

ORSAY

n° d'ordre 1785

353

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

T H E S E

présentée
Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

PAR

Pascale JAUDON-GRUBER

SUJET : SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ DE STÉRÉOÏDES AYANT DES PROPRIÉTÉS
 DE CATALYSEURS BIFONCTIONNELS

soutenue le 3 Février 1977 devant la Commission d'Examen

M. J. JULLIEN Président
M. M. FETIZON
M. M. GOLFIER
M. J.P. HENRY
Mme M. LALOI-DIARD
M. P. MOURGUES

ORSAY

n° d'ordre

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

T H E S E

présentée

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

PAR

Pascale JAUDON-GRUBER

ST4/4148

SUJET : SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ DE STÉROÏDES AYANT DES PROPRIÉTÉS
 DE CATALYSEURS BIFONCTIONNELS

soutenue le 3 Février 1977 devant la Commission d'Examen

| | | |
|---------|-------------|-----------|
| M. J. | JULLIEN | Président |
| M. M. | FETIZON | |
| M. M. | GOLFIER | |
| M. J.P. | HENRY | |
| Mme M. | LALOI-DIARD | |
| M. P. | MOURGUES | |

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Stéréochimie de l'Université de Paris XI à Orsay puis au Laboratoire de Synthèse Organique de l'Ecole Polytechnique à Palaiseau, sous la direction de Monsieur le Professeur M. FETIZON.

Qu'il me soit permis de lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie avec tant de bienveillance dans son Laboratoire et pour m'avoir témoigné sa confiance pendant la réalisation de ce travail tout en m'apportant un soutien scientifique et moral constant.

Que Messieurs les Professeurs J. JULLIEN et M. GOLFIER et Monsieur J.P. HENRY, Maître de Recherche au CNRS, veuillent bien trouver ici l'expression de mes remerciements pour avoir bien voulu s'intéresser à ce mémoire et avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Madame LALOI-DIARD, Maître de Recherche au CNRS, de m'avoir aidé à mener à bien mes premières expériences dans le domaine de la cinétique.

Je remercie Monsieur P. MOURGUES, Maître de Conférences à l'Ecole Polytechnique, pour sa participation à la rédaction de ce mémoire, il n'a jamais manqué de m'aider à résoudre les problèmes qui se posaient à moi.

Je tiens à remercier de tout coeur Y. HENRY, G. BOUCHOUX et G. SOZZI pour m'avoir amicalement soutenue tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie bien vivement Madame Ch. GRANDMONTAGNE pour m'avoir dactylographié ce manuscrit avec tant de compétence et de gentillesse.

Que tous ceux qui ont participé à la vie de ce Laboratoire trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance pour la gentillesse et l'aide qu'ils ont su me témoigner.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--------------------|---|
| INTRODUCTION | 9 |
|--------------------|---|

CHAPITRE I

| | |
|--|----|
| PREPARATION DE D-HOMO AMINOSTEROÏDES | 17 |
| I - PREPARATION DE CETO-17 D-HOMOANDROSTANES | 18 |
| II - PREPARATION DE L'AMINE AXIALE EN 17 β | 26 |
| III - DEPLACEMENTS CHIMIQUES EN RMN DES METHYLES 18,19 ET 20 | 29 |
| IV - SPECTRES DE RMN CARBONE-13 | 31 |
| V - PREPARATION DE L'AMINO-17 β HYDROXY-3 β ANDROSTENE-5 ... | 31 |

CHAPITRE II

| | |
|---|----|
| FIXATION DE DEUX CHAÎNES TERMINEES PAR UN HYDROXYLE ET UN IMIDAZOLE SUR DES AMINO-STEROÏDES | 34 |
| I - SCHEMA DE LA SYNTHÈSE | 36 |
| II - CHAÎNE EN 17 β : PREPARATION DE L'ACIDE HYDROXY-7 HEP- TANOÏQUE | 38 |
| III - ETUDE DU BRANCHEMENT DE LA CHAÎNE EN 17 β | 39 |
| IV - BRANCHEMENT DE LA CHAÎNE EN POSITION 6 β | 41 |
| V - OBTENTION DES PRODUITS <u>1</u> ET <u>2</u> | 42 |
| VI - CONFIRMATION DES STRUCTURES PAR LES CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DES PRODUITS SYNTHETISES | 42 |

CHAPITRE III

| | |
|--|----|
| ACTION CATALYTIQUE DES COMPOSES SYNTHETISES : HYDROLYSE D'ESTERS PHENOLIQUES | 46 |
| MECANISME D'ACTION DE L' α -CHYMOTRIPSINE | 49 |
| ETUDE DE LA VITESSE DES REACTIONS | 52 |
| I - CINETIQUES DE L'HYDROLYSE DE L'ACETATE DE PARANITROPHE- NYLE EN PRESENCE DE QUANTITES CATALYTIQUES DES MODELES CHIMIQUES <u>A</u> , <u>B</u> ET <u>C</u> | 55 |
| A-Méthode des vitesses initiales | 55 |
| B-Essai de mise en évidence du complexe stéroïde - substrat | 57 |
| C-Calcul des constantes de vitesse | 59 |
| D-Conclusion | 62 |
| II - CINETIQUE DE L'HYDROLYSE D'ESTERS PHENOLIQUES EN PRE- SENCE D'UN EXCES DE CATALYSEUR | 63 |
| A-Hydrolyse catalysée par <u>A</u> d'esters phénoliques à longue chaîne | 65 |
| B-Hydrolyse de l'acétate de paranitrophényle en pré- sence des catalyseurs <u>A</u> , <u>B</u> et <u>C</u> | 68 |
| CONCLUSION | 73 |

CHAPITRE IV

| | |
|--|----|
| SYNTHESE DE DIAMINO-STEROÏDES ; ESSAI DE MISE EN EVIDENCE D'UNE CATALYSE BIFONCTIONNELLE PAR CES PRODUITS | 75 |
| I - SYNTHESE DES PRODUITS | 77 |
| A-Synthèse du diamino-6 β ,17 β acétoxy-3 β D-homoan- drostane | 77 |
| B-Synthèse de l'amino-6 β conanine | 82 |
| II - DEUTERIATION DE L'ACIDE FUMARIQUE EN PRESENCE DE CATA- LYSEUR BIFONCTIONNEL | 84 |

PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|---------------------|-----|
| CHAPITRE I | 91 |
| CHAPITRE II | 109 |
| CHAPITRE III | 122 |
| CHAPITRE IV | 132 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 147 |

INTRODUCTION

La catalyse polyfonctionnelle est un des traits caractéristiques de certaines réactions enzymatiques. Ce mécanisme d'action n'est pas fondamentalement différent de celui de certaines réactions chimiques classiques "assistées", bien que dans ce cas la bifonctionnalité intervienne généralement par la participation de groupes voisins portés par le substrat lui-même ⁽¹⁾.

Pour citer un exemple pris dans le cadre de notre étude, cette assistance de groupes voisins a notamment été mise en évidence dans le cas de la participation intramoléculaire d'un imidazole à l'hydrolyse d'esters et d'amides ⁽²⁾⁽³⁾. Cette réaction est particulièrement intéressante car le groupe imidazole de l'histidine participe à la catalyse par des estérases et des protéases ⁽⁴⁾.

Pour rendre compte de cet aspect des réactions enzymatiques, il est intéressant de synthétiser des modèles simples, que nous appellerons "modèles chimiques", dans lesquels des aspects essentiels de la structure et des propriétés d'un système enzymatique sont imités.

CATALYSE ENZYMATIQUE ET MODELE CHIMIQUE

Les deux propriétés fondamentales des enzymes sont leur efficacité et leur spécificité. Les modèles chimiques sont utilisés pour expliquer ces deux propriétés et pour les reproduire dans des cas éventuellement plus simples. De plus, cette recherche conduit parfois à la

mise en évidence de réactions intéressantes ayant des applications en synthèse et non connues dans le domaine enzymatique ⁽⁵⁾⁽⁶⁾.

A priori il n'est pas aisé de comparer l'efficacité de l'enzyme et celle du "modèle chimique", les multiples éléments impliqués dans l'acte catalytique de la réaction enzymatique n'étant pas tous reproduits dans la réaction modèle. Mais ces modèles sont une aide pour mettre en évidence les sites actifs des enzymes, élucider les mécanismes d'action (ou du moins vérifier des hypothèses sur ces mécanismes), et en même temps rendre compte de certains aspects structuraux des sites actifs de ces enzymes. A ce point de vue, le modèle idéal (encore jamais atteint) devrait avoir une efficacité proche de celle du processus enzymatique, tout en étant suffisamment simple pour permettre une analyse détaillée ⁽⁷⁾.

L'intérêt de rechercher un modèle chimique est décuplé si ce modèle reproduit aussi la spécificité, qui est de loin la propriété la plus intéressante de ces réactions, tant du point de vue enzymatique que du point de vue chimique.

La spécificité comme l'efficacité sont essentiellement dues aux interactions multiples et efficaces entre le substrat et le site actif de l'enzyme ⁽⁸⁾, c'est-à-dire à la formation du complexe enzyme-substrat. Dans ce complexe, seuls certains atomes du substrat sont accessibles à l'attaque par les groupes catalytiques et par un réactif extérieur ⁽⁹⁾. Alors qu'à l'opposé, les réactions organiques sont généralement des attaques par des réactifs simples sur les positions du substrat qui sont a priori réactives, sans grande sélectivité pour des groupes d'environnement similaire.

Ainsi, les modèles chimiques prétendant réaliser des réactions sélectives ont cherché à imposer des orientations préférentielles relatives entre le catalyseur et le substrat, de manière à favoriser certaines positions déjà potentiellement réactives. Il faut de plus que dans cette orientation relative, le site actif du catalyseur et le site réactif du substrat soient rapprochés.

La disposition privilégiée du substrat par rapport au catalyseur lors du rapprochement des deux molécules peut être obtenue de ma-

nières très diverses. La façon la plus simple concerne des réactions intramoléculaires où les sites actifs et réactifs sont portés par la même molécule. Les exemples pour de telles réactions sont nombreux (1)(2). Mais un rapprochement intermoléculaire est aussi possible lorsqu'il existe entre les molécules des forces électrostatiques, des forces de dispersion de LONDON, des interactions dipolaires, des liaisons hydrogène ou des liaisons hydrophobes (10).

BUT DE NOTRE TRAVAIL

Notre travail dans cette recherche de "modèles chimiques" s'est porté sur un exemple typique de catalyse multifonctionnelle : celui de la chymotrypsine.

Cette enzyme hydrolyse spécifiquement la liaison peptidique ou ester dans laquelle est engagé le carboxyle des acides aminés aromatiques (11).

La partie catalytique de son site actif est composée d'un ensemble de trois groupes fonctionnels (carbonyle, imidazole, hydroxyle) fixés dans une géométrie bien définie : le carboxyle de l'acide aspartique (Asp-102) est à une distance de liaison hydrogène de l'imi-

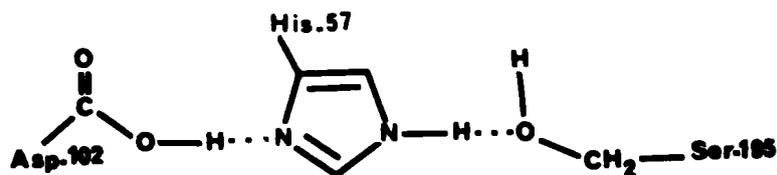


Figure 1

dazole de l'histidine (His-57) , qui est lui-même à une distance de liaison hydrogène de l'hydroxyle de la sérine (Ser-195) ⁽¹²⁾ (figure 1).

Lorsque ce travail a été entrepris, le rôle exact de l'aspartate-102 n'était pas encore totalement mis en évidence. Le caractère bifonctionnel hydroxyle-imidazole était connu sans toutefois que l'on soit assuré du rôle exact relatif de ces deux groupes. On savait que l'hydroxyle était acétylé et que une ou deux histidines participaient à la fois à l'étape d'acétylation et à celle de desacétylation. Mais le mode exact d'assistance n'était pas connu ⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾.

Beaucoup d'études ont déjà été effectuées sur des réactions dans lesquelles intervient la participation de groupes hydroxyles et (ou) imidazoles au cours de l'hydrolyse d'esters ou d'amides ⁽¹⁰⁾⁽¹⁵⁾. Ces études font appel :

- soit à des catalyses intermoléculaires avec intervention d'une ^(16 - 18) ou de plusieurs ⁽¹⁹⁾ fonctions catalytiques ;
- soit à des catalyses intramoléculaires avec intervention d'une ⁽²⁾ ou de plusieurs ^(20 - 22) fonctions catalytiques ;
- soit à des catalyses intramoléculaires avec participation d'un groupe extérieur à la molécule ⁽²³⁾.

Le modèle que nous avons choisi de synthétiser correspond à un modèle de catalyse intermoléculaire avec intervention de deux fonctions catalytiques (imidazole et hydroxyle) : ces fonctions catalytiques sont portées par une même molécule tandis que le substrat est externe.

DESCRIPTION DU MODELE BIOMIMETIQUE ETUDIE

Notre modèle tente donc de reproduire une partie du site actif de la chymotrypsine. Ainsi, nous avons envisagé de "planter" sur un substrat inerte, en l'occurrence un stéroïde, deux chaînes terminées l'une par un noyau imidazole, l'autre par un groupe alcool primaire. La grande flexibilité des deux chaînes carbonées (figure 2) est loin de ressembler à la grande rigidité de l' α -chymotrypsine, mais, dans ce modèle, les groupes actifs (imidazole et alcool primaire) peuvent s'approcher suffisamment l'un de l'autre pour permettre la formation d'une liaison hydrogène et interagir.

Un des avantages du choix d'un stéroïde comme support est d'avoir une géométrie parfaitement définie et connue. Le squelette stéroïde constitue de plus un site hydrophobe qui devrait favoriser des interactions spécifiques entre ces modèles chimiques de catalyseur et leurs substrats.

Nous avons synthétisé les deux modèles 1 et 2 représentés sur la figure 2 dans lesquels les deux chaînes sont plantées sur deux squelettes stéroïdes différents.

La synthèse du produit 1 sert de modèle à celle de 2 dont la préparation est plus difficile.

L'orientation différente des chaînes qui ne sont diaxiales (donc parallèles) que dans le produit 2 peut a priori induire des activités différentes. L'interaction entre l'alcool et l'imidazole du produit 2 étant plus probable, la catalyse par ce produit devrait être plus efficace.

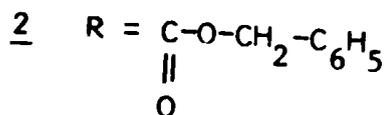
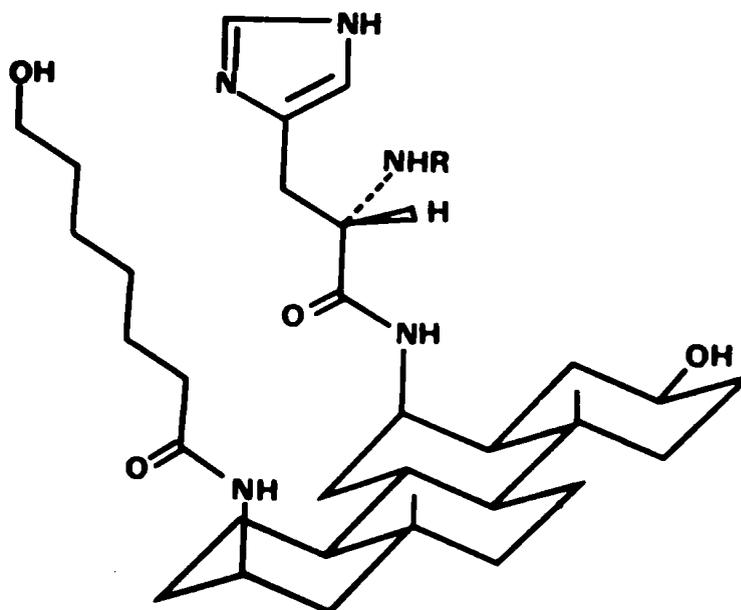
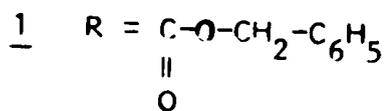
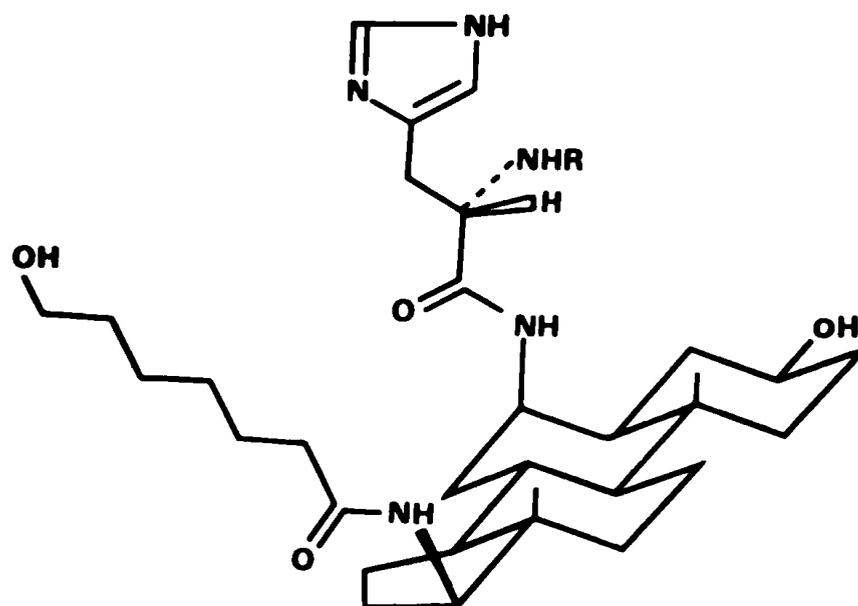
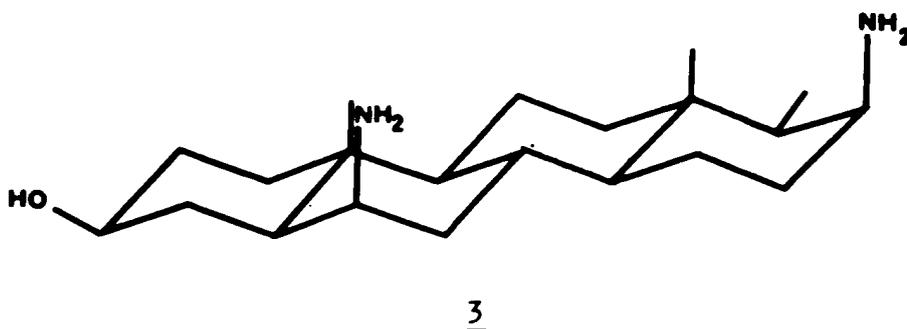


Figure 2

Parallèlement à notre étude sur ce modèle chimique de catalyse enzymatique, nous avons tenté d'utiliser le diamino-stéroïde 3, servant de support au modèle 2 précédemment décrit, comme catalyseur bifonctionnel.

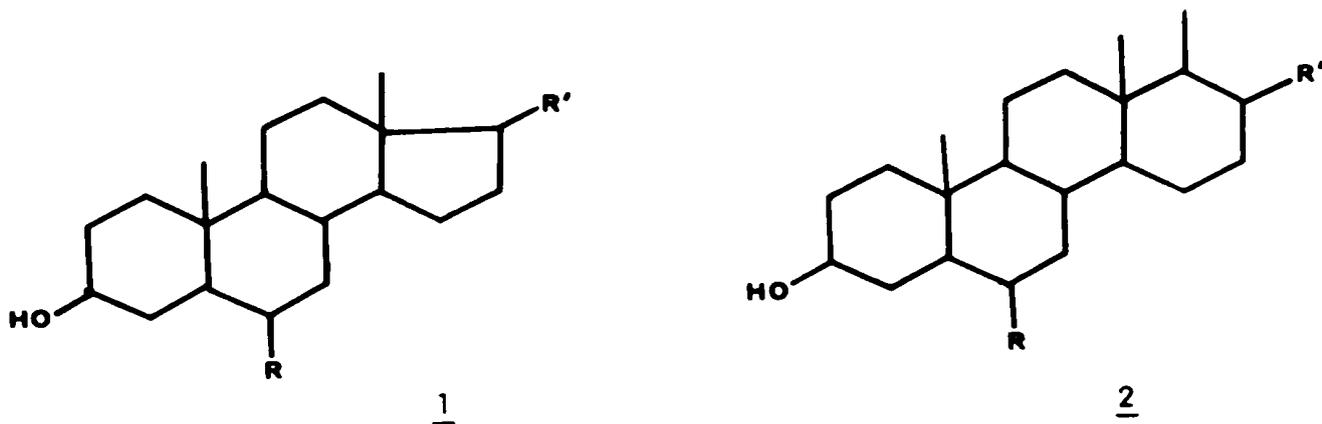


Ce squelette stéroïde constitue un élément d'asymétrie capable de former avec une autre molécule un complexe chiral à géométrie définie. Cette propriété, qui est la clé de la spécificité des réactions enzymatiques, a été utilisée dans ce travail pour réaliser des deutériations stéréospécifiques sur des molécules prochirales. Ces réactions devraient conduire à des composés très utiles dans la détermination des "processus biologiques". Nos expériences ont porté sur la deutériation d'acide fumarique en acide succinique dideutéié.

CHAPITRE I

PREPARATION DE D-HOMO AMINOSTEROÏDES

La synthèse des composés 1 et 2, présentés dans l'introduction page 13, nécessite tout d'abord l'élaboration du squelette stéroïde devant servir de support à ces produits.

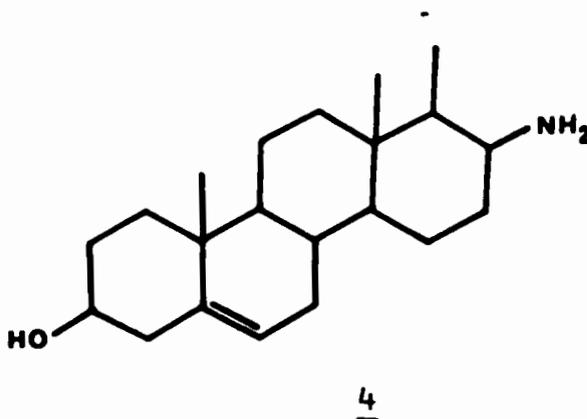


Des groupements amines ont été introduits sur le stéroïde afin de fixer les chaînes carbonées R et R' par l'intermédiaire d'une liaison amide. Le choix a été dicté par la facilité de création d'une telle liaison et par sa solidité, une fonction amide étant susceptible de résister aux conditions des réactions nécessaires à la synthèse des modèles souhaités. De plus, l'hydrolyse de cette amide est peu probable dans les conditions de l'expérience catalytique.

D'autre part, nous avons choisi de faire porter par le stéroïde les fonctions amines nécessaires, celles-ci étant plus faciles à obtenir que les acides carboxyliques stéroïdiques correspondants.

La synthèse de l'amine axiale en position 6β a déjà été décrite ⁽²⁴⁾, ainsi que l'amine en 17β en série androstane servant de support au modèle 1 ⁽²⁵⁾. On se contentera de rappeler brièvement ces synthèses en fin de chapitre.

Nous décrivons donc ci-dessous la synthèse détaillée de l'amino- 17β hydroxy- 3β méthyl- $17\alpha\beta$ D-homoandrostène-5 4, ce qui constitue l'objet essentiel de ce premier chapitre.



I - PREPARATION DE CETO-17 D-HOMOANDROSTANES

Afin d'obtenir l'amino- 17β D-homostéroïde 4 par réduction de l'oxime, nous avons synthétisé la cétone correspondante.

Dans ce but, nous avons tout d'abord reproduit une méthode classique pour obtenir les céto-17 D-homostéroïdes, c'est le réarrangement acyloïne ⁽²⁶⁾ des hydroxy-17 pregnénolones. Le rendement global peu élevé et la longueur de cette synthèse nous ont conduit à envisager une autre voie d'accès, faisant appel à un réarrangement de BAMFORD-STEVENSON de tosylhydrazones d'hydroxy- 17α pregnanolones.

Ce sont ces deux méthodes que nous décrivons successivement ci-

dessous.

A - REARRANGEMENT ACYLOÏNE

La D-homoannélation des stéroïdes peut être obtenue par réarrangement d'hydroxy-17 céto-20 pregnanes ; elle a été étudiée par de nombreux auteurs ⁽²⁷⁾ et reprise dans le laboratoire ⁽²⁴⁾. La méthode d'obtention du céto-17 D-homoandrostène-5 10 comporte les étapes suivantes (figure 3).

L'acétylure de potassium réagit sur l'androsténolone 5 pour former l'éthynyl-17 α dihydroxy-3 β ,17 β androstène-5 6a ⁽²⁸⁾. L'hydratation de la triple liaison de son dérivé diacétylé 6b conduit au produit 7, soit par action de l'oxyde mercurique en présence de trifluorure de bore et d'acide acétique, soit en présence d'une résine échangeuse d'ions sur laquelle des ions mercuriques ont été fixés. La transposition conduisant au dihydroxy-3 β ,17 α méthyl-17 $\alpha\beta$ céto-17 D-homoandrostène-5 8 se fait par chauffage à reflux d'une solution du composé 7 dans la potasse méthanolique jusqu'à disparition complète du produit de départ (un chauffage prolongé provoque l'apparition de l'épimère en 17a). Après acétylation, l'alcool axial en position 17 $\alpha\alpha$ du produit 9 est réduit par le zinc dans l'acide acétique à reflux, ce qui conduit à la cétone 10.

Toutefois, la reproduction de cette dernière manipulation dans les conditions de la littérature ⁽²⁹⁾ ne conduit pas au rendement attendu en cétone. Il y a formation d'un autre produit, le diacétoxy-3 β ,16 β céto-17 méthyl-17 $\alpha\beta$ D-homoandrostène-5 11. Ce produit est présent en quantité moindre dans la réaction si on diminue la durée du reflux, le rendement en cétone 10 étant alors plus important que précédemment mais toujours inférieur à celui de la littérature (voir partie expérimentale page 94).

La structure du produit 11, dont la formation reste inexpliquée, a été établie d'après les données de l'analyse élémentaire et l'analyse des spectres IR, de RMN et de masse.

