. M. Bellet, T. R. Fukuto, *J. Agr. Food Chem.*, **20**, 931 (1972).
18. D. A. Usher, D. I. Richardson, Jun., F. Eckstein, *Nature*, **228**, 663 (1970).
19. T. Glonek, J. R. Van Wazer, T. C. Myers, *Phosphorus and Sulfur*, **3**, 137 (1977).
20. (a) R. J. W. Cremlyn, B. B. Dewhurst, D. H. Wakeford, *J. C. S. (C)*, 300 (1971); (b) F. Ramirez, J. F. Marecek, K. Cheng, *Phosphorus and Sulfur*, **4**, 43 (1978); (c) J. A. Stock, *J. Org. Chem.*, **44**, 3997 (1979).
21. (a) H. G. Wood, *Fed. Proc.*, **36**, 2197 (1977); (b) J. Stubbe, J. W. Kozarich, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2505 (1980).
22. G. Weimann, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4329 (1962).
23. L. A. Slottin, *Synthesis*, 737 (1977).
24. N. G. Gaylord, D. J. Kay, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2167 (1956).
25. A. F. Hegarty, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6568 (1970).
26. (a) A. F. Hegarty, M. T. McGormack, G. Ferguson, P. J. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 2015 (1977); (b) K. Brady, A. F. Hegarty, *J.C.S., Perkin II*, 121, (1980).
27. R. F. Pratt, T. C. Bruice, *Biochem.*, **10**, 3178 (1971).
28. M. Mikołajczyk, P. Kiebasinski, Z. Goszczynska, *J. Org. Chem.*, **42**, 3629 (1977).
29. (a) V. E. Bel'skii, M. V. Efremova, Z. V. Lustina, *Bull. Acad. Sci. USSR*, 1195 (1967); (b) V. E. Bel'skii, N. N. Bezzubova, Z. V. Lustina, V. N. Eliseenkov, A. N. Pudovik, *Bull. Acad. Sci. USSR*, 167 (1969); (c) J. Michalski, W. Reimschuessel, R. Kaminski, *Russ. Chem. Rev.*, **47**, 814 (1978).
30. C. Blonski, M. B. Gasc, A. Klaebe, J. J. Périé, R. Roques, J. P. Declercq, G. Germain, *J.C.S., Perkin II* (sous presse).
31. (a) M. R. Marre, thèse de 3^e cycle, Toulouse, n° 1794 (1975); (b) T. H. Kinstle, L. J. Darlage, *J. Heterocyclic Chem.*, **6**, 123 (1969).
32. A. Hunger, J. Kebrle, A. Rossi, K. Hoffmann, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1273 (1961).
33. H. Najer, R. Giudicelli, J. Menin, C. Morel, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 323 (1963).
34. G. Assef, J. Kister, J. Metzger, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 3-4, II-165 (1979).
35. A. H. Cowley, R. P. Pinnel, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4454 (1965).
36. M. E. Wolff, A. Burger, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1970 (1957).
37. J. P. Forsman, D. Lipkin, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 3145 (1953).
38. R. Anschütz, W. O. Emery, **253**, 105 (1889).
39. (a) G. M. Kosolapoff, L. Maier, *Organic Phosphorus Compounds*, **6**, Chap. 15 et 16, J. Wiley, New York, N.Y. (1973); (b) G. M. Kosolapoff, L. Maier, *Organic Phosphorus Compounds*, **7**, Chap. 19 (1976) et les références citées.
40. (a) M. L. Nielsen, J. V. Pustinger, Jr., J. Strobel, *J. Chem. Eng. Data*, **9**, 2, 167 (1964); (b) M. L. Nielsen, J. V. Pustinger, Jr., *J. Phys. Chem.*, **68**, 152 (1964).