La présence du groupement acétate secondaire supplémentaire par rapport à l'acétate en 3 a été suggérée par les données de la RMN du carbone 13 (2 $\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \text{O}$ à 170,50 et 170,11 ppm et 2 $\text{CH} - \text{OAc}$ à 76,12 et 73,72 ppm)

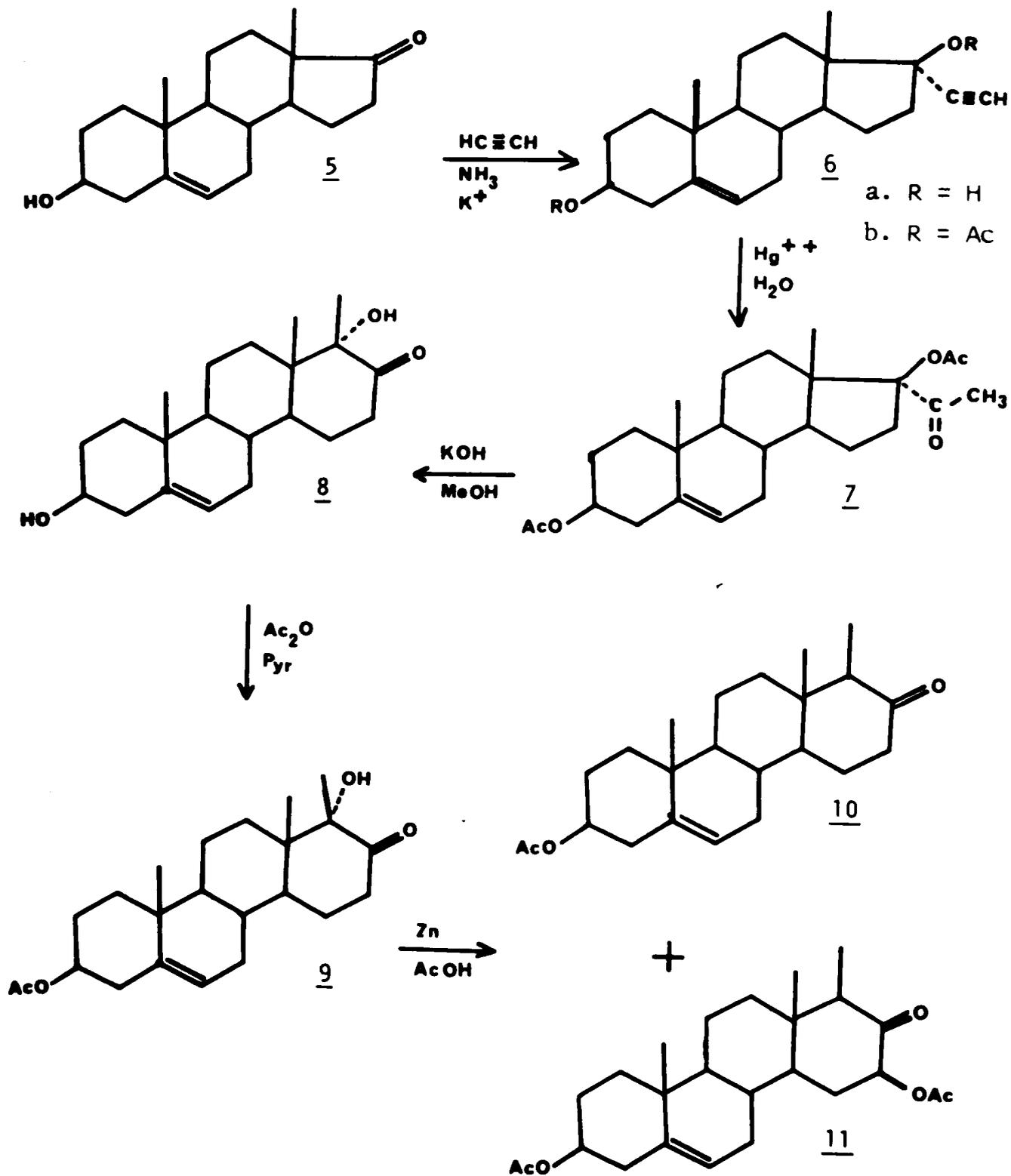


Figure 3

Le spectre IR présente une bande à 1752 cm^{-1} caractéristique d'un acétate en α d'un carbonyle. Le spectre de masse ne possède pas de pic correspondant à l'ion moléculaire, mais des pics à $m/e = M-60$ et $m/e = M-60-60$ correspondant respectivement aux ions résultant de la perte successive de deux molécules d'acide acétique (présence de deux acétates sur la molécule). La masse moléculaire a été déterminée sur un spectre de masse effectué par ionisation chimique.

L'étude, sur le spectre de RMN ^1H (à 276 MHz), du signal apparaissant à 5,15 ppm (H-16) permet de déterminer la configuration du carbone 16. Ce signal se présente sous la forme d'un triplet élargi ($J \approx 9\text{ Hz}$) (figure 4). Cette valeur de la constante de couplage (supérieure à 5,5 Hz) permet d'affirmer que le proton H - 16 se trouve en dehors de l'angle théorique de 120° formé par les deux protons en 15 ⁽³⁰⁾ (figure 4). Une telle position relative des trois protons est possible soit lorsque l'acétate est 16β équatorial, soit lorsqu'il est 16α et que le cycle D est dans une conformation bateau. Cette dernière hypothèse est exclue par le

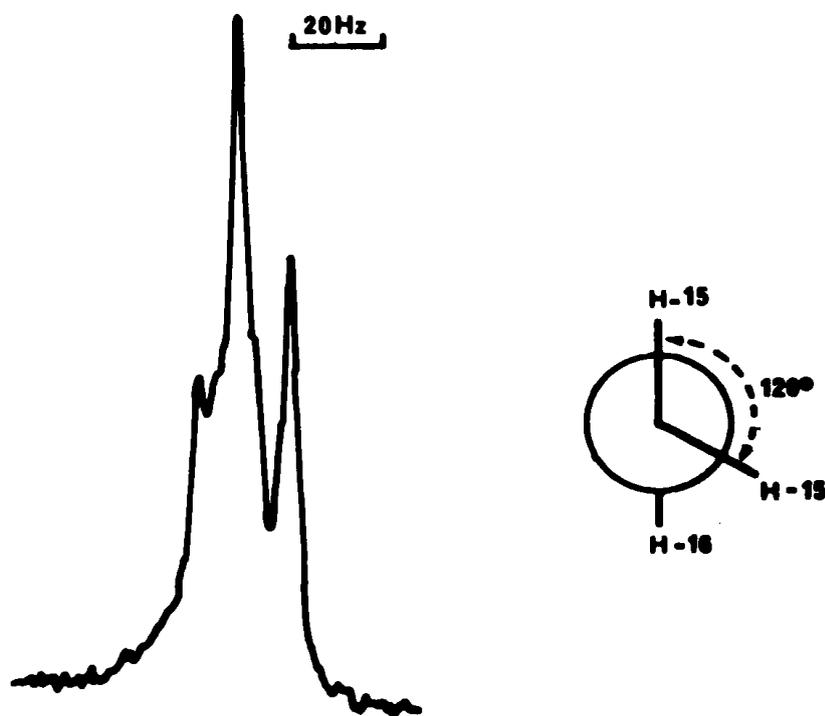
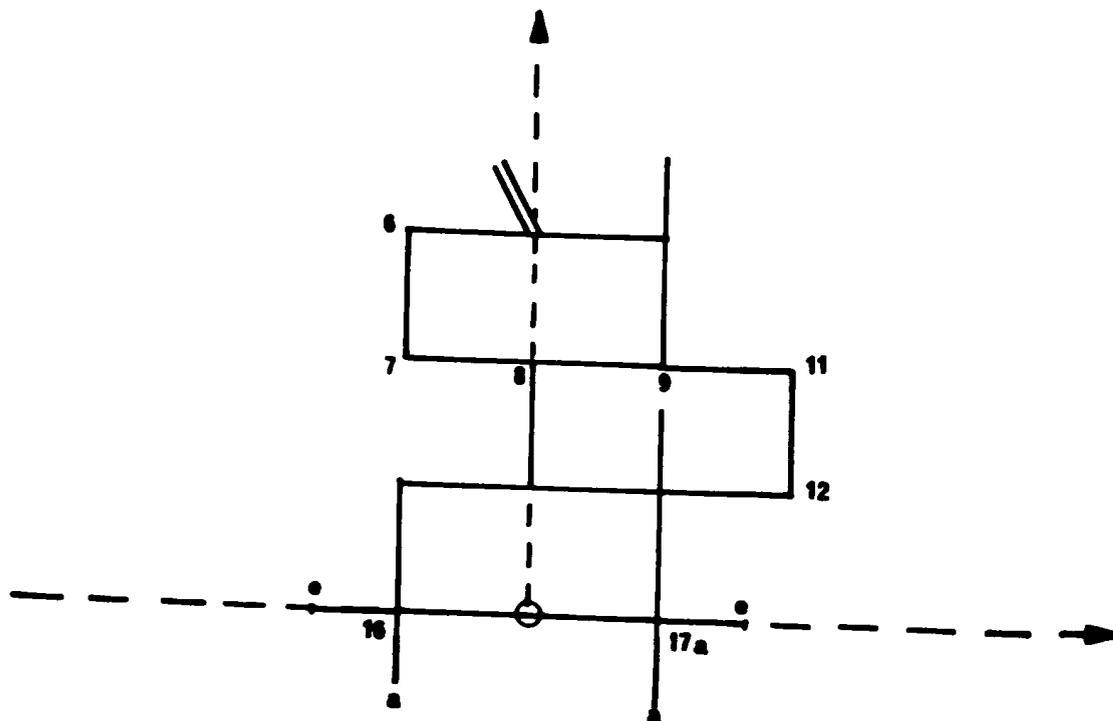
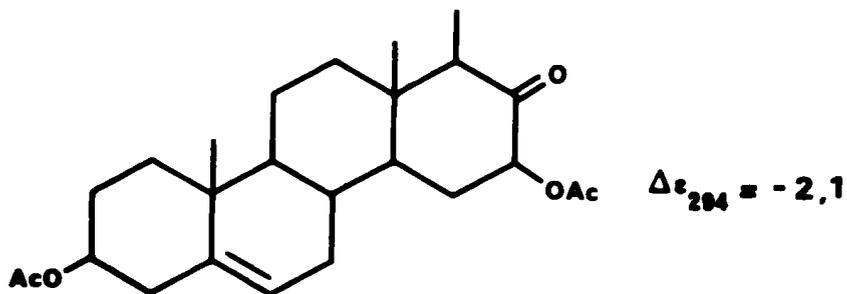
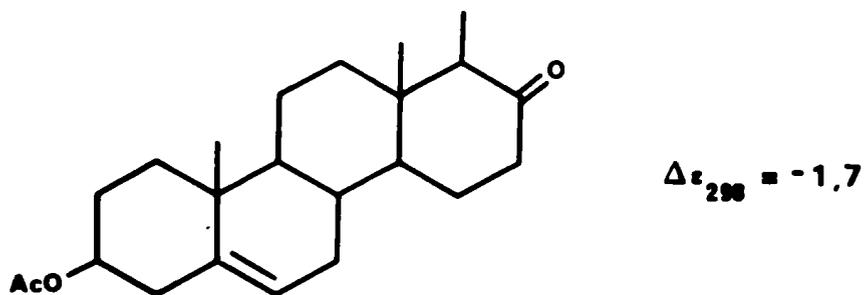


Figure 4

fait qu'il n'existe pas de gêne stérique importante au niveau de l'acétate axial justifiant cette conformation. De plus, une telle conformation introduirait une gêne stérique au niveau du méthyl-17a.

Les résultats du dichroïsme circulaire confirment l'absence d'un substituant axial en position 16. En effet, la règle de l'octant permet de prévoir, en présence d'un substituant axial en 16, une valeur négative de l'effet COTTON beaucoup plus forte que celle observée dans le produit ne possédant aucun substituant en position 16, ce qui n'est pas le cas des résultats obtenus sur notre courbe de dichroïsme circulaire :



B - REACTION DE BAMFORD-STEVENSON SUR LES TOSYLHYDRAZONES D'HYDROXY-17
PREGNANOLONES

La réaction des tosylhydrazones dans les conditions de BAMFORD-STEVENSON (sodium dans l'éthylène glycol) s'accompagne souvent de réarrangements. Nous avons pensé mettre à profit cette réaction pour synthétiser le D-homostéroïde cherché à partir d'un cétole de type 12. La tosylhydrazone correspondante donne naissance, par l'intermédiaire d'un diazo-alkane et d'un ion diazonium instable, à un carbocation, qui peut se réarranger selon les mécanismes a ou b (figure 5), donnant ainsi des produits de type 14 et 15.

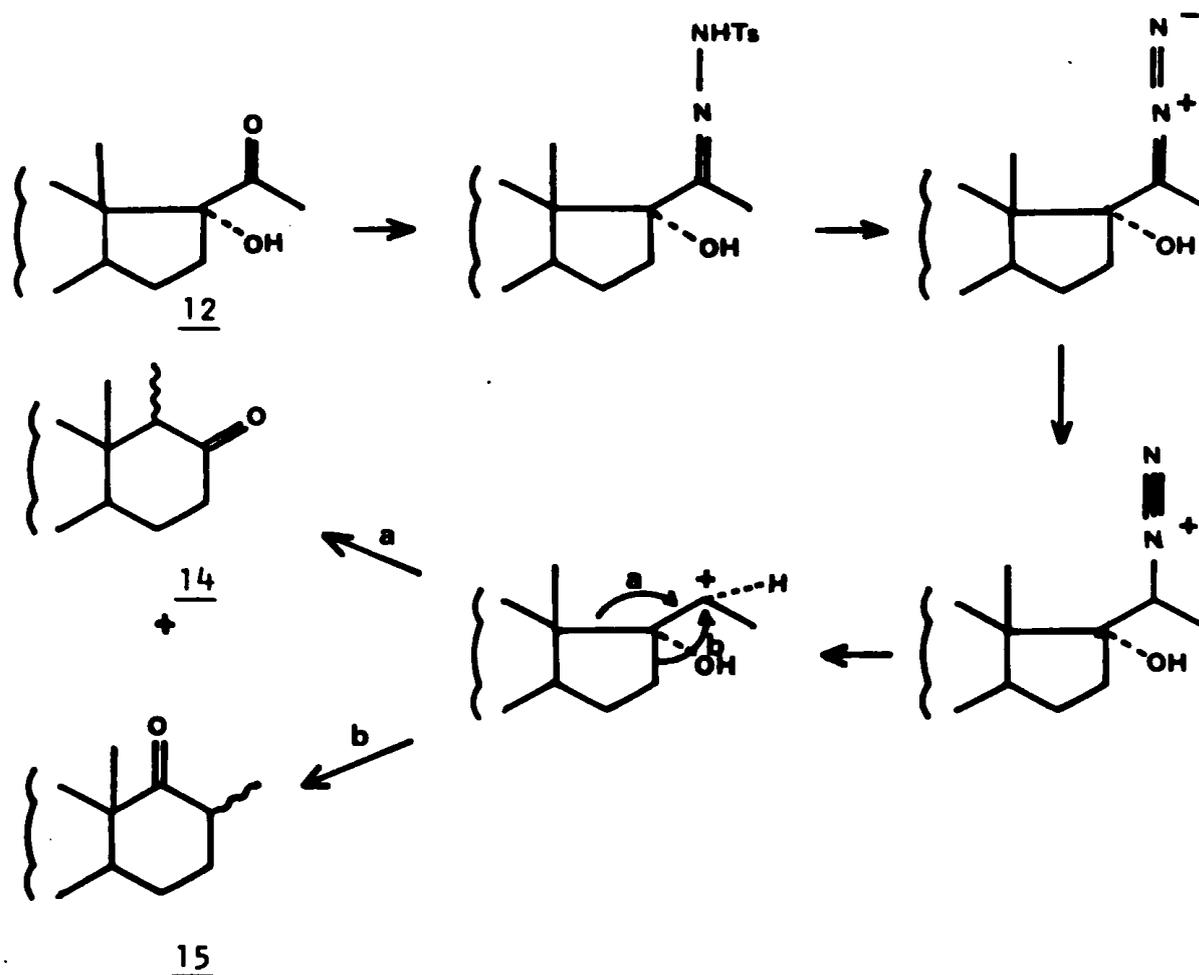


Figure 5

Cette synthèse a tout d'abord été mise au point sur un produit dont nous disposons au laboratoire* l'hydroxy-17 α pregnanolone 12. Elle conduit en trois étapes à l'acétoxy-3 β céto-17 méthyl-17 $\alpha\beta$ D-homoandrostane 14b qui ne diffère de la cétone 10 recherchée que par l'absence d'une double liaison en 5 - 6. Dans ce cas, l'identification du produit 15 obtenu parallèlement est très facile puisque celui-ci est décrit dans la littérature (ce qui n'est pas le cas de son homologue insaturé en 5 - 6).

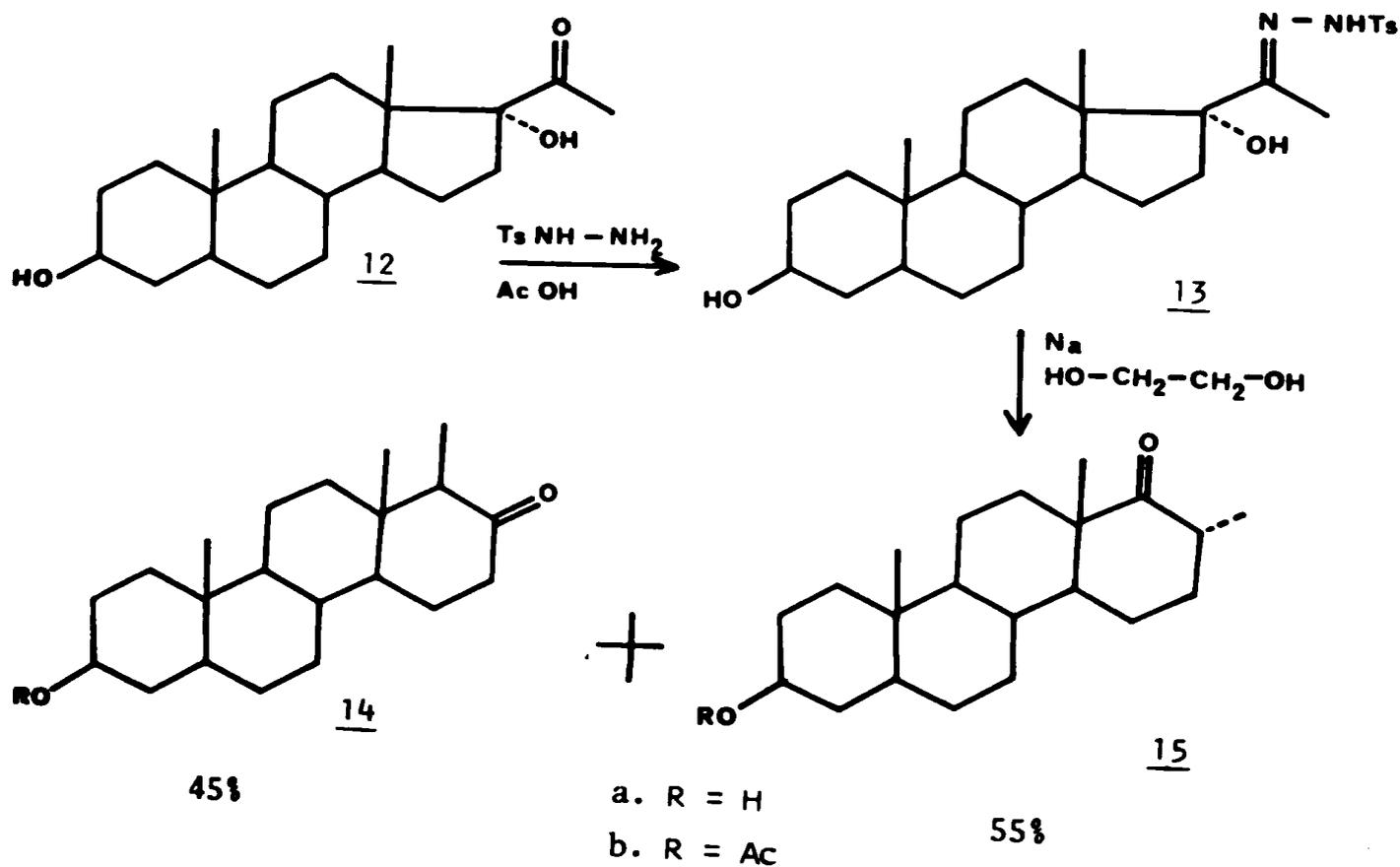


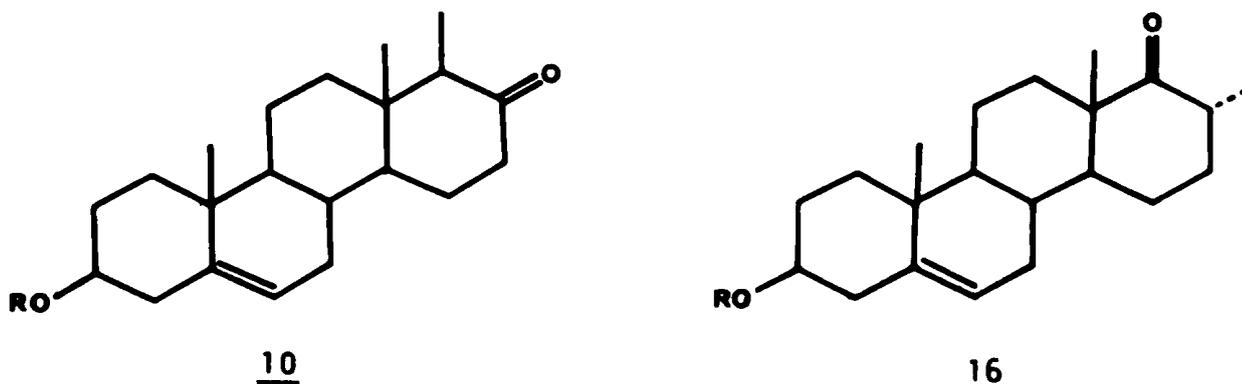
Figure 6

* Produit synthétisé par G. SOZZI, que nous remercions.

La décomposition de BAMFORD-STEVENSONS ⁽³¹⁾ de la tosylhydrazone 13 conduit au mélange des deux alcools 14a et 15a, dont la séparation est plus facile au niveau de leurs dérivés acétylés. Ces produits sont identifiés par comparaison de leurs caractéristiques physiques (point de fusion et pouvoir rotatoire) à celles publiées dans la littérature ⁽³²⁾. Par ailleurs leurs spectres IR et de RMN et notamment les déplacements chimiques des méthyles (voir tableau II page 30) confirment leurs structures.

La tosylhydrazone 13 est décomposée par chauffage dans les conditions classiques de BAMFORD-STEVENSONS (sodium dans l'éthylèneglycol), c'est-à-dire dans un milieu protique favorisant les réarrangements ⁽³³⁾. Nous avons essayé d'améliorer les proportions de cétone 14 (variation de température, de solvant et de base) sans y parvenir. Dans certains cas on observe même l'apparition de sous-produits.

La suite des réactions décrites ci-dessus (figure 6), reproduite en partant de l'hydroxy-17 α pregnénolone commerciale, conduit à la cétone cherchée 10 avec un rendement global de 35%, qui est supérieur à celui du réarrangement acyloïne du paragraphe précédent (20%). Les alcools isomères obtenus 10a et 16a peuvent être facilement séparés par l'intermé-



- a. R = H
- b. R = Ac
- c. R = THP

diaire de leurs dérivés acétylés ou de leurs dérivés tétrahydropyrannylés.

La cétone isomère 16 est identifiée à l'aide de ses spectres IR et de RMN, de plus une hydrogénation catalytique de ce produit conduit à la cétone 15 identifiée précédemment.

II - PREPARATION DE L'AMINE AXIALE EN 17 β

Pour préparer l'amino-17 β hydroxy-3 β méthyl-17 $\alpha\beta$ D-homoandrostène-5 4 nécessaire à la suite de notre synthèse, nous avons tout d'abord utilisé une méthode classique de réduction de l'oxime 17.

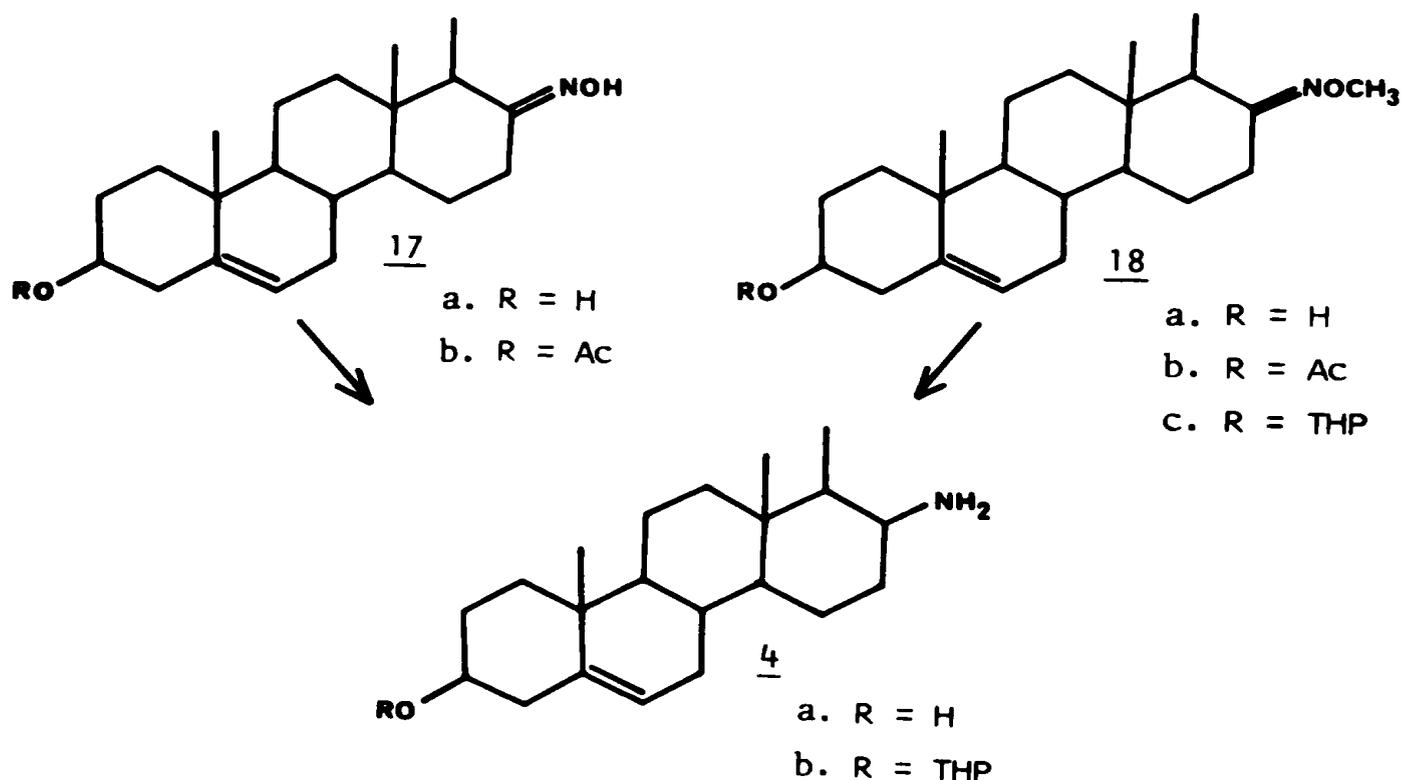


Figure 7

Les premières tentatives de réduction de 17 en 4 consistaient à utiliser l'hydrure de lithium et d'aluminium dans le THF (24). Mais cette réaction présente plusieurs inconvénients, notamment lorsqu'elle porte sur de grosses quantités : temps de chauffage très long, réaction

incomplète, faible solubilité de l'oxime entraînant l'utilisation de grandes quantités de solvant. De plus, après hydrolyse de la réaction, l'aminoolcool 4a reste adsorbé sur le précipité minéral, sans qu'il soit possible de l'extraire avec un rendement et une pureté satisfaisante, quelle que soit la méthode utilisée.

La faiblesse des rendements obtenus à partir de l'oxime (tableau I) peut être due à la formation de complexes tels que 19, généralement peu solubles, entre l'oxime et l'hydruure de lithium et d'aluminium, conformément au mécanisme généralement accepté pour ce genre de réaction (figure 8) (34).

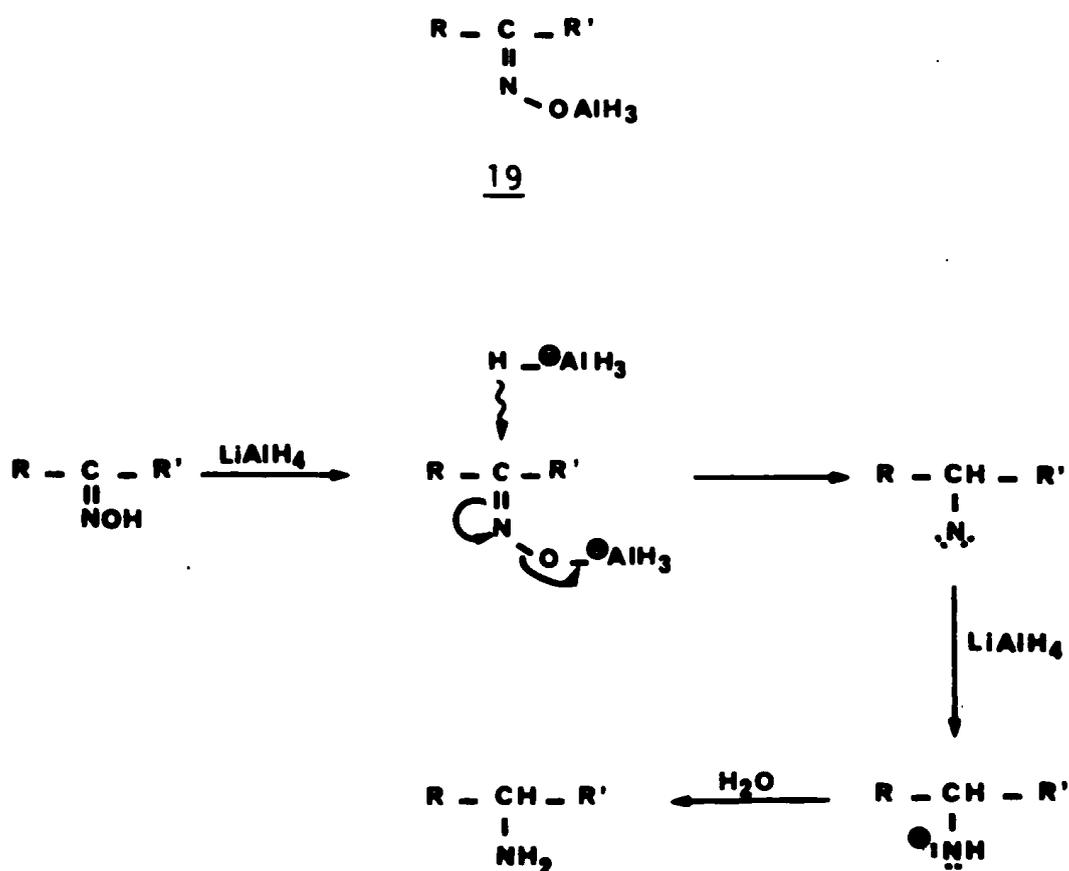
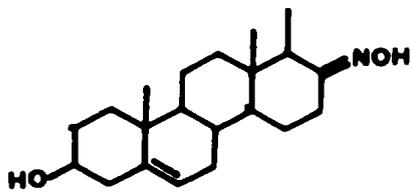
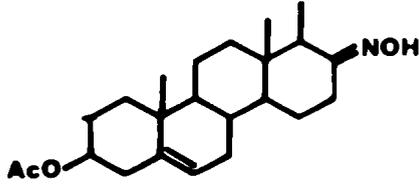
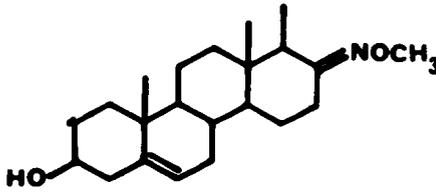
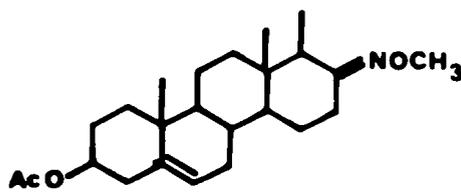
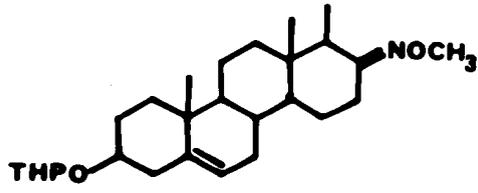


Figure 8

TABLEAU I

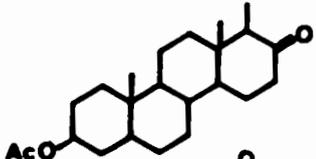
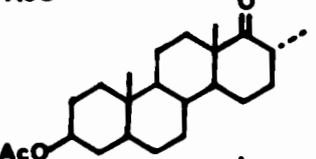
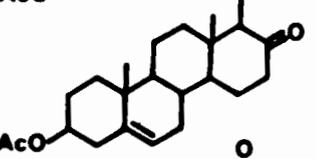
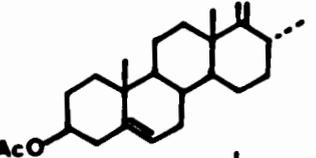
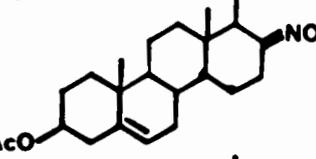
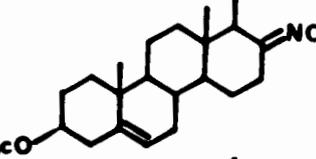
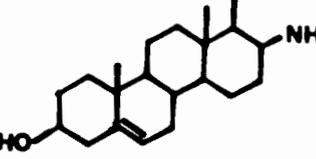
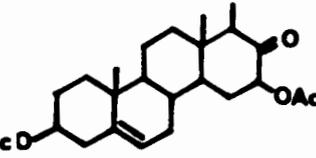
PREPARATION DE L'AMINE AXIALE EN 17 β

| produit | durée* de la réaction en h | solvant | % en amine axiale |
|---|----------------------------|---------|-------------------|
|  | 144 | THF | 15 |
|  | 72 | THF | 30 |
|  | 48 | THF | 35 |
| | 48 | DME | 35 |
|  | 72 | THF | 40 |
| | 24 | DME | 45 |
|  | 24 | DME | 85 |

* temps au bout duquel la réaction n'évolue plus.

TABLEAU II

DEPLACEMENTS CHIMIQUES DE METHYLES DE D-HOMO STEROÏDES
(solvant CDCl_3)

| formule du produit | N° | nbre de dé-terminations | CH_3 18 ppm | CH_3 19 ppm | CH_3^* 20 ppm |
|---|-----------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
|  | <u>14</u> | 3 | 0,64 | 0,85 | 0,92 |
|  | <u>15</u> | 3 | 1,06 | 0,75 | 0,92 |
|  | <u>10</u> | 5 | 0,68 | 1,02 | 0,95 |
|  | <u>16</u> | 4 | 1,06 | 0,98 | 0,92 |
|  | <u>17</u> | 5 | 0,70 | 1,00 | 1,02 |
|  | <u>18</u> | 3 | 0,68 | 1,00 | 1,00 |
|  | <u>4</u> | 3 | 0,95 | 0,99 | 0,96 |
|  | <u>11</u> | 3 | 0,64 | 0,98 | 0,93 |

* doublet ($J \approx 6$ ou 7 cps)

** spectre enregistré à 240 Mc car les pics sont mal séparés à 60 Mc

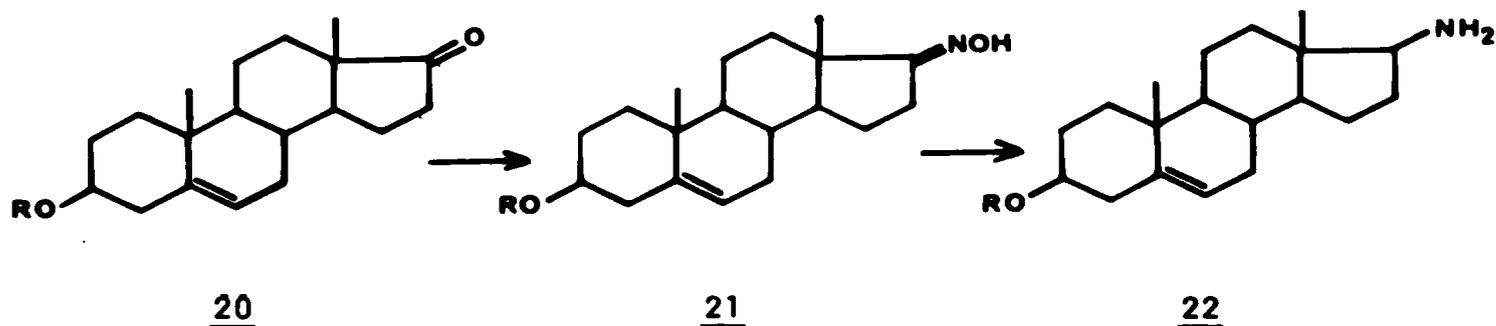
IV - SPECTRES DE RMN CARBONE-13

Les spectres de RMN ^{13}C des différents D-homostéroïdes ont été obtenus par transformé de FOURIER. Ils ont pu être analysés à l'aide des données connues en série stéroïde androstane non modifiée (39-42). L'utilisation de corrélations empiriques au sein d'une même série et les résultats du découplage hors résonance ont permis d'attribuer les signaux aux carbones de la molécule (tableau III). Comme nous pouvions nous y attendre, la modification du cycle D en cycle possédant six atomes de carbone ne modifie pas le déplacement chimique des carbones C_1 à C_7 , ni celui du carbone C_{10} . En dehors du cycle D, les signaux correspondant aux carbones C_8 , C_9 , C_{10} et C_{12} sont, par contre, légèrement déplacés par suite de l'influence du cycle D.

V - PREPARATION DE L'AMINO-17 β HYDROXY-3 β ANDROSTENE-5 22

La synthèse de l'amine 22 de la série androstane non modifiée a déjà été décrite (25). Nous en rappelons cependant la préparation car cette amine 17 β sert de produit de départ à l'élaboration du modèle 1.

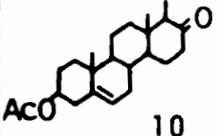
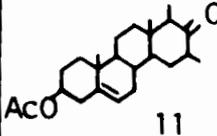
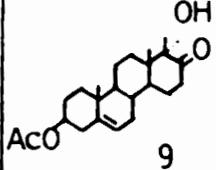
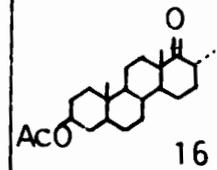
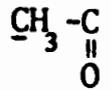
A partir de l'hydroxy-3 β céto-17 androstène-5 20a, la formation de l'oxime suivie d'une réduction par le sodium dans l'éthanol con-



- a. R = H
- b. R = THP
- c. R = AC

TABLEAU III

DEPLACEMENTS CHIMIQUES EN RMN ^{13}C DE D-HOMOSTEROÏDES

| C |  10 |  11 |  9 |  16 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 37,89 | 37,87 | 37,90 | 37,35 |
| 2 | 27,72 | 27,69 | 27,76 | 27,68 |
| 3 | 73,79 | 73,72 | 73,92 | 73,75 |
| 4 | 38,06 | 38,07 | 37,90 | 37,84 |
| 5 | 139,46 | 139,59 | 138,56 | 139,53 |
| 6 | 122,11 | 121,79 | 122,36 | 122,01 |
| 7 | 32,27 | 32,07 | 32,08 | 32,24 |
| 8 | 31,98 | 31,97 | 30,61 | 31,43 |
| 9 | 49,39 | 49,34 | 49,02 | 49,06 |
| 10 | 36,76 | 36,79 | 36,83 | 36,83 |
| 11 | 20,46 | 20,38 | 20,18 | 19,72 |
| 12 | 36,76 | 31,97 | 32,48 | 35,66 |
| 13 | 41,31 | 41,50 | 42,92 | 48,06 |
| 14 | 51,51 | 49,75 | 42,82 | 52,70 |
| 15 | 26,17 | 31,97 | 25,81 | 23,67 |
| 16 | 41,11 | 76,12 | 36,83 | 31,65 |
| 17 | 179,18 | 186,00 | 178,76 | 39,51 |
| 17a | 56,09 | 54,30 | 80,27 | 217,01 |
| 18 | 7,08 | 6,86 | 15,06 | 14,98 |
| 19 | 19,15 | 19,18 | 19,19 | 19,22 |
| 20 | 13,18 | 13,03 | 17,02 | 16,87 |
|  | 170,50 | 170,50 | 170,50 | 170,37 |
| | - | 170,11 | - | - |
|  | 21,38 | 21,38 | 21,45 | 21,30 |
| | - | 20,74 | - | - |

δ exprimé en ppm

duit spécifiquement à l' amino-17 β hydroxy-3 β androstène-5 22a . La même série de manipulations appliquée à la cétone 20b , où la fonction alcool est bloquée sous forme d'éther de tétrahydropyrannyle, conduit à l'amine 22b .

CHAPITRE II

FIXATION DE DEUX CHAÎNES TERMINEES PAR UN HYDROXYLE ET UN IMIDAZOLE SUR DES AMINO-STEROÏDES

Dans l'élaboration des modèles biomimétiques possédant deux fonctions imidazole et alcool se pose le problème du choix de la nature des chaînes portant ces deux fonctions.

Nous avons déjà expliqué (page 17) que ces chaînes seraient fixées au squelette stéroïde par l'intermédiaire d'une liaison amide, l'amine étant portée par le stéroïde. L'acide servant à la formation de la liaison amide sera donc porté par la chaîne carbonée.

Nature de la chaîne portant l'imidazole

Ce problème a déjà fait l'objet d'une étude dans le laboratoire (43). Le moyen le plus simple et qui a été retenu est de brancher l'histidine dont la fonction amine est bloquée.

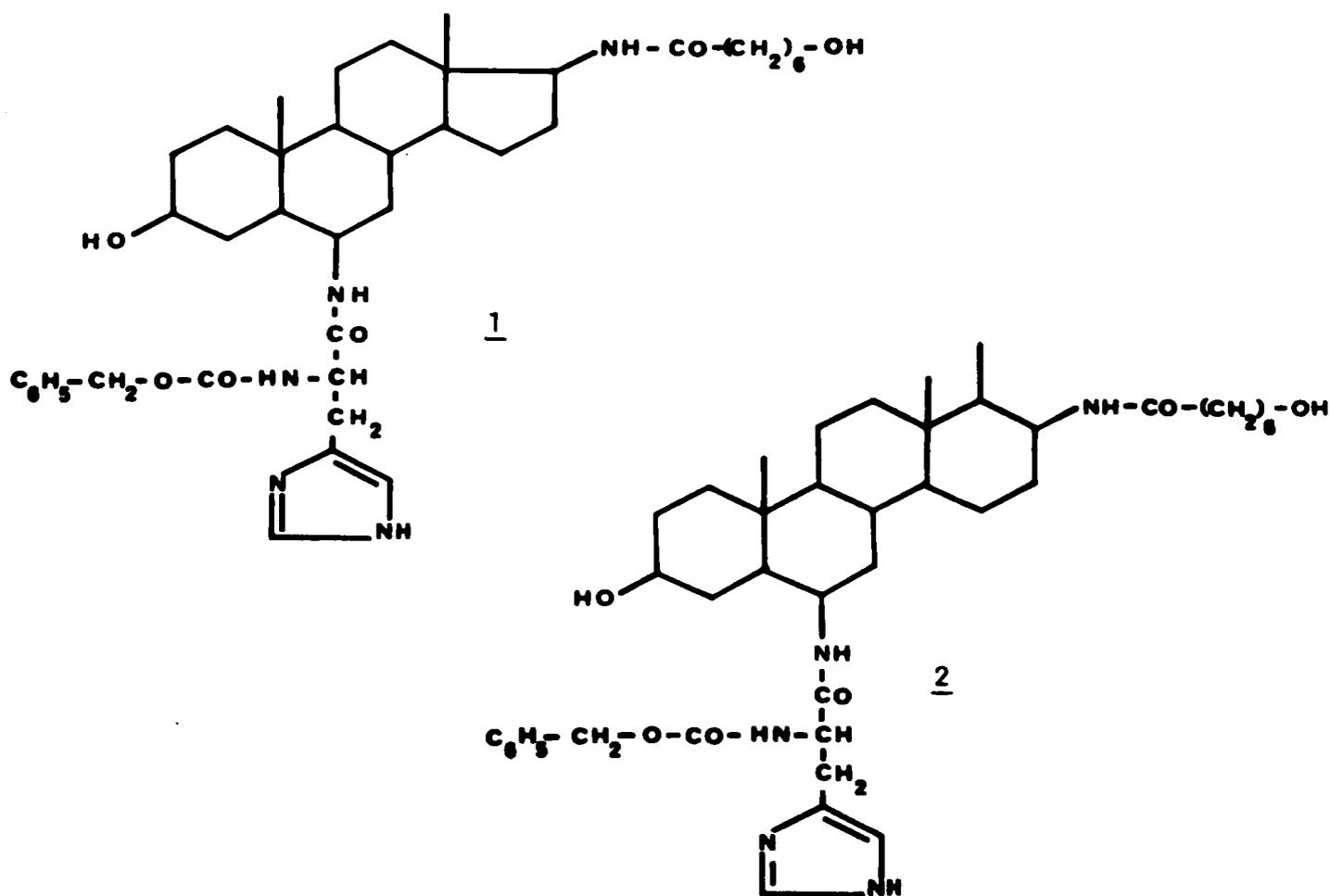
Ce blocage de la fonction amine a d'une part l'avantage de rendre possible la synthèse (l'amine bloquée ne pouvant pas réagir avec l'acide) et d'autre part d'éviter une action catalytique de la fonction amine basique dans l'étude cinétique de nos produits.

Nature de la chaîne portant l'alcool

Comme support de la fonction alcool nous avons choisi une chaîne aliphatique. Celle-ci présente l'avantage de ne pas compliquer le modèle à l'excès, et d'être facilement synthétisée (la chaîne pouvant éventuellement avoir des longueurs différentes).

Les deux chaînes branchées sont donc de natures différentes : l'une, peptidique, a un caractère plus polaire et facilitera la solubilité du produit dans l'eau ; l'autre, aliphatique, favorisera en milieu aqueux des interactions hydrophobes.

Pour les deux squelettes stéroïdes différents, ce choix conduit donc à la synthèse des produits 1 et 2.



I - SCHEMA DE LA SYNTHÈSE

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit les amines 4 et 22 servant de produits de départ à la synthèse des modèles 1 et 2 que nous décrivons ici.

Le schéma des réactions utilisées est donné ci-dessous (figure 9), appliqué ici au produit 2. La numérotation des produits équivalents possédant le squelette androstane non modifié est indiquée sous les figures correspondantes.

Des deux chaînes, nous avons commencé à fixer celle en 17β : la description détaillée de cette première étape fait l'objet du paragraphe suivant. Le choix de l'ordre des étapes n'est pas arbitraire. En effet, les amines 17β sont obtenues par réduction* de l'oxime correspondante, tandis que l'amine 6β est préparée par réduction du dérivé Δ -5 nitro-6, provenant lui-même d'une oxydation nitrique de la double liaison ⁽⁴⁴⁾. Cette dernière expérience, qui ne peut se faire en présence d'une fonction cétone, est par contre réalisable sur les amides 23b et 24b après fixation de la première chaîne. Nous obtenons respectivement pour les deux séries les produits 25 et 26.

L'achèvement de la synthèse comporte l'hydrogénation catalytique de 25 et 26 en amines 27 et 28, puis la condensation de la N-benzyloxycarbonyl histidine conduisant respectivement aux dérivés 29 et 30, qui, après saponification douce, donnent les produits 2 et 1 recherchés.

* Sodium dans l'éthanol pour le cycle à 5, hydrure de lithium et d'aluminium pour le cycle 6.

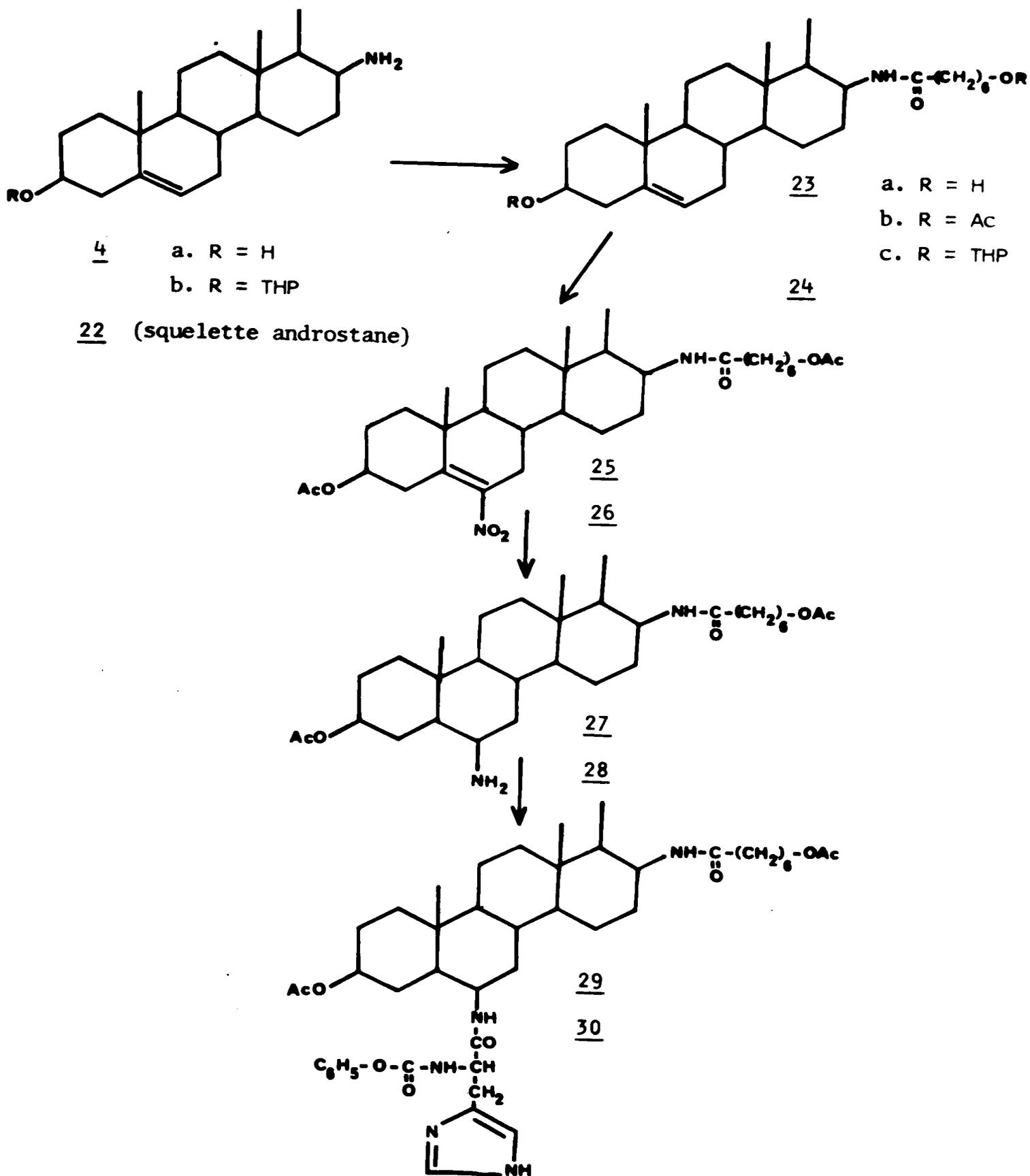


Figure 9

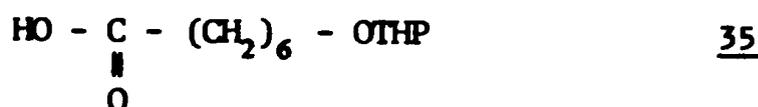
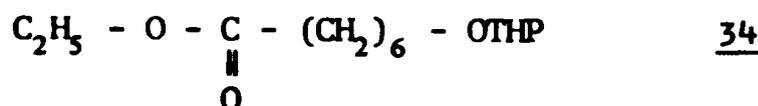
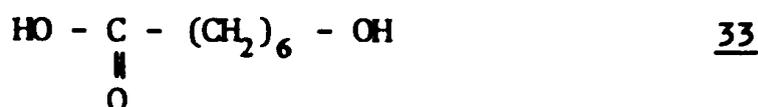
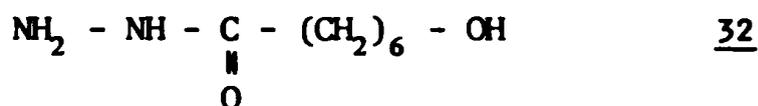
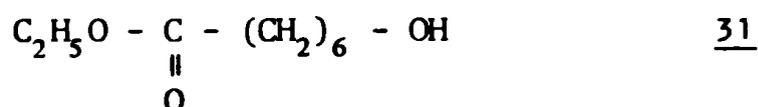
II - CHAÎNE EN 17 β : PREPARATION DE L'ACIDE HYDROXY-7 HEPTANOÏQUE

Le branchement de la chaîne en 17 β , qui formellement correspond à la condensation de l'acide hydroxy-7 heptanoïque sur les amino-17 β stéroïdes, a été réalisé au moyen de diverses méthodes nécessitant la synthèse de différents produits dans cette série.

L'oxydation de la cycloheptanone par l'acide de CARO (H₂SO₅) en présence d'éthanol, suivie d'une réestérification du produit brut obtenu, permet d'isoler l'hydroxy-7 heptanoate d'éthyle 31 pur ⁽⁴⁵⁾.

La première méthode de couplage envisagée, se faisant par l'intermédiaire de l'azide, nécessitait la formation de l'hydrazide 32, obtenue par action de l'hydrazine hydratée sur l'ester 31.

Les autres méthodes utilisent soit l'acide hydroxy-7 heptanoïque 33, obtenu par saponification de l'ester 31, soit l'acide 35 dont la fonction alcool est bloquée sous forme d'éther de tétrahydropyranyl obtenu de la même manière que précédemment à partir de l'ester bloqué 34.

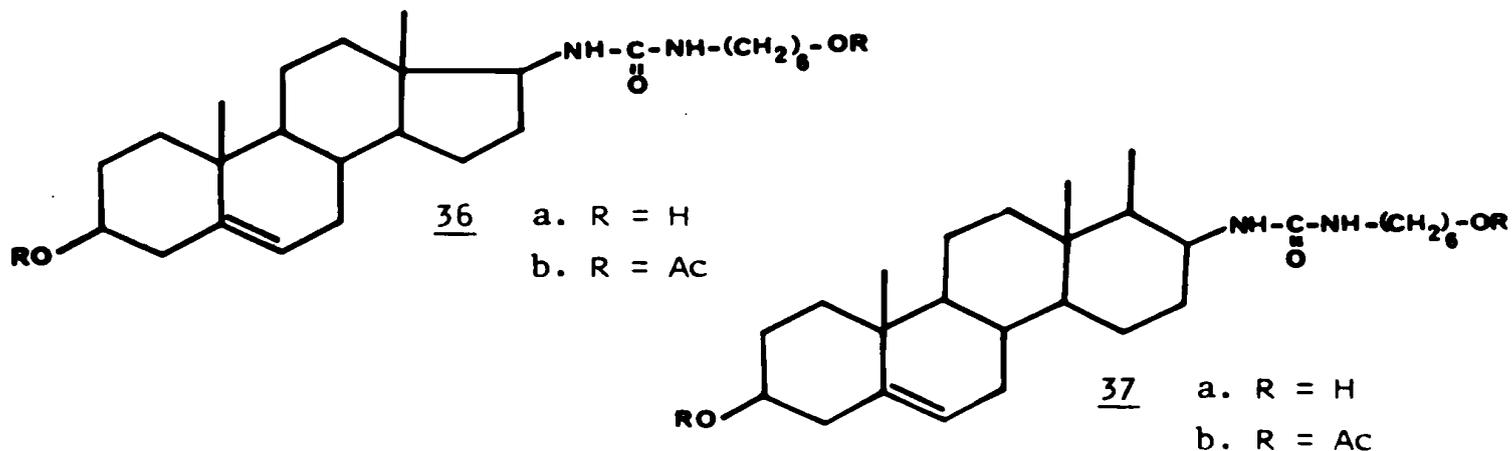


III - ETUDE DU BRANCHEMENT DE LA CHAÎNE EN 17 β

A - METHODE *via* L'AZIDE

Pour former la liaison amide entre l'amino-stéroïde et le carbonyle de la chaîne alkylée, une méthode simple, à partir de l'ester 31, est d'activer celui-ci sous forme d'azide ⁽⁴⁶⁾. Pour cela on forme l'hydrazide 32 qui, en présence d'acide nitreux, conduit transitoirement à l'azide, lequel peut réagir sur l'amine avec formation de la liaison peptidique.

Cette réaction donne effectivement le produit attendu, avec un rendement variant de 40% à 80% pour la condensation sur le composé 22 et de 0% à 20% avec le composé 4 (stéroïde modifié). Les plus faibles rendements obtenus sont dus à la formation parallèle d'urées 36 et 37 (identifiées par leurs spectres IR et de RMN).



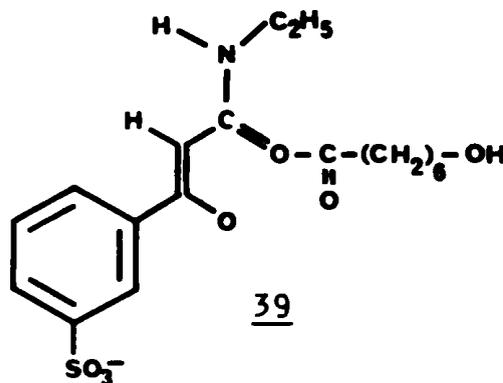
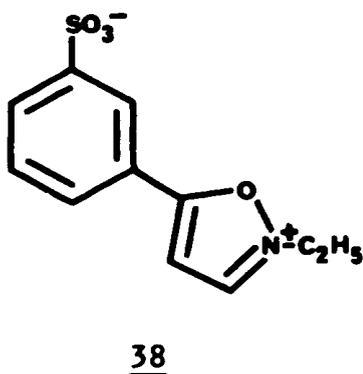
La formation de ces produits peut s'expliquer par le réarrangement de l'azide en isocyanate qui, en réagissant sur l'amine, forme l'urée. L'amino-stéroïde étant peu soluble dans les solvants utilisés, et l'azide n'étant pas stable à température ordinaire, la réaction s'effectue dans les conditions limites de solubilité du stéroïde et de stabilité de l'azide. C'est pourquoi les conditions expérimentales qui auraient dû permettre d'obtenir systématiquement le rendement maximum en

amide n'ont pu être réalisées de façon reproductible.

Bien que l'amide soit séparable de l'urée par chromatographie, les faibles rendements observés sur le stéroïde modifié 23 nous ont amenés à envisager d'autres méthodes de synthèse.

B - METHODE UTILISANT LE REACTIF DE WOODWARD

Parmi tous les réactifs facilitant la formation de la liaison peptidique ⁽⁴⁷⁾, nous avons choisi le réactif K de WOODWARD 38 ⁽⁴⁸⁾.



Ce produit présente l'avantage de former avec l'acide un ester d'énol de type 39 assez réactif, de plus la réaction ne nécessite pas le blocage des fonctions alcool. Ce réactif a d'ailleurs été utilisé au cours de la fixation d'acides aminés et de peptides sur un squelette stéroïde ⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾. Malheureusement le stéroïde n'est pas très soluble dans les solvants couramment utilisés pour cette réaction (acétonitrile, nitrométhane) et les rendements ne sont pas très satisfaisants : $\approx 40\%$ en composé 24 et $\approx 20\%$ en composé 23 (stéroïde modifié). Cette méthode nécessite de plus des séparations délicates.

C - METHODE *via* L'ANHYDRIDE MIXTE

Nous avons finalement utilisé une méthode à l'anhydride mixte, celui-ci résultant de l'action du chloroformiate d'éthyle sur l'acide. Les fonctions alcools doivent être protégées. Nous avons utilisé des éthers de tétrahydropyranyle, dérivés stables au cours de la formation de l'amino-stéroïde à partir de l'oxime correspondante. L'alcool est facilement régénéré par une hydrolyse en milieu acide.

Les rendements sont cette fois excellents : \approx 80% pour l'amide 24b et 75% pour l'amide 23b.

REMARQUE

La même méthode de couplage appliquée aux deux séries de stéroïdes donne des rendements différents. On remarque qu'ils sont toujours inférieurs en série androstane modifiée. La différence de configuration de l'amine créant des interactions stériques différentes dans les deux séries en est sans doute la cause.

IV - BRANCHEMENT DE LA CHAÎNE EN POSITION 6β

Le branchement de la chaîne 6β , déjà évoqué au § I, ne pose aucun problème, malgré l'encombrement dû au méthyle 19.

Ainsi, l'histidine, dont la fonction amine est bloquée sous forme de dérivé N-benzyloxycarbone, peut être fixée, en utilisant le réactif de WOODWARD, sur les amines 27 et 28 : on obtient les produits 29 et 30 sur lesquels deux chaînes carbonées sont branchées en position 6β et 17β .

V - OBTENTION DES PRODUITS 1 ET 2

La dernière étape est la saponification de l'acétate de la chaîne branchée en 17. Cette expérience est délicate car nous ne souhaitons pas débloquent la fonction amine de l'histidine branchée en position 6 β (cf. page 34).

Le problème essentiel réside dans le fait que les groupements benzyloxy-carbonyles peuvent, en milieu basique, soit être saponifiés, soit donner lieu à des produits de réarrangement divers ⁽⁵¹⁾. L'utilisation de conditions douces (saponification à froid, faible concentration en OH⁻) permet de régénérer les alcools sans toucher au groupement protecteur de la fonction amine (IR, RMN).

VI - CONFIRMATION DES STRUCTURES PAR LES CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DES PRODUITS SYNTHETISES

A - PURIFICATION DES PRODUITS

Tous les produits intermédiaires ont été purifiés par chromatographie sur colonne de silice et cristallisés au prix de bien des efforts ! Efforts qui demeurèrent vains dans le cas des produits 29 et 2 qui, bien que solides, n'ont pu être recristallisés. La pureté des produits a été vérifiée par les méthodes habituelles (analyse, point de fusion, pouvoir rotatoire).

B - SPECTRES DE RMN

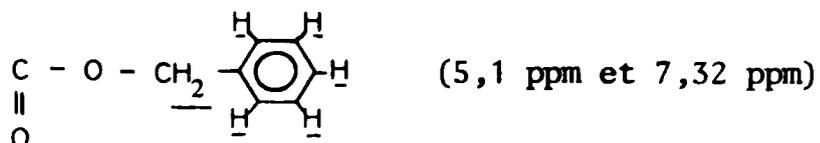
Ils présentent les caractéristiques des deux composantes : d'une part le stéroïde, d'autre part les chaînes carbonées.

Tous les signaux intéressants du spectre sont nettement séparés et permettent de confirmer les structures des produits.

Ainsi, les protons CH₂ - OR au bout de la chaîne en 17 appa-

raissent sous forme d'un triplet élargi entre 3,6 et 4 ppm selon la nature de R . Ce signal est bien séparé de celui du proton en position 3 sur le stéroïde.

Les protons de l'histidine : imidazole (6,75 et 7,5 ppm), CH₂ - imidazole (3 ppm) et le groupement protecteur



donnent des signaux nettement séparés des autres.

Pour le squelette stéroïde, les déplacements chimiques des méthyles 18, 19 et 20 sont portés dans le tableau IV . On remarque que le branchement de la chaîne en position 17 (formation d'une liaison NH - CO) déplace le CH₃ 18 d'une valeur identique à celle de l'acétamide en 17 (0,71 ppm). Le déplacement chimique du CH₃ 19 dans le produit 30 est de 0,85 ppm tandis que pour l'acétamide correspondante (produit ne possédant que la chaîne en 6β⁽⁴³⁾) le déplacement chimique de ce même méthyle est de 1 ppm.

C - SPECTRES DE MASSE

L'analyse des spectres de masse permet de confirmer la structure de nos produits.

Les spectres des produits 23b et 24b possèdent peu de pics importants :

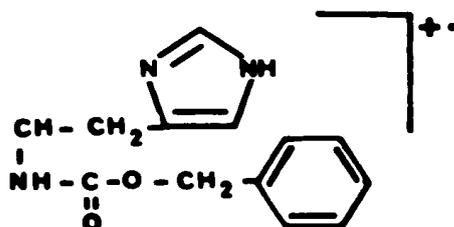
- les pics moléculaires (2,5% du pic de base) à m/e = 529 et m/e = 501 ;
- les pics de base à M-60, soit m/e = 469 et m/e = 441 résultant de la perte d'acide acétique par un mécanisme de transfert d'hydrogène sur l'acétate en position 3⁽⁵²⁾ ;

- les pics à $m/e = 282$ et $m/e = 254$ (30% du pic de base) proviennent des ions $m/e = 469$ et $m/e = 441$ après la perte de la chaîne en 17 avec migration de l'hydrogène en 16 ($m^* = 166$ et $m^* = 146$).

La complexité du spectre de masse du produit 27 rend compte du grand nombre de fragmentations possibles de la molécule. Cependant, on peut relever un certain nombre de fragments pour lesquels une structure peut être proposée.

Ainsi le pic à $m/e = 729$ (M-60) provient de la perte d'acide acétique (transfert d'hydrogène sur l'acétate en 3) :

- le pic à $m/e = 543$ résulte de l'ion précédent par rupture simple de la chaîne en position 17 ;
- le pic à $m/e = 441$ provient de l'ion $m/e = 729$ par perte de la chaîne en 6 avec transfert de l'hydrogène en 7 sur l'oxygène de la fonction carbonyle de la chaîne ;
- le pic à $m/e = 244$ correspond à l'ion



(rupture en α du carbonyle et de l'azote de la chaîne en 6) ;

- aux plus faibles masses nous observons des pics à $m/e = 108, 107, 91, 79$ et 77 caractéristiques du groupement benzyloxy.

CHAPITRE III

ACTION CATALYTIQUE DES COMPOSES SYNTHETISES : HYDROLYSE D'ESTERS PHENOLIQUES

Les modèles de catalyseur 1 et 2 que nous avons choisi d'étudier comportent deux fonctions (imidazole et alcool) jouant un rôle essentiel dans le site actif de la chymotrypsine.

Les deux modèles (figure 10) ne diffèrent que par l'orientation des deux chaînes carbonées (portant l'une l'alcool, l'autre l'imidazole) par rapport au stéroïde. Pour le stéroïde 1 les chaînes sont de stéréochimie 6β et 17β sur un squelette androstane, tandis que pour le produit 2 les chaînes, fixées en 6β et 17β d'un D-homonostéroïde, sont en position diaxiale ("parallèle"), perpendiculairement au plan moyen de la molécule. Dans ces deux composés une liaison hydrogène est possible entre l'imidazole et l'hydroxyle*, mais les chaînes diaxiales du modèle 2 sont de direction parallèle et donc globalement plus proches l'une de l'autre que dans 1, ce qui rend plus probable l'interaction entre l'alcool et l'imidazole. La catalyse par le modèle 2 devrait donc, a priori, être plus efficace.

* Cette liaison joue un rôle important dans le mécanisme d'action de la chymotrypsine.

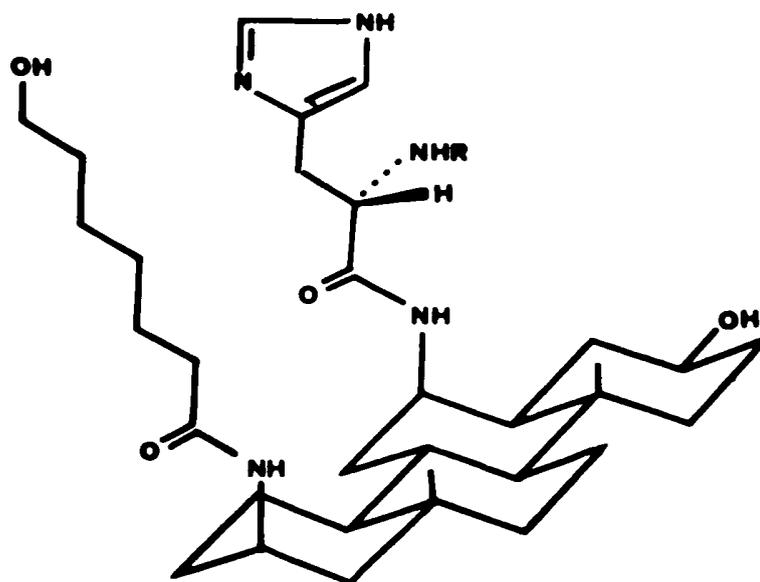
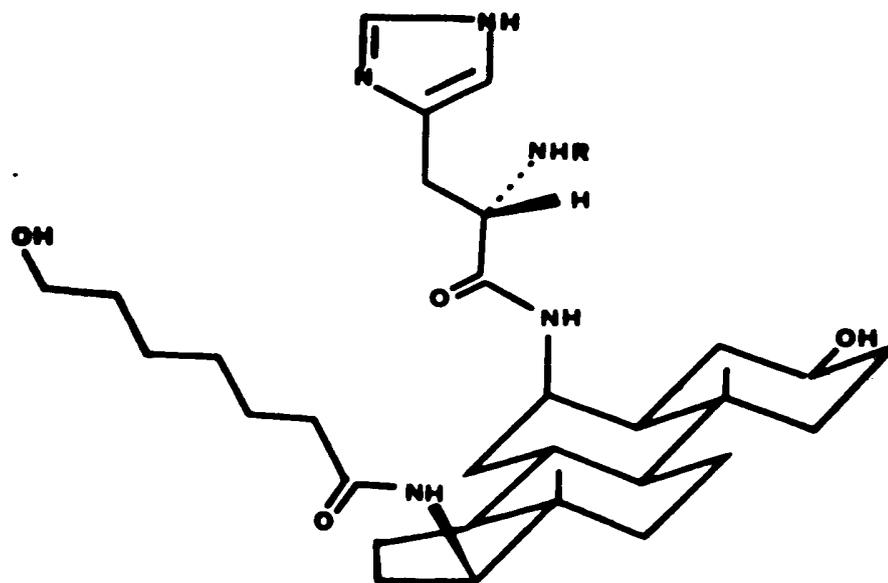
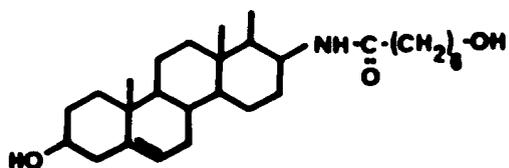


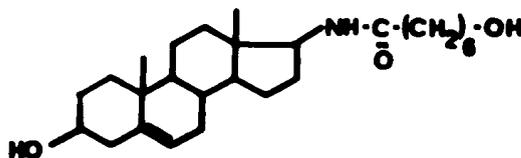
Figure 10

Dans ce chapitre, nous étudions l'hydrolyse, catalysée par les stéroïdes 1 et 2, d'esters phénoliques, substrats hydrolysés par l' α -chymotrypsine ⁽⁵³⁾, et généralement utilisés dans ce type d'étude. Nous pouvons ainsi comparer les efficacités relatives des modèles 1 et 2.

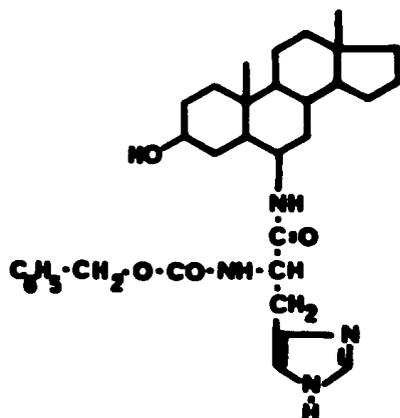
Dans ces deux composés, les deux fonctions imidazole et alcool peuvent interagir, et donc éventuellement donner lieu à une catalyse bifonctionnelle. Aussi comparerons-nous leur action à celle des composés 23a, 24a et 40^{*} ne comportant que l'une des deux chaînes carbonées, afin de vérifier si une accélération peut être attribuée à la présence simultanée des deux fonctions sur la même molécule. Nous pourrions ainsi dégager le rôle conjoint des deux groupements fonctionnels dans le modèle chimique étudié.



23a



24a



40

* Synthétisé selon (43).

MECANISME D'ACTION DE L' α -CHYMOTRYPSINE

Les catalyseurs biomimétiques reproduisent une partie des éléments de la structure du site actif de l' α -chymotrypsine. Nous avons pensé qu'il était utile de rappeler des généralités sur le mécanisme d'action de celle-ci ainsi que sur la cinétique de la catalyse enzymatique.

Le site actif de l' α -chymotrypsine comporte notamment des résidus sérine, histidine et aspartate. Les groupes fonctionnels résiduels de ces acides aminés sont liés par un système de liaison hydrogène.

La figure 11 ⁽³⁾ montre le mécanisme de l'action catalytique

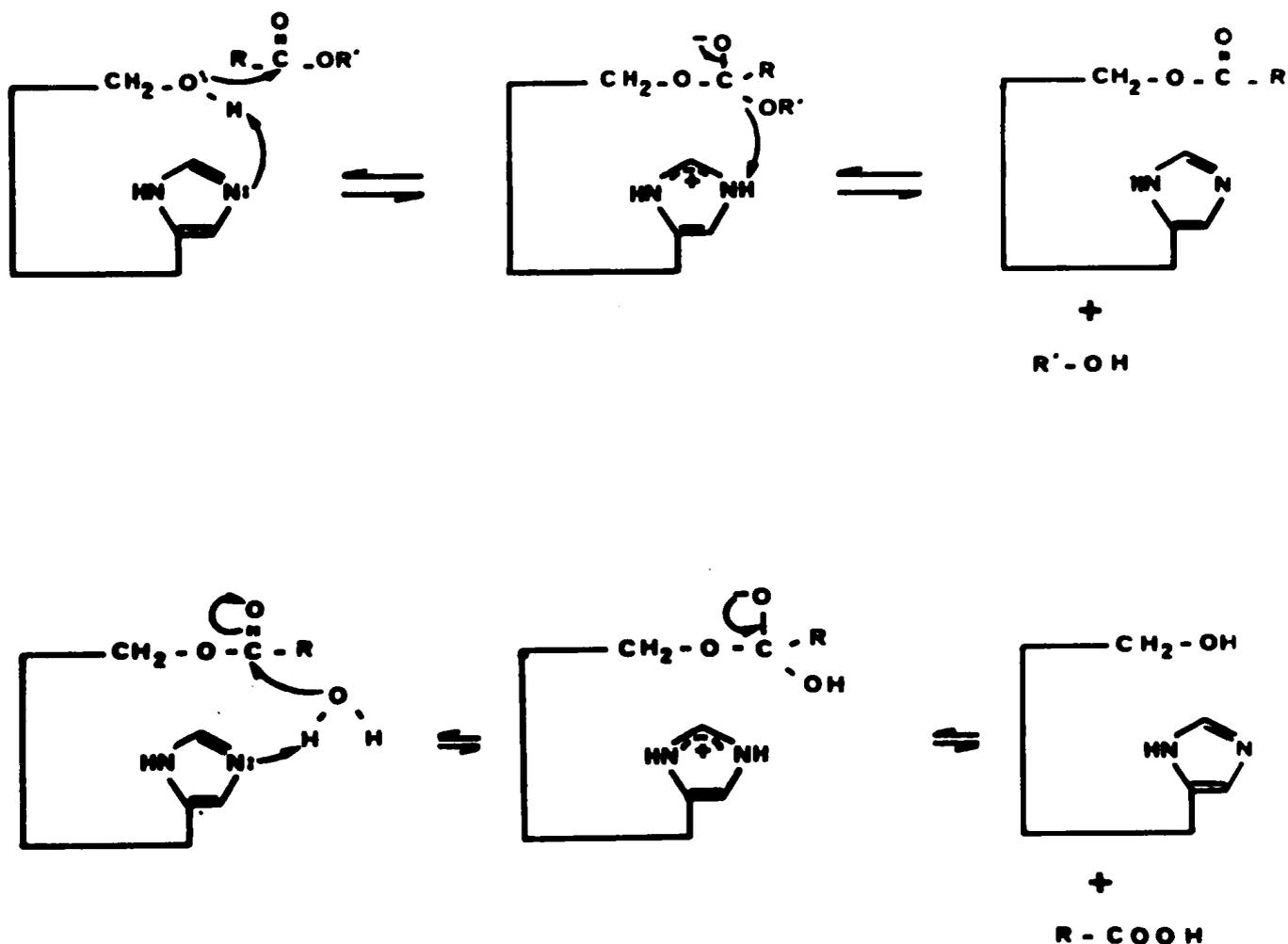
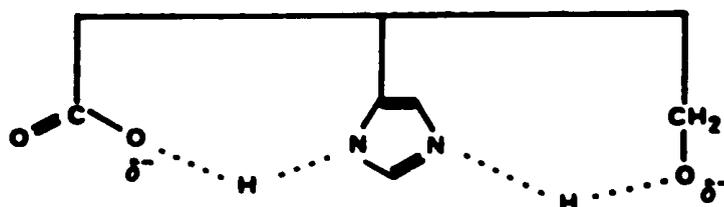


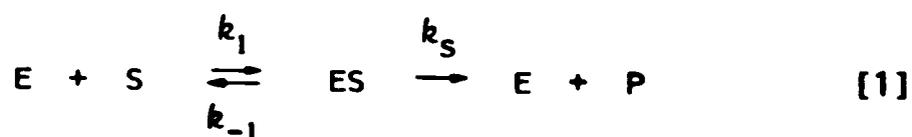
Figure 11

de l' α -chymotrypsine sur l'hydrolyse d'un ester. L'imidazole de l'histidine joue un rôle accepteur et donneur de protons et l'hydroxyle de la sérine est le nucléophile attaquant le carbonyle de l'ester. Il y a alors formation d'un acyle-enzyme et libération du constituant alcoolique de l'ester. L'enzyme est ensuite régénérée après hydrolyse de l'acyle-enzyme et libération de l'acide carboxylique (2)(10).

Le rôle de l'aspartate, mis en évidence plus récemment, est d'augmenter la mobilité des protons du site catalytique, par un relai de charge selon le schéma ci-dessous (12)(54), facilitant ainsi l'attaque nucléaire nucléophile de l'hydroxyle.



Le mécanisme d'action de la chymotrypsine obéit à une équation de vitesse de type MICHAELIS-MENTEN définie à l'aide du schéma simplifié :



où la vitesse de la réaction s'exprime :

$$v = \frac{k_s [E][S]}{K_m + [S]} \quad [2]$$

où $K_m = \frac{k_{-1} + k_s}{k_1}$ est la constante de MICHAELIS-MENTEN.

La courbe qui donne la vitesse de réaction en fonction de la concentra-

tion en substrat lorsque $[S] \gg [E]$ est représentée figure 12. Le

*Variation de la vitesse initiale
en fonction de la concentration en substrat
pour une réaction enzymatique*

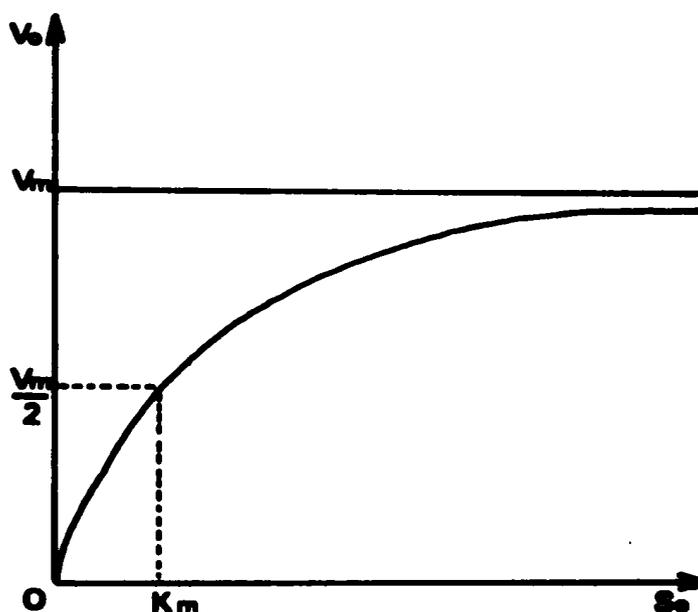


Figure 12

caractère asymptotique de cette courbe traduit le fait qu'à des concentrations suffisamment élevées en substrat ($[S] \gg [K_m]$), la vitesse de réaction devient indépendante de la concentration de celui-ci. Cette vitesse maximum est donnée par l'équation $V_m = k_s [E]$. Ce phénomène de saturation est une caractéristique des systèmes dans lesquels un complexe bimoléculaire stable se forme entre les substances réagissantes (ce qui est notamment le cas des réactions enzymatiques) (55).

ce de catalyseur ; les valeurs de $v_{cat.}$ cherchées sont obtenues en retranchant de la vitesse mesurée (v_{totale}) la vitesse d'hydrolyse spontanée.

Les stéroïdes étudiés étant peu solubles dans l'acétonitrile et le dioxane (solvants souvent utilisés pour des réactions analogues) et assez solubles dans les alcools, nous avons utilisé un mélange 1/1 d'isopropanol et d'eau. C'est aussi pour des raisons de solubilité que nous avons choisi de travailler vers 40°C.

Les réactions seront effectuées à pH constant (solution tampon) et à force ionique constante (chlorure de potassium).

Les stéroïdes étudiés (figure 13) ont été notés A , B et C (produits 40 , 1 et 2) pour la commodité de l'exposé.

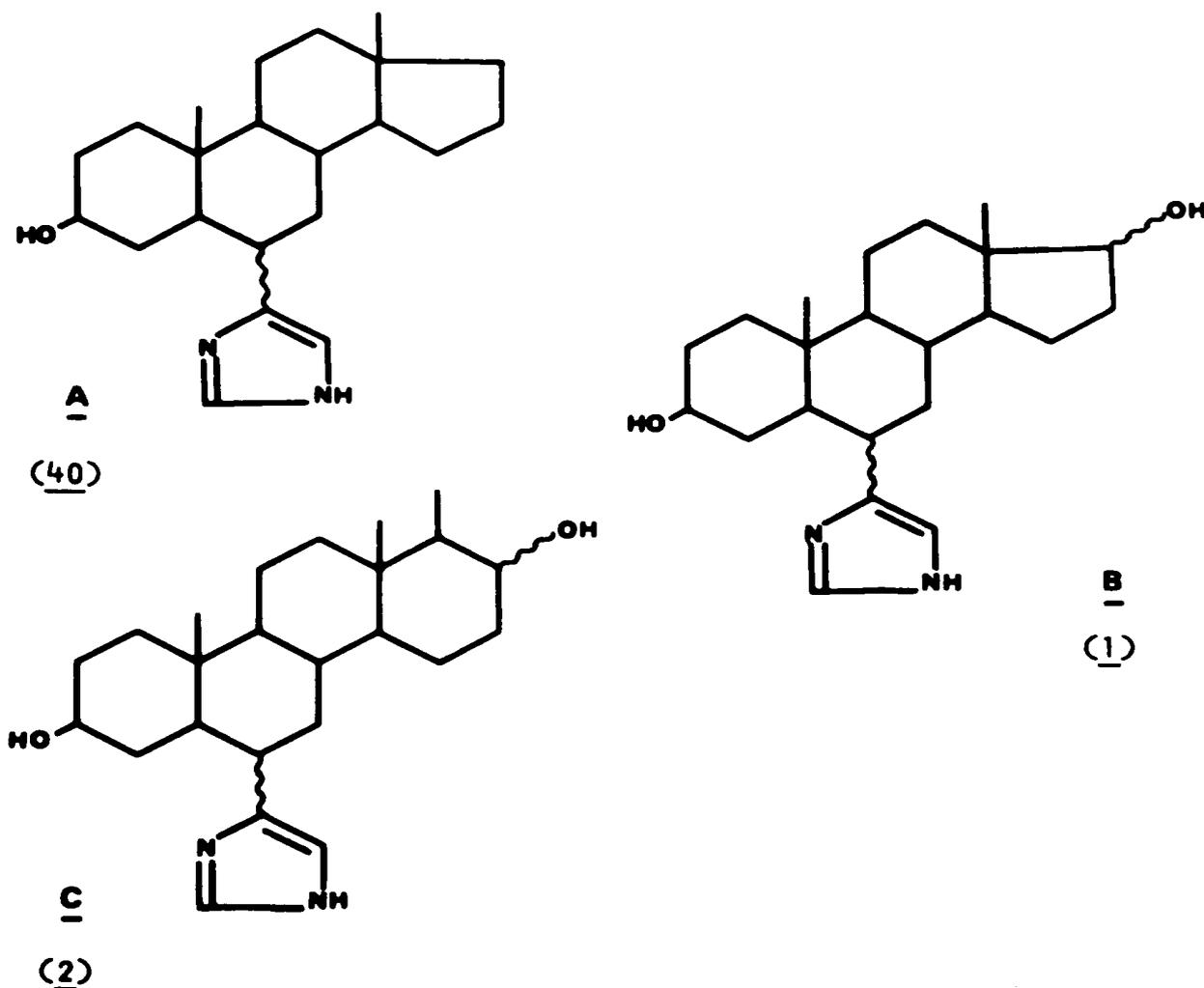


Figure 13

REMARQUE :

L'action conjuguée de l'alcool et de l'imidazole dans les modèles chimiques possédant ces deux fonctions peut ne pas avoir lieu selon le mécanisme exposé page 49. On peut notamment s'attendre, en considérant le caractère fortement nucléophile de l'imidazole par rapport à celui de l'hydroxyle, à une catalyse simple par celui-ci (figure 14), influencée ou non par la présence de l'alcool (56 - 58).

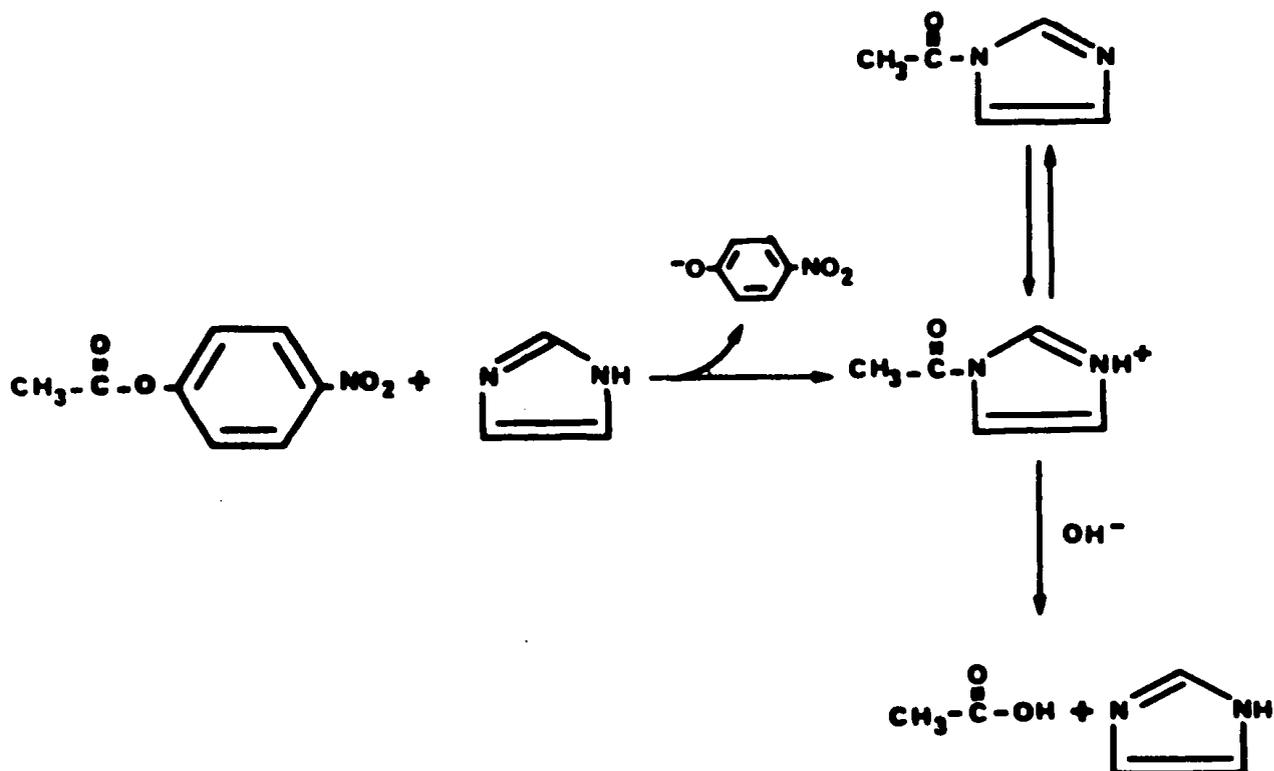


Figure 14

I - CINÉTIQUES DE L'HYDROLYSE DE L'ACÉTATE DE PARANITROPHÉNYLE EN
PRÉSENCE DE QUANTITÉS CATALYTIQUES DES MODÈLES CHIMIQUES A ,
B ET C

Une des causes importantes de l'exaltation de la vitesse d'une réaction modèle de catalyse enzymatique est l'existence d'un complexe bimoléculaire stable (de type ES) pouvant se former entre les entités réagissantes (cf page 51). Nous avons cherché à montrer l'existence éventuelle de ce complexe en étudiant l'ordre de la réaction par rapport aux divers solutés en présence : il a été montré que les noyaux imidazoles, liés à des composés aromatiques ou à des stéroïdes (59)(60), catalysent l'hydrolyse d'esters phénoliques soit par une réaction de type enzymatique (suivant une cinétique de MICHAELIS-MENTEN), soit par une réaction de second ordre, $v = k_2 [C][S]$ (S : substrat ; C : catalyseur), selon la structure du catalyseur employé.

Nous avons cherché à quel type de cinétique répondaient les réactions que nous avons étudiées, en utilisant la méthode des vitesses initiales.

A - METHODE DES VITESSES INITIALES

Principe de la méthode

La vitesse initiale v_0 est déterminée pour diverses concentrations en substrat ($[S_0]$ varie d'une réaction à l'autre). La courbe obtenue en portant v_0 en fonction de $[S_0]$ permet dans certains cas de déterminer l'ordre de la réaction.

- L'obtention d'une droite $v_0 = k_1 [S_0]$ permet de conclure à une réaction du premier ordre par rapport à S_0 et de déterminer k_1 .
- L'obtention d'une courbe d'allure asymptotique permet de conclure à une réaction de type enzymatique (voir page 51).

TABLEAU V

HYDROLYSE DE L'ACETATE DE P-NITROPHENYLE
 CATALYSEE PAR A , B ET C
 (catalyseur en défaut)

| $[S_0]^*$ $\times 10^3 M$ | $[C]^{**}$ $\times 10^4 M$ | pH $\pm 0,02$ | v_{ocat} $\times 10^6 M^{-1} \text{ min}^{-1}$ |
|------------------------------|-------------------------------|---------------|---|
| CATALYSEUR <u>A</u> | | | |
| 4 | 2 | 6,95 | 1,8 |
| 8 | 2 | - | 3,3 |
| 16 | 2 | - | 5,8 |
| 30 | 2 | - | 9,9 |
| 0,4 | 1 | 7,50 | 0,1 |
| 0,8 | 1 | - | 0,3 |
| 1,6 | 1 | - | 0,5 |
| 3 | 1 | - | 1,0 |
| 4,15 | 1 | - | 1,5 |
| 5 | 1 | - | 1,6 |
| 8,3 | 1 | - | 2,8 |
| 16,6 | 1 | - | 4,6 |
| 4 | 4 | 7,50 | 4,9 |
| 4 | 2 | - | 2,3 |
| 4 | 1 | - | 1,2 |
| CATALYSEUR <u>B</u> | | | |
| 4 | 1 | 7,50 | 3,1 |
| 16 | 1 | - | 11,0 |
| CATALYSEUR <u>C</u> | | | |
| 4 | 1 | 7,50 | 5,4 |
| 16 | 1 | - | 21,0 |

(température = 38°C ; force ionique 0,8 ;
 mélange isopropanol-eau 50% v/v)

* concentration initiale en substrat

** concentration totale en catalyseur

Détermination de v_0

Dans nos expériences, la vitesse initiale est mesurée en enregistrant à longueur d'onde fixe (400 nm) la variation en fonction du temps de l'intensité de l'absorption de l'ion paranitrophénate résultant de l'hydrolyse de l'acétate de paranitrophénol. Cette variation est linéaire tant que l'apparition de cet ion n'excède pas 5% de sa quantité en fin de réaction. La vitesse initiale v_0 est alors donnée par la pente de la droite.

B - ESSAI DE MISE EN EVIDENCE DU COMPLEXE STEROÏDE-SUBSTRAT

Catalyseur A

Nos premières expériences utilisant cette méthode ont eu pour objet l'étude de l'action catalytique du produit A, ne portant que la fonction imidazole. Il est en effet intéressant d'étudier l'influence du squelette stéroïde au cours de l'hydrolyse catalysée par le noyau imidazole. Ce squelette pouvant éventuellement être le site d'interactions hydrophobes favorables à l'hydrolyse des esters ⁽¹⁸⁾(60-62).

La détermination de la vitesse initiale v_0 a été faite pour deux valeurs du pH différentes en faisant varier la concentration initiale en substrat dans un grand domaine de valeurs (la concentration maximum $3 \times 10^{-2} M$ est imposée par la limite de la solubilité du substrat dans les conditions de l'expérience) (tableau V).

Sur la figure 15 sont portées les diverses valeurs de v_{0cat} en fonction de S_0 pour deux valeurs de pH et deux concentrations en catalyseur A différentes.

- On n'observe pas d'infléchissement des courbes obtenues, même aux concentrations en substrat élevées, ce qui empêche de mettre en évidence la formation du complexe enzyme-substrat.
- Il existe, par contre, une relation linéaire entre

Hydrolyse catalysée A
de l'acétate de paranitrophényle

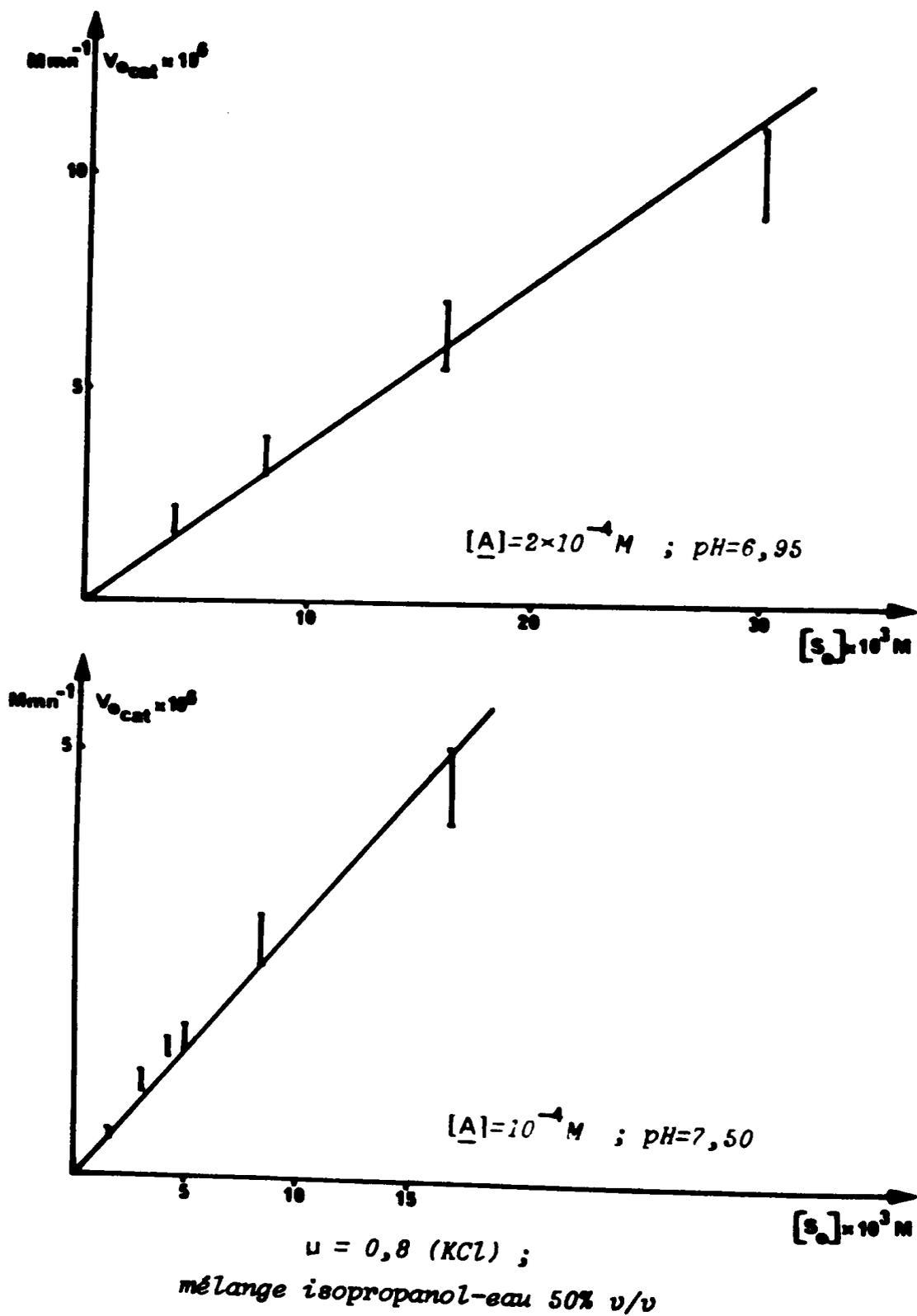


Figure 15

$v_{o\text{cat}}$ et S_o , dans le domaine de concentrations étudié. L'équation de vitesse est donc :

$$v_o = k_1 [S_o] \quad [1]$$

La réaction est du premier ordre par rapport à S_o .

Catalyseurs B et C

La présence simultanée des fonctions imidazole et alcool sur le même squelette stéroïde pouvant rendre le comportement catalytique des produits B et C totalement différent de celui du produit A, nous avons effectué des mesures par la méthode des vitesses initiales avec deux concentrations $[S_o]$ très différentes.

Les résultats (tableau V) montrent que dans ce cas il ne semble pas y avoir formation d'un complexe catalyseur-substrat.

C - CALCUL DES CONSTANTES DE VITESSE

Catalyseur A

Les pentes des droites de la figure 15 permettent de calculer les constantes de vitesse correspondant à l'équation [1]. Nous trouvons les deux valeurs :

$$k_1 = 0,33 \times 10^{-3} \text{ mn}^{-1} \quad \text{à} \quad \text{pH} = 6,95$$

$$k_1 = 0,30 \times 10^{-3} \text{ mn}^{-1} \quad \text{à} \quad \text{pH} = 7,50$$

Pour déterminer l'ordre par rapport au catalyseur, nous avons effectué des expériences en maintenant fixe les concentrations en substrat ($[S_o]$ constant) et en faisant varier à pH et température constants les concentrations $[A]_t$ en catalyseur. On observe alors (tableau VI) que la vitesse initiale est proportionnelle à la concentration en catalyseur. L'équation de vitesse peut s'écrire :

$$v_{\text{cat}} = k_2 [\underline{A}]_t [S] \quad [2]$$

où $[\underline{A}]_t$ est la concentration totale en catalyseur \underline{A} .

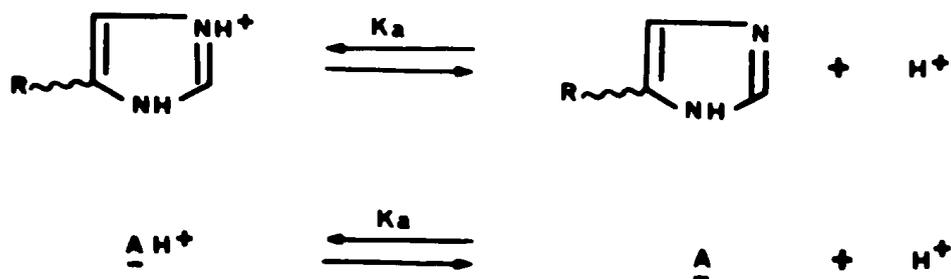
Les constantes de vitesse k_2 sont calculées à partir des expressions [1] et [2] :

$$k_2 = \frac{k_1}{[\underline{C}]} \quad [3]$$

Nous obtenons :

$$\begin{aligned} \text{à pH} = 6,95 \quad k_2 &= 1,6 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1} \\ \text{à pH} = 7,50 \quad k_2 &= 3,0 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1} \end{aligned}$$

Les constantes obtenues dépendent du pH, ce qui montre que la totalité du catalyseur n'est pas efficace. En effet, selon les valeurs de pH, les noyaux imidazoles sont partiellement protonés et l'on sait que l'activité catalytique de l'imidazole dans le cas d'une réaction d'hydrolyse d'un ester activé est due à la forme libre de l'imidazole ⁽⁵⁶⁾. En présence d'ions H^+ il existe l'équilibre suivant :



A un pH donné, connaissant le pK_a correspondant à cet équilibre, on calcule la concentration $[\underline{A}]$ en forme libre (voir partie expérimentale page 125).

La constante de vitesse k_{cat} rapportée à la concentration en imidazole libre est alors obtenue à partir de l'expression [4] :

$$v_{\text{cat}} = k_{\text{cat}} [\underline{A}] [S] \quad [4]$$

TABLEAU VI

CONSTANTES DE VITESSE DETERMINEES AU COURS DE L'HYDROLYSE
DE L'ACETATE DE P-NITROPHENYLE CATALYSEE PAR A , B ET C
(catalyseur en défaut)

| catalyseur | $[C]_t^{\bullet}$ $\times 10^4 M$ | pH $\pm 0,02$ | $[C]^{\bullet\bullet}$ $\times 10^4 M$ | $k_1 \times 10^3 mn^{-1}$ | $k_2 M^{-1} mn^{-1}$ | $k_{cat} M^{-1} mn^{-1}$ |
|---|--------------------------------------|---------------|---|---------------------------|----------------------|--------------------------|
| <u>A</u> pK _a = 7,00 \pm 0,01 | 2 | 6,95 | 0,95 | 0,33 | 1,6 | 3,5 |
| | 1 | 7,50 | 0,76 | 0,30 | 3,0 | 3,9 |
| | 4 | 7,50 | 3,04 | 1,23 | 3,1 | 4,0 |
| | 2 | - | 1,52 | 0,57 | 2,8 | 3,8 |
| | 1 | - | 0,76 | 0,31 | 3,1 | 4,1 |
| <u>B</u> pK _a = 7,00 \pm 0,01 | 1 | 7,50 | 0,76 | 0,74 | 7,4 | 9,7 |
| <u>C</u> pK _a = 6,90 \pm 0,01 | 1 | 7,50 | 0,76 | 1,33 | 13,3 | 17,6 |

température : 38°C ; force ionique : 0,8 ;

mélange isopropanol-eau : 50% v/v

- concentration totale en catalyseur
- concentration en catalyseur libre

Les valeurs des k_{cat} obtenues dans les différentes expériences sont portées sur le tableau VI. Nous trouvons :

$$k_{cat} = 3,9 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1} \pm 0,4 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$$

Catalyseurs B et C

Des mesures cinétiques, faites avec chacun des stéroïdes B et C, montrent que les vitesses de réaction respectives sont environ deux et quatre fois plus grandes que celles dues au stéroïde A (tableau VI).

Ces résultats, ne portant que sur un très petit nombre de valeurs, ne sont donnés qu'à titre indicatif. Les constantes de vitesse seront déterminées plus précisément par une autre méthode dans un paragraphe suivant.

D - CONCLUSION

Dans les expériences précédemment décrites, nous avons pu constater (§ B) qu'il n'y avait pas formation de complexe entre le catalyseur et le substrat, complexe qui permettrait une hydrolyse rapide du substrat.

L'hydrolyse de l'acétate de paranitrophényle n'est pas fortement accélérée par les stéroïdes A, B et C. Les contributions de l'hydrolyse spontanée ($v_{spont.}$) et de l'hydrolyse catalysée ($v_{cat.}$), dans la mesure de la vitesse totale, sont donc du même ordre. Ceci introduit une cause d'erreur importante dans les mesures effectuées. En effet, pour chaque expérience, l'hydrolyse spontanée est déterminée avant l'addition de catalyseur ; au cours de la mesure de l'effet catalytique, l'erreur faite sur cette mesure vient s'ajouter à celle faite sur la mesure de la vitesse totale en présence de catalyseur ($v_{totale} = v_{spont.} + v_{cat.}$) (voir partie expérimentale).

Malgré la relative imprécision des mesures, nous avons pu déterminer (§ C) les valeurs approximatives des constantes de vitesse dans les réactions catalysées par A, B et C. Nous avons envisagé de changer de méthode d'analyse. En effet, si on augmente la quantité de catalyseur, la cause d'erreur énoncée précédemment diminue puisque la vitesse d'hydro-

lyse catalytique devient beaucoup plus grande que la vitesse d'hydrolyse spontanée. Pour les expériences suivantes, nous avons donc travaillé avec un excès de catalyseur.

De plus, étant donné la faible accélération de l'hydrolyse due aux catalyseurs, nous avons été amenés, par la suite, à rechercher d'autres substrats, pour lesquels l'effet mesuré serait plus important.

II - CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE D'ESTERS PHÉNOLIQUES EN PRÉSENCE D'UN EXCÈS DE CATALYSEUR

La réaction étudiée, comme nous venons de le voir au paragraphe précédent, est du premier ordre par rapport au substrat lorsque le catalyseur est en défaut. Au cours de cette réaction, la concentration en catalyseur reste donc constante ; ceci montre que le catalyseur est très rapidement régénéré. Dans les cinétiques étudiées ci-dessous, l'utilisation de catalyseur en excès permet a fortiori de considérer que la concentration en catalyseur demeure constante au cours de la réaction. La vitesse est donnée par :

$$v_{\text{cat}} = k_2 [C]_t [S], \quad [C]_t \text{ concentration totale en catalyseur}$$

Les conditions de température et de solvant sont les mêmes que dans l'étude précédente. Les concentrations en catalyseur sont cent à trois cents fois plus importantes que les concentrations en substrat ($[S] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$).

La vitesse d'une réaction est déterminée, comme auparavant, en suivant par spectrophotométrie l'apparition de l'anion paranitrophénate à 400 nm, ce qui permet de déterminer à chaque instant la concentration en ester non hydrolysé (C_E).

Si la réaction est du pseudo-premier ordre par rapport à l'ester, l'équation de vitesse peut s'écrire :

Variation de $\log C_E$ en fonction du temps
pour l'hydrolyse de l'acétate de paranitrophényle
catalysée par B

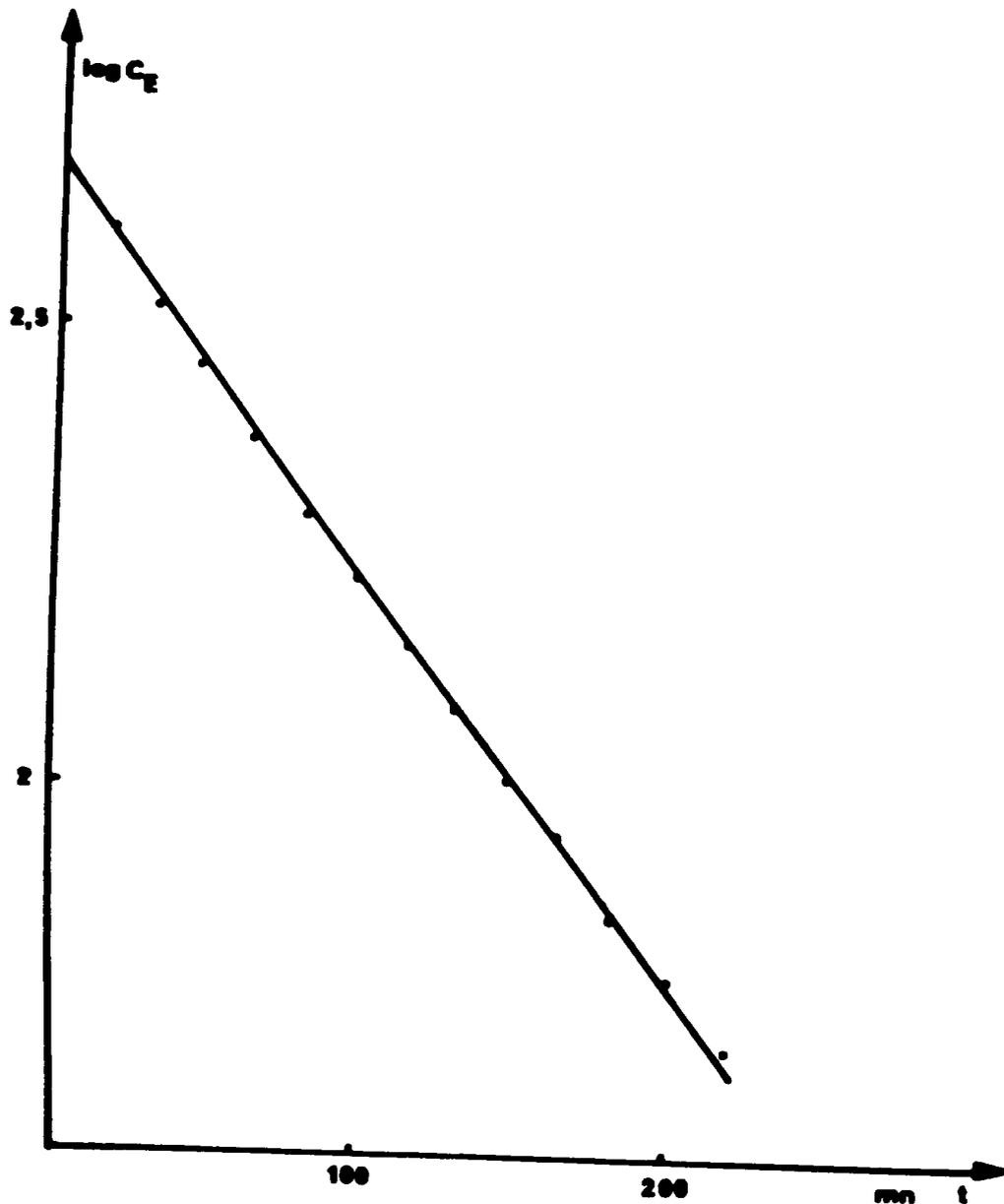


Figure 16

$[B] = 2 \times 10^{-3} M$; $[S] = 5 \times 10^{-5} M$; $pH = 7,5$; $\mu = 0,8$; 38° ;
mélange isopropanol-eau (50% v/v)

$$v = - \frac{dC_E}{dt} = \frac{dC_{ARO^-}}{dt} = k_{obs} C_E = \left[k_{spont.} + k_{\psi} \right] C_E$$

ce qui donne après intégration $\ln C_E = - k_{obs} t + \ln C_{E_0}$

- C_{ARO^-} : concentration en phénate au temps t
 k_{obs} : constante d'hydrolyse totale (cf page 52)
 $k_{spont.}$: constante d'hydrolyse de l'ester en l'absence de catalyseur
 k_{ψ} : constante d'hydrolyse de l'ester due au catalyseur

Nous vérifions pour chaque cinétique que la courbe $\log C_E$ en fonction du temps est une droite jusqu'à environ 80% du déroulement total de la réaction (figure 16 à titre d'exemple). La réaction est donc bien du premier ordre par rapport à l'ester et la valeur de k_{ψ} peut être déterminée à partir de chacune des courbes.

A - HYDROLYSE CATALYSEE PAR A D'ESTERS PHENOLIQUES A LONGUE CHAÎNE

L'hydrolyse de l'acétate de paranitrophényle (PNPA) en présence des catalyseurs A, B et C n'étant pas fortement accélérée par ceux-ci, nous avons recherché des esters pour lesquels les interactions entre catalyseur et substrat seraient plus favorables. Nous avons pensé que des esters à longue chaîne comme le phényl-4 butyrate de paranitrophényle 41 ou le phényl-5 valérate de paranitrophényle 42 favoriseraient ces interactions. En effet, il a été montré ^(62 - 66) que lorsque la taille du groupe hydrophobe de l'ester augmente, la vitesse de catalyse augmente aussi, dans le cas de modèles enzymatiques comportant également un site hydrophobe.

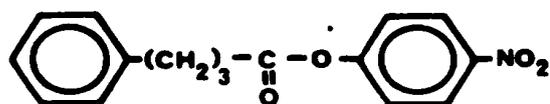
TABLEAU VII

COMPARAISON DES VITESSES
D'HYDROLYSE D'ESTERS PHENOLIQUES CATALYSES
PAR L'IMIDAZOLE ET LE PRODUIT A

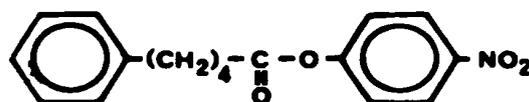
| substrat | catalyseur | k_{ψ} $\times 10^2 \text{ mn}^{-1}$ | $\frac{(k_{\psi})_A^*}{(k_{\psi})_{\text{Im}}}$ |
|-----------|------------|---|---|
| PNPA | Imidazole | 0,89 | 0,23 |
| | <u>A</u> | 0,21 | |
| <u>41</u> | Imidazole | 0,34 | 0,38 |
| | <u>A</u> | 0,13 | |
| <u>42</u> | Imidazole | 0,33 | 1,03 |
| | <u>A</u> | 0,34 | |

pH = 7,50 ; $\mu = 0,8$ (KCl) ; 39°C ; [C] = 8×10^{-4} M ;
[S] = 8×10^{-5} M.

* Le rapport $(k_{\psi})_A / (k_{\psi})_{\text{Im}}$ ne tient pas compte des différences de pK_a entre les deux catalyseurs (cf page 60) ; la comparaison de ces rapports reste cependant possible à un facteur constant près.



41



42

Nous avons comparé les vitesses des réactions en présence du catalyseur A "monofonctionnel" à celles obtenues en présence d'imidazole, où, en principe, une telle accélération n'est pas observée.

Les valeurs des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre k_{ψ} correspondant à des réactions effectuées dans les mêmes conditions de température, de solvant et de pH, en présence de l'imidazole ou du catalyseur A, sont portées dans le tableau VII.

Ce tableau montre que l'imidazole réagit plus vite avec l'acétate de panitrophényle qu'avec les esters de paranitrophényle à longue chaîne 41 et 42. La cause de la décélération est l'encombrement stérique; celui-ci étant pratiquement le même pour les esters 41 et 42, il explique la réactivité constante de l'imidazole pour ces deux produits.

Le catalyseur A réagit plus vite avec l'ester 42 qu'avec l'acétate de panitrophényle. L'accélération observée peut être expliquée par une interaction, favorable à l'hydrolyse, entre les substrats à longue chaîne alkylée et la partie hydrophobe du catalyseur A.

La comparaison des valeurs relatives des rapports $(k_{\psi})_A / (k_{\psi})_{Im}$ permet de montrer que le facteur favorable à l'hydrolyse du composé 42 existe aussi pour le composé 41. En effet, le rapport $(k_{\psi})_A / (k_{\psi})_{Im}$ croît lorsque l'on passe du PNPA à 41.

Cependant, en présence de catalyseur A, la vitesse d'hydrolyse de l'ester 42 n'est multipliée que par un facteur de 1,6 par rapport à celle du PNPA. Nous n'avons donc pas jugé intéressant d'utiliser

l'ester 42 comme substrat pour les expériences ultérieures.

B - HYDROLYSE DE L'ACETATE DE PARANITROPHENYLE EN PRESENCE DES CATALYSEURS A , B ET C

Les résultats obtenus dans ce paragraphe nous ont permis de comparer l'action catalytique des modèles chimiques "bifonctionnels" B et C (possédant un imidazole et un alcool) à celle des catalyseurs "monofonctionnels" A (possédant seulement l'imidazole) 23a et 24a (ces deux derniers ne possédant que l'alcool).

Dans le tableau VIII ont été portés les différents résultats obtenus pour les catalyseurs A , B et C , les stéroïdes 23a et 24a n'ayant aucun effet sur l'hydrolyse de l'acétate de paranitrophényle.

Nous avons vérifié à un pH donné la proportionnalité entre k_{ψ} et la concentration en catalyseur (figure 17 à titre d'exemple).

La constante de vitesse du second ordre k_{cat} (voir page 60) correspond à l'équation de vitesse :

$$v_{cat} = k_{cat} [C] [S] = k_{\psi} [S]$$

où [C] est la concentration en imidazole libre, variable selon le pH utilisé. La relation de proportionnalité $k_{\psi} = k_{cat} [C]$ impliquée par ces équations a été vérifiée (figure 18) ; elle permet de calculer k_{cat} . Nous trouvons :

pour A $k_{cat} = 3,66 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$ ($r^* = 0,997$)

pour B $k_{cat} = 6,78 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$ ($r = 0,999$)

pour C $k_{cat} = 12,48 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$ ($r = 0,996$)

*
coefficient de corrélation

TABLEAU VIII

HYDROLYSE DE L'ACETATE DE P-NITROPHENYLE
 CATALYSEE PAR A , B ET C
 (catalyseur en excès)

| catalyseur | pH | $[C]_c^* \times 10^3 M$ | $k_{\psi} \times 10^2 mn^{-1}$ | $[C]^{**} \times 10^3 M$ | $k_{cat} M^{-1} mn^{-1}$ |
|--|--|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <u>A</u> $pK_a = 7,00 \pm 0,01$ | 8,00 | 3 | 1,00 | 2,72 | 3,68 |
| | | 2 | 0,65 | 1,81 | 3,59 |
| | | 1 | 0,34 | 0,90 | 3,77 |
| | 7,50 | 3 | 0,83 | 2,28 | 3,64 |
| | | 2 | 0,53 | 1,52 | 3,49 |
| | | 1 | 0,27 | 0,76 | 3,55 |
| | 7,00 | 3 | 0,49 | 1,50 | 3,27 |
| | | 2 | 0,32 | 1,00 | 3,20 |
| | <u>B</u> $pK_a = 7,00 \pm 0,01$ | 8,00 | 3 | 1,84 | 2,72 |
| 2 | | | 1,21 | 1,81 | 6,68 |
| 7,50 | | 2 | 1,01 | 1,52 | 6,64 |
| | | 1 | 0,51 | 0,76 | 6,71 |
| 7,00 | | 3 | 0,99 | 1,50 | 6,66 |
| | | 2 | 0,62 | 1,00 | 6,20 |
| <u>C</u> $pK_a = 6,90 \pm 0,01$ | 8,00 | 2 | 2,30 | 1,86 | 12,40 |
| | | 1 | 1,08 | 0,93 | 11,61 |
| | 7,50 | 2 | 1,84 | 1,61 | 11,42 |
| | | 1 | 0,95 | 0,80 | 11,87 |
| | 7,00 | 3 | 2,13 | 1,68 | 12,68 |
| | | 1 | 0,57 | 0,56 | 10,18 |

température : 38°C ; force ionique : 0,8 ;
 isopropanol-eau (50% v/v)

- * concentration totale en catalyseur
- ** concentration en catalyseur libre

Variation de la constante de vitesse observée en fonction de la concentration totale en catalyseur $[A]_t$ pour la réaction avec l'acétate de paranitrophényle

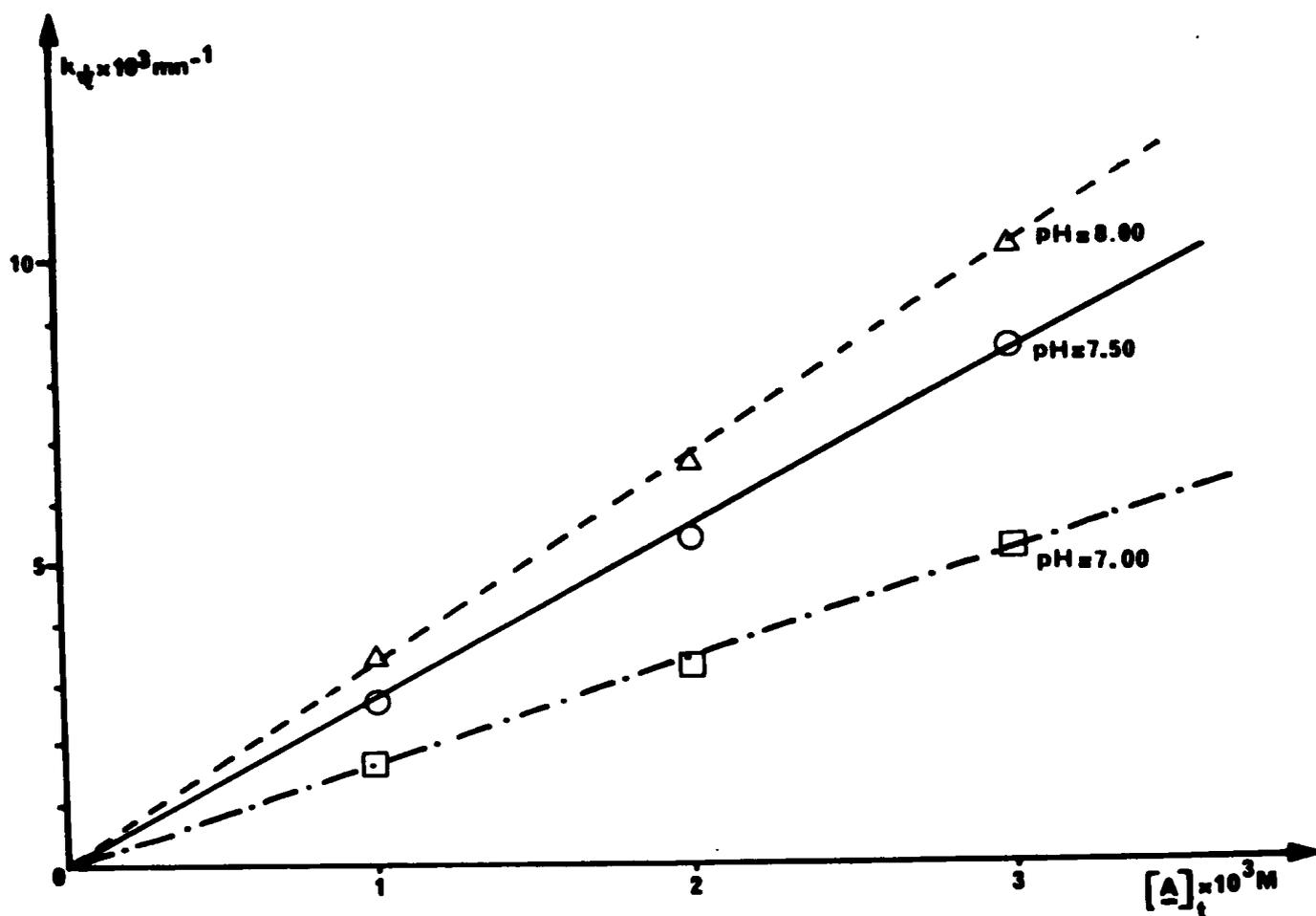


Figure 17

mélange isopropanol-eau (50% v/v) ; $\mu = 0,8$ (KCl)

Variation de la constante de vitesse observée en fonction de la concentration en catalyseur libre [A], [B] et [C] pour l'hydrolyse de l'acétate de paranitrophényle

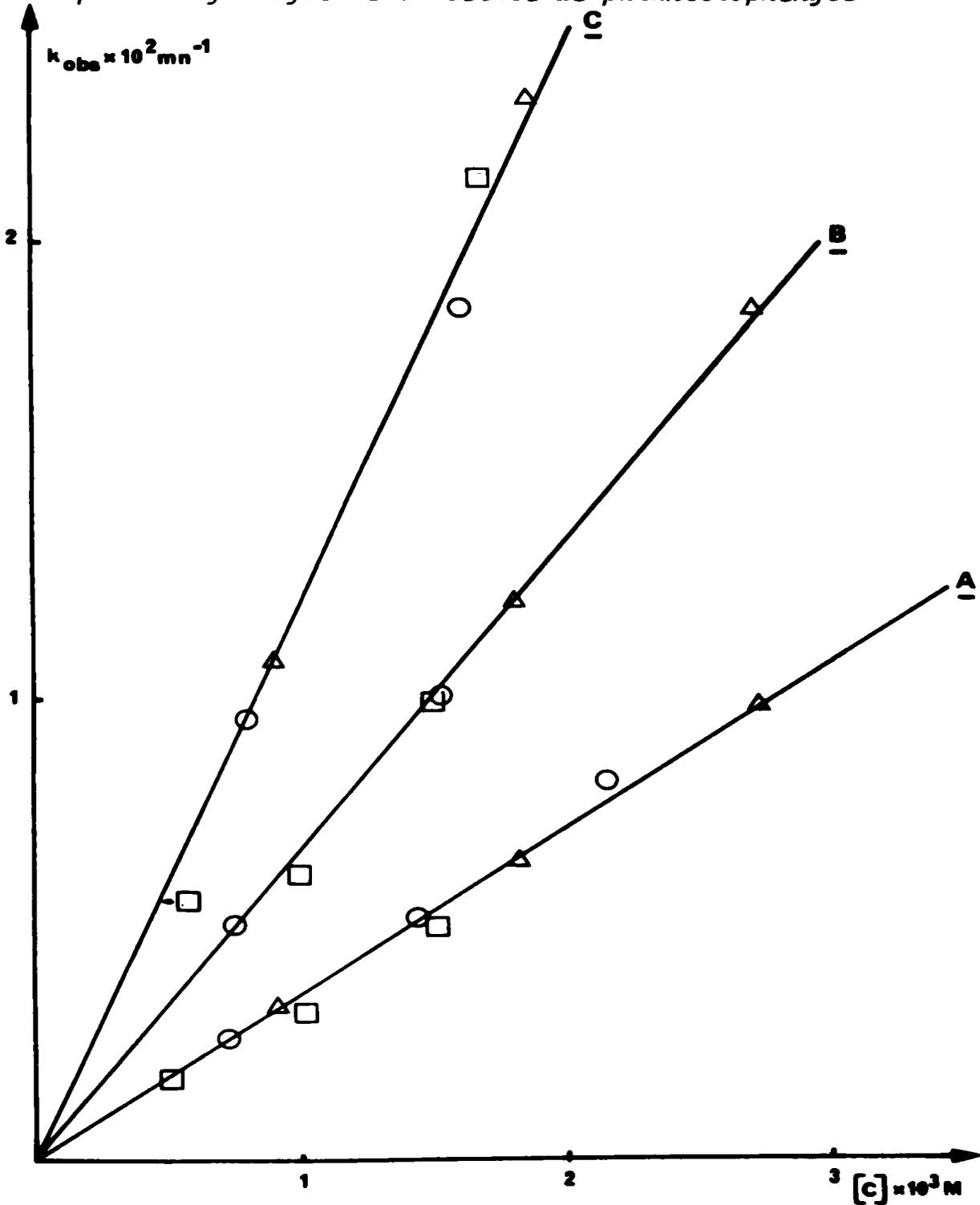


Figure 18

mélange isopropanol-eau (50% v/v) ; 38°C ; $\mu = 0,8$ (KCl) .

Δ pH = 8 ○ pH = 7,5 □ pH = 7 .

CONCLUSION

Les résultats obtenus au dernier paragraphe concernant l'hydrolyse de l'acétate de paranitrophényle par les trois catalyseurs A, B et C permettent de montrer que la réaction est accélérée lorsque sont simultanément présentes sur le même support les deux fonctions imidazole et alcool. La catalyse par les stéroïdes B et C (possédant les deux fonctions imidazole et alcool) est, en effet, plus efficace que dans le cas du stéroïde A ne comportant que la fonction imidazole (le stéroïde ne possédant que la fonction alcool n'ayant aucun effet sur l'hydrolyse de l'acétate).

La plus grande augmentation de vitesse est observée pour le composé C (modèle 2). Dans ce composé les deux chaînes portant l'imidazole et l'alcool sont fixées sur le squelette stéroïde en position diaxiale ; conformément à nos prévisions, l'interaction entre ces deux chaînes est donc plus favorable dans ce cas, le facteur d'accélération étant environ de 3 lorsque que l'on passe du produit A au produit C et seulement de 2 lorsque l'on passe du produit A au produit B.

Les accélérations observées ne sont pas suffisamment importantes pour que l'on puisse affirmer que le caractère bifonctionnel des composés B et C joue un rôle essentiel dans le mécanisme de la catalyse par ces produits.

L'effet observé lorsque l'on passe du catalyseur A "monofonctionnel" aux catalyseurs B et C "bifonctionnels" semble toutefois indiquer que l'alcool joue un rôle dans l'augmentation de vitesse de la catalyse. Ce rôle n'est pas de modifier directement la réactivité intrinsèque de l'imidazole (nous avons vérifié que la basicité de celui-ci

n'était pratiquement pas modifiée par la présence de l'alcool). On peut donc penser que l'alcool intervient lors de l'association entre le catalyseur et le substrat.

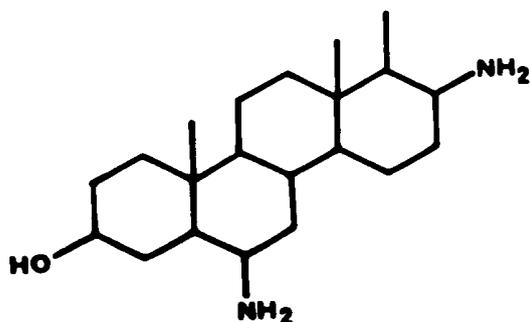
Toutefois, pourraient aussi intervenir dans l'accélération observée des interactions hydrophobes favorables, dues à la présence d'une chaîne carbonée supplémentaire, ces interactions pouvant stabiliser l'état de transition de la réaction. D'ailleurs, les résultats obtenus lors de l'hydrolyse catalysée par A des esters à longue chaîne (page 65) suggèrent l'existence de telles interactions.

Nos résultats sont loin d'être comparables aux grandes valeurs d'accélération observées parfois pour d'autres hydrolyses catalysées par d'autres modèles chimiques ⁽³⁾. Un des facteurs défavorables (notamment par rapport à la catalyse par l'imidazole) pourrait être ici un encombrement stérique important dû au support ⁽⁶⁾ et au groupement protecteur de la fonction amine de l'histidine ; cet encombrement empêcherait une bonne position relative du catalyseur et du substrat. Un autre élément défavorable pourrait être le solvant : la liaison hydrogène entre l'imidazole et l'alcool serait plus favorisée dans un milieu non polaire ⁽³⁾. L'étude de nos catalyseurs serait intéressante en milieu purement organique. Nous n'avons pu la réaliser.

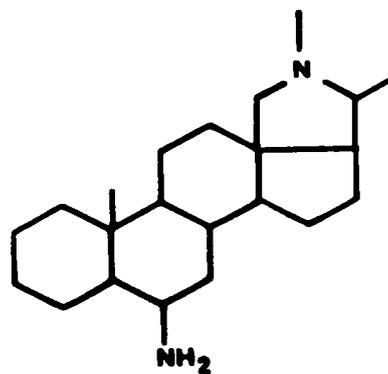
CHAPITRE IV

SYNTHÈSE DE DIAMINO-STÉROÏDES ; ESSAI DE MISE EN EVIDENCE D'UNE CATALYSE BIFONCTIONNELLE PAR CES PRODUITS

Le diamino-stéroïde 3, qui a servi de support au modèle enzymatique étudié dans les chapitres précédents, comporte deux fonctions amines diaxiales, situées d'un même côté du plan moyen de la molécule. Le caractère nucléophile des deux atomes d'azote rend possible la création d'interactions avec des centres électrophiles, une fonction acide par exemple. Cette possibilité se retrouve aussi dans d'autres diamines stéroïdiques plus accessibles, comme l'amino-6 β conanine 43. Nous avons étudié brièvement les possibilités de catalyse bifonctionnelle de ces deux produits.



3

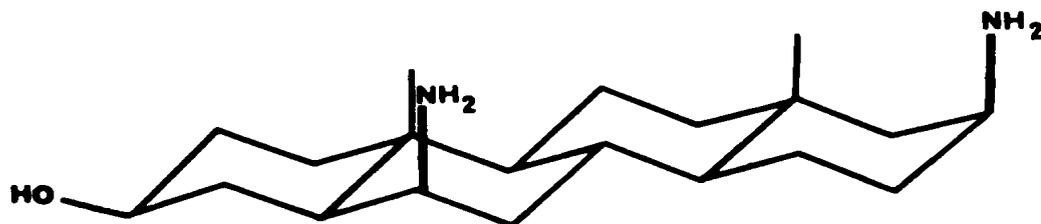


43

Le complexe susceptible d'être formé par interaction entre l'amine et l'acide est un complexe chiral (le stéroïde constituant un élément d'asymétrie). Les amines étant placées sur un squelette rigide avec une géométrie bien définie, une certaine spécificité peut a priori être observée lors de la formation du complexe.

Nous avons tenté de mettre en évidence cette propriété potentielle, qui fait jouer aux produits 2 et 43 le rôle de catalyseur bifonctionnel, en utilisant l'acide fumarique comme substrat ; nous avons étudié la deutériation de cet acide en présence de l'une ou l'autre des deux diamines.

L'étude des distances entre les azotes des deux composés 2 et 43 montre que celles-ci sont compatibles avec la formation d'un complexe faisant intervenir les deux fonctions acides de l'acide fumarique. L'interaction entre le stéroïde et l'acide fumarique est différente selon la face de l'acide qui est dirigée vers le catalyseur. L'acide fumarique se fixe donc a priori plus facilement d'un côté que de l'autre. Le deutérium, introduit catalytiquement du côté de la double liaison demeuré accessible dans le complexe, peut alors fournir un seul des deux diastéréoisomères possibles (voir étude détaillée page 84).



I - SYNTHÈSE DES PRODUITS

A - SYNTHÈSE DU DIAMINO-6 β ,17 β ACETOXY-3 β D-HOMOANDROSTANE 3

La diamine cherchée 3 n'étant pas un intermédiaire dans la synthèse du produit 2 (catalyseur C) pour des raisons de schéma synthétique, nous avons tout d'abord essayé d'obtenir cette diamine à partir d'un produit précédemment synthétisé : l'amino-17 β hydroxy-3 β D-homoandrostène-5 4a.

Pour cela, la mise au point de la synthèse a été faite en série androstane normale. Cette synthèse préliminaire conduit au diamino-6 β ,17 β acétoxy-3 β androstane 47.

Synthèse de la diamine 47 après protection de la fonction amine en position 17

Le schéma le plus simple (figure 19) pour obtenir la diamine 47 à partir de l'amino-17 β hydroxy-3 β androstène-5 22a déjà synthétisé (chapitre I) fait appel aux étapes suivantes :

- blocage de la fonction amine en 17,
- nitration de la double liaison en 6,
- réduction du groupement nitro en amine axiale 6 β ,
- régénération de la fonction amine en position 17.

Les différents groupes utilisés pour protéger la fonction amine (acétamide, thiocétamide, trifluoroacétamide, benzyluréthane) résistent bien au milieu oxydant et nitrant, mais dans tous les cas, la régénération de la fonction amine en 17 est très difficile (cf partie expérimentale).

A la suite de ces échecs, nous avons tenté d'introduire le groupement nitro avant l'obtention de l'amine en position 17. La nitration de la double liaison a donc été effectuée sur l'oxime.

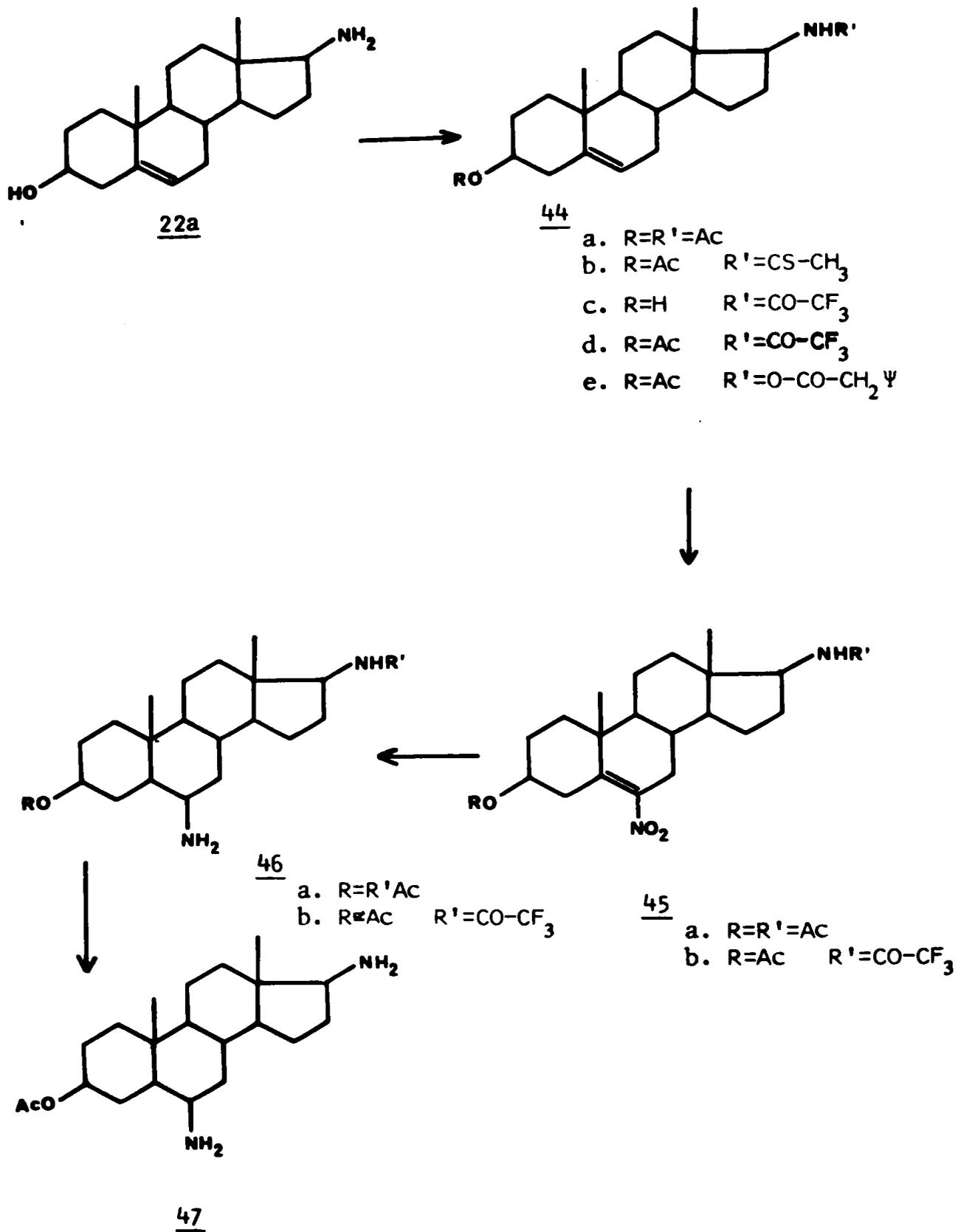
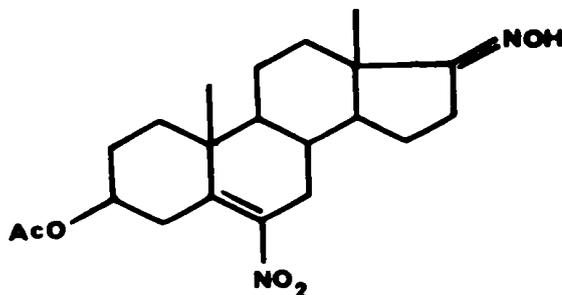


Figure 19

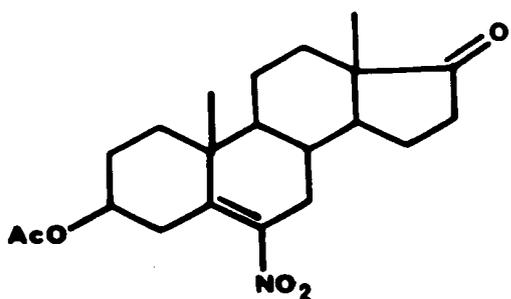
Essais de nitration de l'oxime

Pour obtenir le diamino-6 β ,17 β acétoxy-3 β androstane 47
un intermédiaire possible est l'oxime 48 .

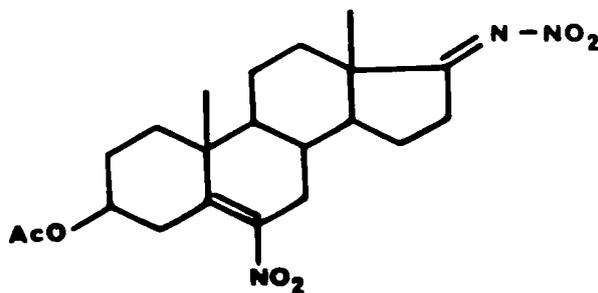


48

Nous avons donc tenté sur l'oxime 21c la nitration en position 6 de la double liaison Δ^5 . Cette réaction, fortement colorée en vert, ne conduit pas à l'oxime 48 mais à deux produits nitrés en position 6 et identifiés à la cétone 49 (IR et RMN) et à la nitrimine 50 .



49



50

La structure du produit 50 a été établie à partir des données de l'analyse élémentaire et de l'étude des spectres IR et de RMN. La présence de la nitrimine en 17 est caractérisée par l'existence en IR des bandes à 1680 cm^{-1} (C = N) , 1580 cm^{-1} (NO₂) (67)(68) . Elle est confirmée en RMN par le déplacement chimique du méthyle 18 à 1,08 ppm (69)

et l'absence de tout autre proton déblindé (mis à part le proton en 3).

La cétone 49 provient de l'hydrolyse de l'oxime ou de la nitrimine 50 (70). Il est intéressant de noter que la cétone en 17 n'est pas stable dans les conditions habituelles (et employées ici) de la nitration de la double liaison. En effet, la nitration de l'acétoxy-3 β ceto-17 androstène-5 ne conduit pas à la cétone 49 mais à un très grand nombre de produits non identifiés.

A partir de la cétone 49 l'obtention de la diamine cherchée 47 est possible par la voie habituelle (figure 20). Les réductions de l'oxime et du groupement nitro sont effectuées en même temps par hydrogénation catalytique; elles conduisent à la diamine 47 cherchée.

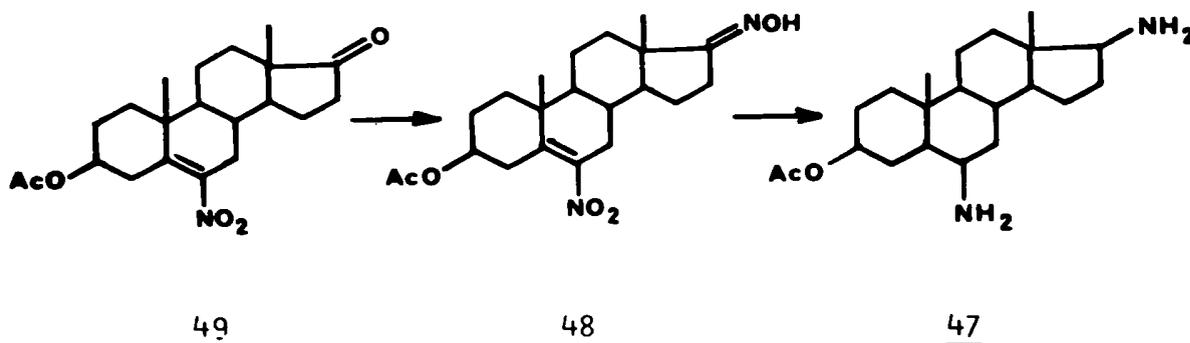


Figure 20

Pour appliquer le schéma ci-dessus au stéroïde modifié, nous avons cherché, par une autre méthode, à obtenir la cétone 49 et son homologue en série modifiée 52 avec un rendement plus important (71). Pour cela nous avons protégé la fonction cétone avant la nitration en position 6. Cette série de réactions est décrite dans le paragraphe suivant.

Synthèse de la diamine 42 après protection de la cétone en 17

Le schéma de la synthèse est décrit sur la figure 21.

La cétone 10 est transformée en cyanhydrine 51 (72). La

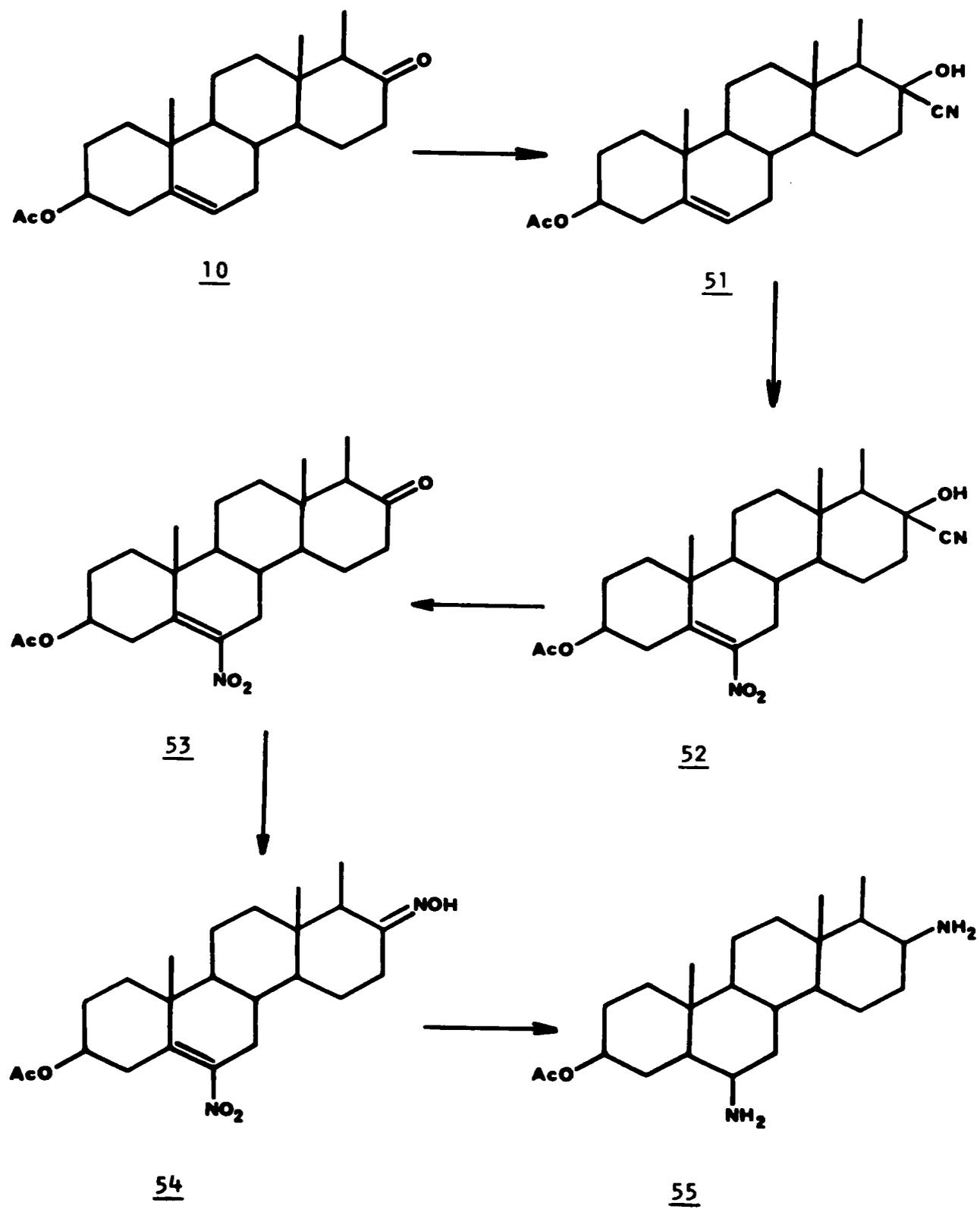


Figure 21

nitration de la double liaison de ce produit est possible. Cependant, nous n'avons pas isolé la cyanhydrine 52 car la nitro-cétone 53 est toujours présente dans le produit de la réaction. La cétone 53 est totalement régénérée par chauffage de la cyanhydrine 52 en présence de pyridine ⁽⁷³⁾.

Remarque : la mise au point de cette synthèse a été faite sur le stéréoisomère non modifié, ce qui nous a permis d'obtenir la cétone 49 et de confirmer sa structure.

B - SYNTHÈSE L'AMINO-6 β CONANINE

Le produit de départ est la conessine 55, la nitration de la double liaison conduit au produit 56. Une dégradation de HOFMANN sélective de la nitro-6 conessine 56 conduit à la nitro-6 conadiénine-3,5 57 qui est hydrogénée catalytiquement en diamine 43 (figure 22).

Remarque sur la préparation de la nitro-6 conadiénine-3,5

La désamination en position 3 de la conessine a déjà été faite soit par une dégradation de COPE ⁽⁷⁴⁾, soit par une méthode beaucoup plus longue en trois étapes : la fonction amine tertiaire étant tout d'abord déméthylée en amine secondaire par la méthode de VON BRAUN ⁽⁷⁵⁾, puis une désamination oxydative du produit formé permet d'obtenir la cétone en 3 qui est ensuite éliminée par réduction de WOLFF-KISCHNER. Les rendements obtenus par ces deux méthodes étant très faibles, nous avons envisagé une dégradation sélective de HOFMANN.

Dans notre cas, cette dégradation a été possible en utilisant le benzène comme solvant. La nitro-6 conessine 56 y est soluble et l'iodométhylate formé au cours de la dégradation insoluble. Lorsque la nitro-6 conessine 56 est mise en présence de quantités stoechiométriques d'iodure de méthyle, l'iodométhylate en 3 qui se forme préférentiellement précipite et on obtient ainsi le sel de l'amine quaternaire en 3 avec une gran-

de sélectivité.

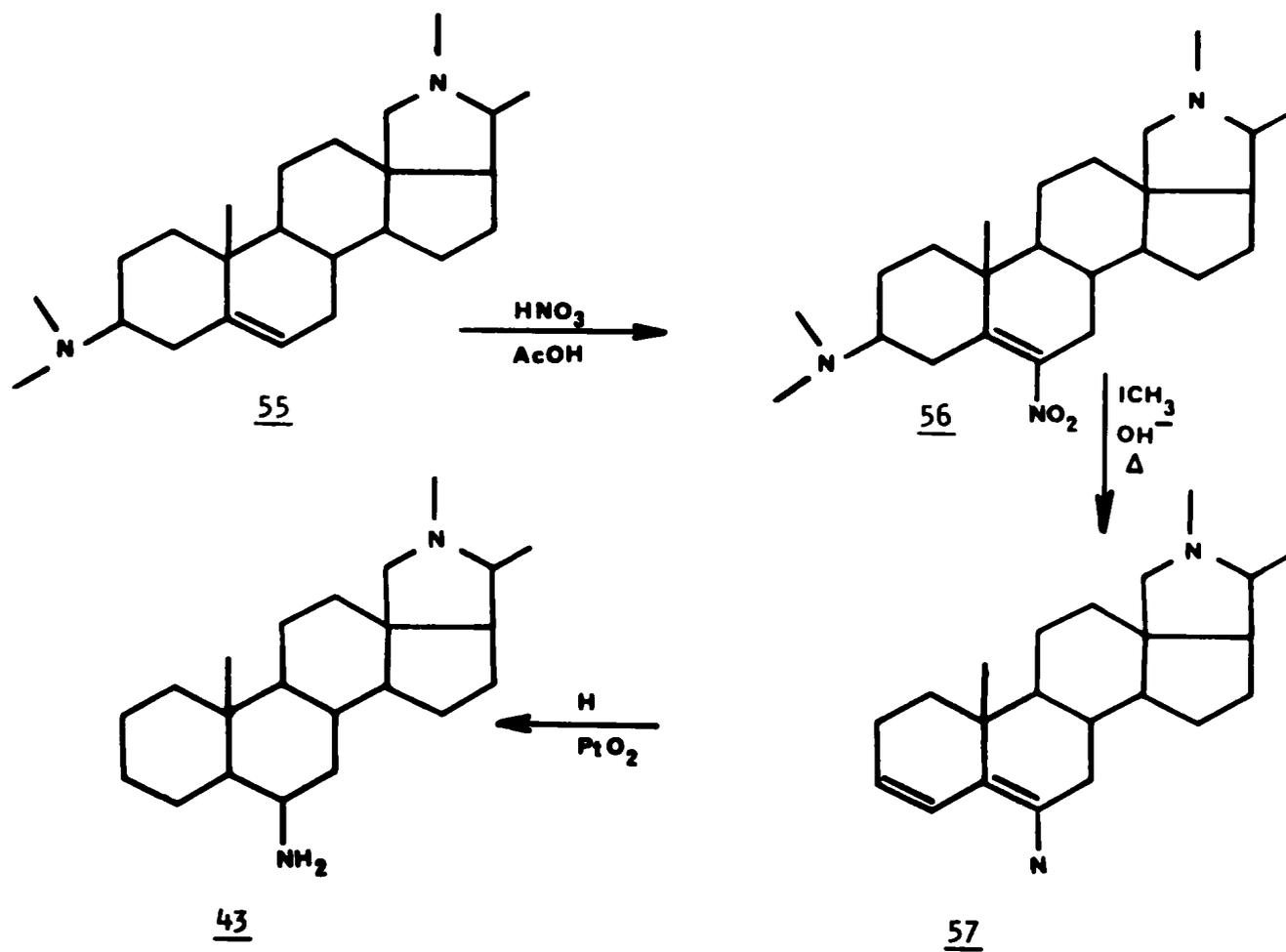
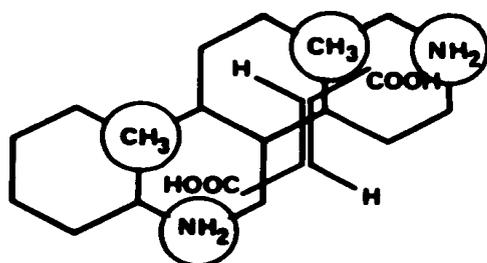


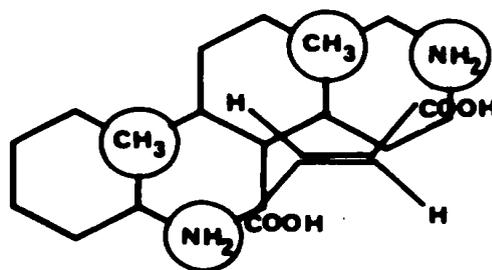
Figure 22

II - DEUTERIATION DE L'ACIDE FUMARIQUE EN PRESENCE DE CATALYSEUR BIFONCTIONNEL

Des deux complexes chiraux susceptibles de se former au cours du rapprochement du diamino-stéroïde 3 et de l'acide fumarique, l'un est plus favorisé que l'autre par des interactions stériques plus faibles (notamment au niveau des interactions avec le méthyl 18). La figure 23 rend compte de ces hypothèses.



I



II

Figure 23

Dans le complexe I la double liaison de l'acide fumarique vient se placer parallèlement à la liaison $C_{13} - C_{14}$ du stéroïde. Cette position crée une interaction importante entre le carbone éthylénique de l'acide fumarique et le méthyle 18 du stéroïde. Cette interaction disparaît lorsque l'acide fumarique approche les diamines par son autre face (complexe II). Dans ce cas le carbone éthylénique est plus éloigné du méthyle 18 et l'interaction est moindre.

La deutérioration du complexe II formé préférentiellement devrait donc conduire à l'acide succinique dideutérioré 2-2'(S-S). Le pouvoir rotatoire spécifique de cet acide succinique actif est connu ⁽⁷⁶⁾, il vaut $+17^\circ$ à 230 nm. Il sera donc possible de vérifier la formation d'un composé optiquement actif et d'en calculer le rendement.

Dans le cas de l'amino-6 β conanine 43, les distances entre les fonctions amines ainsi que l'environnement de ces fonctions ne sont pas les mêmes que dans la diamine 3. Des deutériorations de l'acide fumarique ont été tentées en présence de la diamine 43 pour vérifier si la formation stéréospécifique d'un complexe était possible.

EXPERIENCES ET RESULTATS

Les conditions expérimentales favorables à la formation du complexe diamine-diacide sont difficiles à réaliser étant donné la faible solubilité des produits dans les solvants peu polaires susceptibles de favoriser les interactions entre l'amine et l'acide.

Nous décrivons ci-dessous les différents essais réalisés sur la diamine 3.

Deutérioration en présence de catalyseur hétérogène

L'échange de protons mobiles étant possible au cours de la réaction de deutérioration, l'acide fumarique est cristallisé dans l'eau lourde afin d'échanger les protons acides. De même le chauffage de la diamine dans le dioxanne et en présence d'eau lourde permet l'échange des protons

aminés.

La deutériation de l'acide fumarique en présence de quantités stoechiométriques de diamine est faite dans le mélange dioxanne - eau lourde (10/3). Le catalyseur de deutériation est le palladium sur charbon. Après filtration et extraction, l'acide succinique récupéré est purifié par sublimation. Il présente une courbe de dispersion rotatoire plate.

Ce résultat n'est pas étonnant, car en catalyse hétérogène il y a possibilité d'adsorption du diamino-stéroïde sur la surface du catalyseur, ce qui gêne la formation du complexe. Nous ne pouvons donc pas conclure à une inefficacité de l'amine.

Deutériation en présence de catalyseur soluble

Le diamino-stéroïde 3 et l'acide fumarique sont traités comme précédemment en présence d'eau lourde. Des quantités stoechiométriques de ces deux produits sont deutériées en présence de tris(triphénylphosphine) chlororhodium dans un mélange 1/1 d'éthanol et de benzène. L'acide succinique dideutééré 2-2' (spectre de masse) isolé ne présente aucun pouvoir rotatoire.

Les mêmes expériences répétées sur le diamine 43 ne donnent pas de résultats plus intéressants.

Il est possible que la présence d'éthanol, solvant polaire, défavorise la formation du complexe diamine-diacide.

Devant les résultats négatifs de ces différentes deutériations, nous avons tenté de mettre en évidence la formation éventuelle du complexe entre la diamine 42 et l'acide fumarique par RMN. Les spectres ont été enregistrés dans l'acétone d_6 et dans le diméthylsulfoxyde d_6 . On n'observe aucun changement des déplacements chimiques ni des méthyles ni des protons éthyléniques de l'acide fumarique.

Toutefois, il a été montré qu'une interaction favorable est possible sur un squelette stéroïde possédant les deux fonctions amines sous forme de chlorhydrate ⁽¹⁸⁾. Devant l'impossibilité dans notre cas de réaliser les expériences de deutériations dans un solvant non polaire, il

semble que le seul moyen d'accéder à ces complexes soit, en s'inspirant de ces travaux, de les réaliser en milieu très polaire, après avoir formé le sel quaternaire de la diamine.

- Les courbes de dichroïsme circulaire ont été enregistrées, le produit étant en solution dans le dioxanne, sur un dichrographe ROUSSELL-JOUAN CD-185.

- Les chromatographies sur couche mince (ccm) préparatives ont été faites sur plaques de gel de silice fluorescente MERCK (20% G et 80% H) imprégné d'environ 7% de AgNO_3 .

- Les chromatographies sur couche mince (ccm) préparatives ont été faites sur plaques de gel de silice fluorescente MERCK non imprégnés au nitrate d'argent, sauf indication contraire.

- Pour les chromatographies sur colonne, nous avons utilisé le gel de silice MERCK (0,063 - 0,200 mm). L'éluant était un mélange d'éther de pétrole (EP) (fraction entre $PE = 45^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C}$) et d'éther éthylique (E).

- Les microanalyses ont été effectuées par le Laboratoire Central de Microanalyses du CNRS à Gif-sur-Yvette.

CHAPITRE I

Ethynyl-17 α dihydroxy-3 β ,17 β androstène-5 6a

L'acétylure de potassium est préparé par dissolution de 12 g de potassium dans 600 ml d'ammoniac liquide. On fait barboter l'acétylène gazeux et sec dans la solution pendant une heure (au bout d'une demi-heure la couleur bleue disparaît). La solution étant agitée, 150 ml de pyridine sèche sont alors ajoutés goutte à goutte, puis 30 g d'androsténolone dans 210 ml de pyridine sèche sont additionnés pendant une heure. La température étant maintenue en dessous de -30°C , on continue à faire barboter l'acétylène tout en maintenant l'agitation pendant quatre heures. On laisse revenir la solution très lentement (pendant douze heures) à température ambiante. Quelques morceaux de carboglace et quelques ml d'eau sont ajoutés avec précaution puis le mélange est versé dans 4 l d'eau.

Après filtration on obtient 28 g de cristaux blancs qui sont recristallisés dans le méthanol.

Rdt = 86%

F = 240°C - 242°C (MeOH) (litt. (77) 238°C - 240°C)

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -120° (C = 0,8) (litt. (77) -123°)

IR (CCl_4) : 3290 (ν_{CH} $\text{C}\equiv\text{CH}$)

RMN (CDCl_3) : 0,85 (s, CH_3 -18)

1,02 (s, CH_3 -19)

2,05 (s, $\text{C}\equiv\text{CH}$)

Diacetoxy-3 β ,17 β éthynyl-17 α androstène-5 6b

Préparé selon (24).

Rdt = 74%

F = 166°C-168°C (MeOH)

IR (CCl₄) : 3310 (ν_{CH} C \equiv CH)
1750 et 1735 ($\nu_{\text{C=O}}$ acétates)

RMN (CDCl₃) : 0,875 (s, CH₃-18)
1,04 (s, CH₃-19)
2,6 (s, C \equiv CH)

Acétyl-17 α diacétoxy-3 β ,17 β androstène-5 7

Préparé selon (24).

Rdt = 80%

F = 190°C-192°C (acétone)

IR (CCl₄) : 1735 ($\nu_{\text{C=O}}$ acétates)
1715 ($\nu_{\text{C=O}}$ cétone)

RMN (CDCl₃) : 1,03 (s, CH₃-18)
1,03 (s, CH₃-19)
2,04, 2,07 et 2,13 (3 s, CH₃-CO)

Dihydroxy-3 β ,17 α cétone-17 méthyl-17 $\alpha\beta$ D-homo androstène-5 8

Une solution de 1,2 g d'acétyl-17 α diacétoxy-3 β ,17 β androstène-5 7 dans 50 ml de potasse méthanolique à 3% est chauffée à reflux sous azote. Le produit 8 attendu précipite presque instantanément. Au bout d'un quart d'heure la solution est refroidie, et neutralisée par de l'acide acétique. Après addition de 100 ml de méthanol la solution est évaporée à sec sous vide. 200 ml d'eau sont ajoutés au produit obtenu.

nu qui est alors filtré sur büchner. Le produit brut est recristallisé du méthanol, on obtient 0,65 g de produit pur.

Rdt = 70%

F = 303°C-305°C (litt. (78) 302,5°C)

IR (KBr) : 3450 et 3380 ($\nu_{\text{O-H}}$)
1700 ($\nu_{\text{C=O}}$)

RMN ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) : 0,70 (s, CH_3 -18)
0,90 (s, CH_3 -19)
1,425 (s, CH_3 -20)

Acétoxy-3 β hydroxy-17 α ceto-17 méthyl-17 α β D-homo androstène-5 9

L'acétylation du produit 8 (anhydride acétique, pyridine à froid pendant quatorze heures) conduit au produit 9.

Rdt = 95%

F = 277°C-279°C (MeOH)

IR (C_2Cl_4) : 3600 et 3500 ($\nu_{\text{O-H}}$)
1735 ($\nu_{\text{C=O}}$ acétate)
1720 ($\nu_{\text{C=O}}$)

DC : $\lambda = 303 \text{ nm}$, $\Delta\epsilon = -1,15$

RMN (CDCl_3) : 0,715 (s, CH_3 -18)
1,00 (s, CH_3 -19)
1,20 (s, CH_3 -20)
1,96 (s, CH_3 -C-O-)
 $\begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array}$

($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) : 0,72 (s, CH_3 -18)
0,92 (s, CH_3 -19)
1,45 (s, CH_3 -20)
1,99 (s, CH_3 -C-O-)
 $\begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array}$

Acétoxy-3 β cétone-17 méthyl-17 α β D-homo androstène-5 10 : réaction du produit 9 en présence de zinc et d'acide acétique à reflux

a) durée du reflux vingt quatre heures (29)

2 g de céto 9 sont dissous dans 1 l d'acide acétique, on ajoute 200 g de zinc en poudre fine et on porte la suspension à reflux pendant vingt quatre heures. Puis la solution est filtrée (le zinc est généralement amassé au fond du ballon) et évaporée sous vide. Le produit obtenu est dissous dans le chlorure de méthylène et lavé jusqu'à neutralité par une solution de bicarbonate de sodium.

Après chromatographie sur colonne de silice on obtient 0,40 g de cétone 10 (Rdt = 20%) et 1,30 g de produit 11. La manipulation est difficile à suivre par les prélèvements et chromatographie en couche mince car les R_f des produits 11 et 9 sont rigoureusement identiques ($R_f = 0,33$, éluant pentane-éther 1/1).

- Cétone 10b :

F = 178°C-179°C

$[\alpha]_D = 132^\circ$ (C = 1,2)

DC : $\lambda = 298$ nm, $\Delta\epsilon = -1,70$
 $\lambda = 291$ nm, $\Delta\epsilon = -1,85$

IR (CCl₄) : 1735 ($\nu_{C=O}$ acétate)
1715 ($\nu_{C=O}$)
1420 (ν_{CH_2} en α C=O)

RMN ¹H (CDCl₃) : 0,68 (s, CH₃-18)
0,95 (d, J=6Hz, CH₃-20)
1,02 (s, CH₃-19)

(C₅D₅N) : 0,58 (s, CH₃-18)
0,925 (s, CH₃-19)
0,98 (d, J=6Hz, CH₃-20)

RMN ¹³C (CDCl₃) : 179,18 (C₁₇) ; 170,50 (C-O) ;
139,46 (C₅) ; 122,11 (C₆) ;

(gaz protonant isobutane 417 (M+1) ;
357 et 297

b) durée du reflux huit heures

Le mode opératoire est identique au précédent mais la durée du reflux est réduite à huit heures. Dans ces conditions on obtient le rendement optimum en cétone 10 : 1,08 g (56%) et 0,49 g d'un mélange de produit de départ 9 et de produit 11 .

Tosylhydrazone de la dihydroxy-3 β ,17 β pregnanolone 13

500 mg d'hydroxy-17 α pregnanolone 12 sont ajoutés à 25 ml d'acide acétique à température ordinaire, cette suspension est agitée magnétiquement (la dissolution du produit n'est pas totale) ; 500 mg de tosylhydrazine sont ajoutés à la suspension qui est refroidie dans un bain d'eau glacée. L'agitation est maintenue pendant cinq heures, au bout d'une heure environ les produits sont totalement dissous puis très rapidement la tosylhydrazone précipite abondamment. Le mélange est versé dans 250 ml d'eau glacée, laissé une heure à 0°C, filtré, lavé et séché.

Dissous dans le chlorure de méthylène, le produit est lavé à l'eau dans une ampoule à décanter. On obtient 640 mg de produit brut qui est cristallisé dans l'acétone.

Rdt = 80%

F = 156°C-158°C (acétone)

IR (KBr) : 3200 ($\nu_{\text{N-H}}$)
1620, 1600, 820 (noyau aromatique paradi-
substitué)
1160 (ν_{SO_2})

RMN ($\text{CD}_3-\text{CO}-\text{CD}_3$): 0,25 (s, CH_3 -18)
0,78 (s, CH_3 -19)
1,77 (s, CH_3 -20)
2,27 (s, CH_3 -Ar)
7,5 (q, 4H-aromatiques)
8,75 (m, N-H)

Acétoxy-3 β cét-17 méthyl-17 $\alpha\beta$ D-homo androstane 14b et acetoxy-3 β méthyl-17 α cét-17 α D-homo androstane 15b : réaction de BAMFORD-STEVENSON sur la tosylhydrazone 13 .

Une solution N de sodium dans l'éthylène glycol (5 ml) est chauffée à 60°C sous azote, 240 mg de tosylhydrazone 13 sont alors ajoutés très rapidement. La température est élevée progressivement jusqu'à 170°C pendant trois quarts d'heure, jusqu'à ce que le dégagement gazeux cesse. La solution est refroidie, on y ajoute 20 ml d'eau et extrait à l'éther.

Après des lavages successifs (eau, HCl dilué, eau, eau saturée de NaCl) la solution étherée est séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 140 mg de produit. Une chromatographie sur couche mince de silice (éluant pentane-éther : 1/1) ainsi que le spectre de RMN indiquent la présence de deux produits. La séparation des deux produits est faite sur leurs dérivés acétylés (plaque de silice imprégnée de nitrate d'argent éluant pentane-1 éther-1) on obtient :

- Produit 14b : 67 mg

Rdt = 39%

R_F = 0,55

F = 171°C-172°C (MeOH) (litt. (29) 172°C-173°C)

[α]_D = -56° (C = 1)

IR (CCl₄) : 1735 ($\nu_{C=O}$ acétate)
1715 ($\nu_{C=O}$)
1427 (δ CH₂ en α de C=O)

RMN (CDCl₃) : 0,67 (s, CH₃-18)
0,83 (s, CH₃-19)
0,92 (d, J=7 Hz, CH₃-20)

- Produit 15b : 84 mg

Rdt = 49%

R_F = 0,65

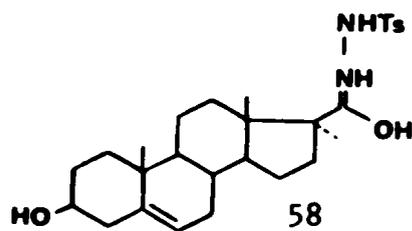
F = 170°C-171°C (MeOH) (litt. ⁽⁷⁹⁾ 169°C-171°C et
171°C,5-172°C)
(litt. ⁽⁷⁸⁾ 171°C)
(litt. ⁽³²⁾ 172°C,5-173°C)

$[\alpha]_D = -37^\circ$ (C = 1) (litt. ⁽⁷⁸⁾ -32°)

IR (CCl₄) : 1735 (ν_{C=O} acétate)
1715 (ν_{C=O})

RMN (CDCl₃) : 0,785 (s, CH₃-19)
0,92 (d, J=6 Hz, CH₃-20)
1,06 (s, CH₃-18)

Tosylhydrazone de la dihydroxy-3β,17α pregnenolone 58



Le mode opératoire est le même que celui de la préparation du produit 13. A partir de 2 g de dihydroxy-3β,17α pregnenolone on obtient 2,8 g de tosylhydrazone.

Rdt = 93%

F = 171°C (acétone)

IR (KBr) : 3200 (ν_{N-H})
1620, 1600, 820 (noyau aromatique para-
disubstitué)
1170 (ν_{SO₂})

RMN (CD₃COCD₃) : 0,27 (s, CH₃-18)
0,97 (s, CH₃-19)
1,85 (s, CH₃-20)
2,4 (s, CH₃-Ar)
5,22 (s. élargi, C=CH)
7,5 (s, 4H-aromatiques) ; 8,75 (m, NH)

(DMSO) : 0,08 (s, CH₃-18)
0,83 (s, CH₃-19)
1,68 (s, CH₃-20)

Hydroxy-3 β c \acute{e} to-17 m \acute{e} thyl-17 α β D-homo androst \acute{e} ne-5 10 et hydroxy-3 β m \acute{e} thyl-17 α c \acute{e} to-17 α D-homo androst \acute{e} ne-5 16 : r \acute{e} action de BAMFORD-STEVENSON sur la tosylhydrazone 58 .

Le mode op \acute{e} ratoire est identique \grave{a} celui de la page 97 (produits 14 et 15). A partir de 1 g de tosylhydrazone on obtient 0,57 g du m \acute{e} lange des alcools 10a et 16a . Dans deux s \acute{e} ries d'exp \acute{e} riences ces alcools ont \acute{e} t \acute{e} s \acute{e} par \acute{e} s soit sous forme d'ac \acute{e} tate, soit sous forme d' \acute{e} ther de t \acute{e} tراهydropyrannyle.

- D \acute{e} riv \acute{e} s ac \acute{e} tyl \acute{e} s 10b et 16b

0,57 g du m \acute{e} lange d'alcools est ac \acute{e} tyl \acute{e} \grave{a} froid. On obtient apr \acute{e} s s \acute{e} paration sur plaque de silice fluorescente* (\acute{e} luant pentane- \acute{e} ther 2/1) les d \acute{e} riv \acute{e} s 10b et 16b purs.

- d \acute{e} riv \acute{e} 10b

0,30 g (identique \grave{a} l' \acute{e} chantillon pr \acute{e} par \acute{e} par l'autre m \acute{e} thode page 94).

Rdt = 42% \grave{a} partir de la tosylhydrazone

- d \acute{e} riv \acute{e} 16b

0,25 g.

Rdt = 35% \grave{a} partir de la tosylhydrazone

* lorsque la manipulation est effectu \acute{e} e sur de plus grosses quantit \acute{e} s (6 g par exemple) la s \acute{e} paration des produits est possible sur colonne de silice \acute{e} luant pentane- \acute{e} ther : 2/1.

F = 189°C-191°C (3 crist. MeOH)

$[\alpha]_D = -134^\circ$ (C = 0,8)

IR (CCl₄) : 1735 (ν_{C=O} acétate)
1715 (ν_{C=O})

RMN ¹H (CDCl₃) : 1,06 (s, CH₃-18)
0,92 (d, J=6 Hz, CH₃-20)
0,98 (s, CH₃-19)

RMN ¹³C (CDCl₃) : 217,01 (C_{17a}) ; 170,37 (C-O) ;
139,53 (C₅) ; 122,01 (C₆) ;
73,75 (C₃) ; 39,51 (C₁₇) ;
19,22 (C₁₉) ; 14,98 (C₁₈) ;
16,87 (CH₃ en 17)

Analyse : C₂₃H₃₄O₃

| | | |
|---------|---------|--------|
| Calc. % | C 77,05 | H 9,56 |
| Tr. | 77,03 | 9,58 |

- Dérivés tétrahydropyrannylés 10c et 16c

0,5 g du mélange d'alcools 10a et 16a sont partiellement dissous dans 2,5 ml de dihydropyranne fraîchement distillé sur sodium ; on ajoute deux gouttes d'acide chlorhydrique fumant et la manipulation est agitée pendant seize heures. La solution est extraite à l'éther, lavée à l'eau et à l'aide d'une solution de bicarbonate de sodium, puis évaporée sous vide. Le mélange de produits obtenus est souillé de dihydropyranne. Une chromatographie sur plaque de silice imprégnée de nitrate d'argent* (deux éluions au pentane-éther : 2/1) permet d'obtenir les dérivés 10c (R_F = 0,60) et 16c (R_F = 0,75) purs.

*lorsque la manipulation est effectuée sur de plus grosses quantités (6 g par exemple) la séparation des produits est possible sur colonne de silice éluant pentane-éther : 2/1).

- dérivé 10c

0,29 g.

Rdt = 42% à partir de la tosylhydrazone

F = 149°C-152,5°C (2 crist. MeOH)

$[\alpha]_D = -110^\circ$ (C = 1)

RMN (CDCl₃) : 0,72 (s, CH₃-18)
1,06 (s, CH₃-19)
0,97 (d, J=6 Hz, CH₃-20)

Analyse : C₂₆H₄₀O₃

| | | |
|---------|---------|---------|
| Calc. % | C 77,95 | H 10,07 |
| Tr. | 77,63 | 9,98 |

- dérivé 16c

0,26 g.

Rdt = 35% à partir de la tosylhydrazone

F = 156°C-159,5°C (2 crist. MeOH)

$[\alpha]_D = -121^\circ$ (C = 0,8)

RMN (CDCl₃) : 1,13 (s, CH₃-18)
1,02 (s, CH₃-19)
1,00 (d, J=6 Hz, CH₃-20)

Analyse : C₂₆H₄₀O₃

| | | |
|---------|---------|---------|
| Calc. % | C 77,95 | H 10,07 |
| Tr. | 78,25 | 9,95 |

Préparation des oximes et O-méthyl oximes 17 et 18

Les oximes (O-méthyl) peuvent être préparées par deux méthodes :

Première Méthode : lorsque le substituant qui bloque la fonction alcool en 3 est un acétate, l'oxime (O-méthyl oxime) est facilement préparée par dissolution de 2 mmoles de cétone dans 50 ml d'éthanol et 8 ml de pyridine auxquels on ajoute 4 mmoles de chlorhydrate d'hydroxylamine (de O-méthylhydroxylamine). Ce mélange est chauffé à reflux pendant six heures jusqu'à disparition totale du produit de départ. Refroidie puis versée dans l'eau, la solution est filtrée, le produit obtenu est lavé abondamment à l'eau et recristallisé du méthanol.

- Oxime 17b

Rdt = 80%

F = 247°C-249°C (3 crist. MeOH)

IR (CCl₄) : 3610 et 3300 (ν_{OH} libre et lié)
1735 (ν_{C=O} acétate)
1140 (ν_{O-H})
1035 (ν_{N-O})

RMN (CDCl₃) : 0,70 (s, CH₃-18)
1,02 (d, J=7 Hz, CH₃-20)
1,00 (s, CH₃-19)

- O-méthyl oxime 18b

Rdt = 80%

F = 170°C-172°C (3 crist. MeOH)

IR (CCl₄) : 1735 (ν_{C=O} acétate)
1035 (ν_{N-O})

RMN (CDCl₃) : 0,68 (s, CH₃-18)
1,00 (s, CH₃-19)
1,00 (d, J=7 Hz, CH₃-20)
3,82 (s, O-CH₃)

Deuxième Méthode : lorsque l'alcool en 3 est bloqué par un éther de tétrahydropyrannyle l'utilisation de la méthode précédente conduit à un mélange de O-méthyl oximes 18a et 18c (l'alcool en 3 est partiellement débloqué). On obtient le produit 18c pur avec 80% de rendement en dissolvant 1 g de cétone 10c dans 20 ml de méthanol et en ajoutant une solution aqueuse à 10% de chlorhydrate de O-méthyl hydroxylamine 2N. La solution est chauffée pendant six heures à 70°C. Après refroidissement le produit cherché chute abondamment il est laissé vingt quatre heures au frigidaire, filtré et cristallisé du méthanol.

- Dérivé 18c

Rdt = 80%

$[\alpha]_D = -49^\circ$ (C = 1)

RMN (CDCl₃) : 0,68 (s, CH₃-18)
0,99 (s, CH₃-19)
1,00 (s, CH₃-20)
3,85 (s, CH₃-O)

Analyse : C₂₇H₄₃O₃N

| | | | |
|---------|---------|---------|--------|
| Calc. % | C 75,48 | H 10,09 | N 3,26 |
| Tr. | 75,86 | 10,09 | 3,42 |

Préparation de l'amine axiale en 17β : produits 4a et 4b

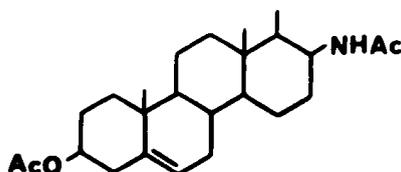
Première Méthode : selon ⁽²⁴⁾, la réduction de l'acétoxy-3β oximo-17 méthyl-17α D-homoandrostène-5 17b conduit à un produit brut difficilement séparable des sels minéraux formés au cours de l'hydrolyse de l'hydrure. Le produit brut de la réaction est difficile à analyser. Il est essentiellement composé de sels minéraux, d'amine 4a recherchée et d'oxime 17a. Une chromatographie préparative permet d'isoler l'oxime 17a mais on récupère très peu d'amine 4a qui reste adsorbée sur la silice ou le florisol. Les spectres IR et de RMN du mélange ne permettent pas de doser la quantité d'amine présente dans la solution. En effet, les positions des signaux correspondant aux méthyles sur le

spectre de RMN ne sont pas nettement distincts (voir tableau II, page 30). De même les spectres IR ne donnent pas de bandes caractéristiques permettant un dosage.

Pour analyser le mélange nous prélevons un échantillon de 100 mg du produit brut que nous acétylons. Une chromatographie sur plaque de silice imprégnée de nitrate d'argent (éluant éther) permet d'isoler trois produits.

- à $R_F = 0,25$

41 mg d'amine acétylée



$F = 218^{\circ}\text{C}-219^{\circ}\text{C}$ (3 crist. MeOH)

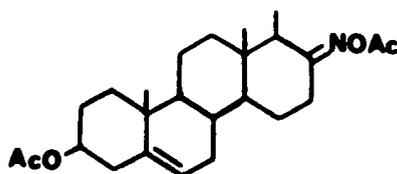
IR (CCl_4) : 3480 ($\nu_{\text{N-H}}$)
 1735 ($\nu_{\text{C=O}}$ acétate)
 1680 ($\nu_{\text{C=O}}$ acétamide)

RMN (CDCl_3) : 0,82 (s, CH_3 -18)
 0,875 (s, CH_3 -20)
 0,98 (s, CH_3 -19)
 1,96 et 1,99 (2s, CH_3 -C)
 5,65 (m, NH)

La régénération de l'amine 4a à partir de son acétamide est difficile et ne conduit pas à un produit propre et facilement récupérable.

- à $R_F = 0,75$

33 mg d'oxime acétylée



IR (CCl_4) : pas de bande NH ; 1770 ($\nu_{\text{C=O}=\text{N-O-C-CH}_3}$) ;
 1735 ($\nu_{\text{C=O}}$ acétate)

RMN (CDCl₃) : 0,70 (s, CH₃-18)
0,975 (s, CH₃-19)
1,08 (d, CH₃-20)

- à R = 0,60

24 mg d'un produit non identifié qui possède les caractéristiques suivantes

F = 152°C-154°C (3 crist. MeOH)

IR (CCl₄) : 3640, 3450 (bande large), 1740, 1700

RMN (CDCl₃) : 0,82, 0,95, 2, 2,25 (4s, CH₃)
4,5 (m, H-3)
5,3 (m, H-6 oléfinique)

Deuxième Méthode : le meilleur rendement en amino-17β méthyl-17αβ D-homo androstène-5 4 est obtenu selon le mode opératoire suivant. 1 g de O-méthyl oxime 18b est dissous dans 550 ml de diméthoxyéthane et chauffé à reflux. 4 g d'hydrure de lithium et d'aluminium sont alors ajoutés par portions pendant neuf heures. Le chauffage est maintenu en tout pendant vingt quatre heures. Après refroidissement, on ajoute avec précaution de l'eau jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de réaction violente. La solution est filtrée et le filtrat abondamment lavé avec du diméthoxyéthane chaud. Le filtrat recueilli est encore souillé de sels minéraux mais il ne reste aucune trace de produit de départ. La purification de l'amine obtenue est possible par l'intermédiaire de la formation de son chlorhydrate ou par cristallisation dans l'éther.

- Chlorhydrate de l'amine 4a

280 mg de filtrat obtenu précédemment sont dissous dans 5 ml de méthanol, on ajoute 5 gouttes d'acide chlorhydrique concentré, puis peu à peu de l'éther (environ 40 ml). Un produit chute. Il est filtré après avoir été laissé quinze heures à 0°C. On obtient 140 mg de chlorhydrate pur.

F > 250°C (décomposition)

IR (KBr) : 3350 (ν_{OH} et $\nu_{\text{NH}_3^+}$ très large bande)
1620 ($\delta_{\text{as NH}_3^+}$)
1510 ($\nu_{\text{s NH}_3^+}$)
1050 ($\nu_{\text{C-O}}$)

Analyse : $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O N Cl}$

Calc. % C 71,26 H 10,25
70,98 10,01

- Amine 4a

Rdt = 45%

F = 177°C-179°C (3 crist. éther)

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -82° (C = 1,5)

IR (CHCl_3) : 3600 (ν_{OH} libre)
3500 - 3100 (ν_{OH} et ν_{NH_2} liés)
1660 (δ_{NH_2}) ; 1100 ($\nu_{\text{C-N}}$) ;
1050 ($\nu_{\text{C-O}}$)

RMN (CDCl_3) : 0,95 (s, CH_3 -18)
enregistré à 0,99 (s, CH_3 -19)
240 M_c 0,96 (d, J= CH_3 , CH_3 -20)
(C_6D_6) : 0,92 (d, J=6 Hz, CH_3 -20)
0,96 (s, CH_3 -18)
1,07 (s, CH_3 -19)

- Amine 4c

(alcool bloqué sous forme d'éther de tétrahydropyrannyle)

Rdt = 85%

F = 120°C-123°C (3 crist. acétone)

IR (CHCl_3) : 3500 - 3150 (ν_{NH_2} lié large bande)

RMN (CDCl₃) : 0,95 (s, CH₃-18)
0,96 (d, J=6 Hz, CH₃-20)
1,00 (s, CH₃-19)

Analyse : C₂₆H₄₃O₂N

| | | | |
|---------|---------|---------|--------|
| Calc. % | C 77,75 | H 10,79 | N 3,49 |
| Tr. | 78,10 | 10,91 | 3,46 |

Tétrahydropyrannyloxy-3β androsténone 20b

A une suspension de 10 g d'alcool dans 40 ml de dihydropyrane on ajoute deux gouttes d'acide chlorhydrique concentré et on agite vigoureusement. Au bout de cinq minutes le stéroïde est dissous. On laisse la solution quinze heures à température ambiante. Le produit chute abondamment. Il est dissous dans l'éther et lavé par une solution de bicarbonate de sodium, puis à l'eau. Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation. Le produit obtenu est cristallisé du méthanol (F = 191°C-193°C).

Rdt = 80%

F = 192°C-194°C (3 crist. acétone)

RMN (CDCl₃) : 0,88 (s, CH₃-18)
1,03 (s, CH₃-19)
3,8 (m, H-3)
4,7 et 3,5 (m, H en α de O du noyau tétrahydropyrannique)

Oxime 21b

3,8 g de cétone 20b sont dissous dans 100 ml de méthanol, on ajoute 8,6 ml d'une solution 2N d'acétate d'hydroxylamine (10% v/v H₂O/MeOH) fraîchement préparée. Le mélange est chauffé à reflux pendant quatre heures, puis laissé quinze heures à température ambiante. L'oxime qui précipite est filtrée et cristallisée du méthanol.

F = 154°C-156°C (3 crist. MeOH)

RMN (CDCl₃) : 0,93 (s, CH₃-18)
1,05 (s, CH₃-19)

Tétrahydropyrannyloxy-3β amino-17β androstène-5 22b

A une solution chauffée à reflux de 1,3 g d'oxime 21b dans 54 ml d'éthanol absolu on ajoute pendant une heure 6,5 g de sodium en morceaux. Le chauffage est maintenu encore pendant une heure trente et la solution est versée dans 200 ml d'eau à 50°C. Le précipité est filtré, lavé, séché et recristallisé du cyclohexane.

Rdt = 80%

F = 179°C-184°C (3 crist. cyclohexane)

RMN (CDCl₃) : 0,66 (s, CH₃-18)
1,05 (s, CH₃-19)

Analyse : C₂₄H₃₉NO₂

| | | | |
|---------|---------|---------|--------|
| Calc. % | C 77,16 | H 10,52 | N 3,75 |
| Tr. | 77,02 | 10,40 | 3,52 |

Hydroxy-3β amino-17β androstène-5 22a

Un mode opératoire identique au précédent appliqué à l'oxime de l'androsténolone conduit à l'amine 22a .

Rdt = 83%

F = 169°C-170°C (3 crist. EtOH) (litt. (25) 170°C-172°C)
(2 crist. EtOH ; 1 crist. benzène/THF).

CHAPITRE II

SYNTHESE DE LA CHAÎNE BRANCHEE EN 17 β

Hydroxy-7 heptanoate d'éthyle 31

A une solution de 71 ml d'acide sulfurique ($d = 1,84$) dans 24 ml d'eau maintenue en dessous de 15°C , on ajoute petit à petit 50 g de persulfate de potassium, puis 100 ml d'éthanol goutte à goutte en maintenant la température en dessous de 15°C . Puis, en maintenant la température à 15°C on ajoute goutte à goutte pendant une heure 10 g de cycloheptanone dans 30 ml d'éthanol. L'agitation est poursuivie à la même température pendant deux heures. La solution est versée dans 1 l d'eau, filtrée, saturée par du sulfate d'ammonium et extraite à l'éther. Après avoir détruit les peroxydes, on évapore le solvant, le produit restant (mélange d'acide et d'ester) est dissous dans 15 ml d'alcool et 1 ml d'acide sulfurique et la solution est portée à reflux pendant six heures. Après extraction à l'éther on distille sous un vide de 15 mm à une température de 139°C - 142°C , 7,2 g de produit.

Rdt = 48%

$\text{Eb}_{15} = 139^{\circ}\text{C}$ - 142°C

IR (film) : 3450 (ν_{OH} lié)
1740 ($\nu_{\text{C=O}}$ ester)
1250, 1180 ($\nu_{\text{C-O}}$)

RMN (CCl₄) : 1,25 (t, CH₃-CH₂-O)
4,12 (q, O-CH₂-CH₃)
2,3 (t. élargi, CH₂-C=O)
3,6 (t. élargi, CH₂-OH)

Hydrazide 32

1 g d'ester 31 est dissous dans 0,6 ml d'hydrazine hydratée à 98% et porté six heures à reflux au bain marie. L'hydrazide cristallise après refroidissement, il est alors filtré et recristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Rdt = 97%

F = 123°C (3 crist. AcOEt) (litt. (45) 121°C-123°C)

IR (CCl₄) : 3300 (ν_{N-H})
1740 (ν_{C=O})
1650 (δ_{NH₂})

Acide hydroxy-7 heptanoïque 33

3 g d'ester 31 sont chauffés à reflux dans 28 ml d'une solution N de soude méthanolique. Au bout de deux heures la réaction est complète. La solution est versée dans 50 ml d'eau et extraite deux fois avec 35 ml d'éther. La phase aqueuse recueillie est acidifiée par un mélange d'acide chlorhydrique (2,8 ml) et de pyridine (2 ml), puis saturée par addition de NaCl, et extraite trois fois à l'aide de 70 ml d'éther. On obtient après évaporation du solvant et distillation azéotropique du benzène 2,37 g d'acide 33 pur.

IR (film) : 3400 (ν_{O-H} large bande)
2800 - 2500 (plusieurs bandes de l'acide)
1710 (ν_{C=O} acide)

RMN (CCl₄) : 2,3 (t. élargi, CH₂-C(=O)-OH)
3,58 (t. élargi, CH₂-OH)

Ether tétrahydropyrannique de l'hydroxy-7 heptanoate d'éthyle 34

A une solution de 3,2 g d'alcool 31 dans 50 ml d'éther on ajoute 15 ml de dihydropyranne et 100 mg d'acide paratoluène sulfonique. La réaction est terminée au bout d'une demi-heure. La solution est lavée, séchée et évaporée. Le produit est utilisé brut dans les manipulations ultérieures. En effet, une distillation sous vide (Eb₁₂ = 120°C-130°C) libère une partie de l'alcool bloqué. Une chromatographie permet d'isoler l'éther de tétrahydropyrannyle pur mais la saponification de cet échantillon purifié ne permet pas d'obtenir l'acide 35.

IR (film) : 1735 (ν_{C=O} ester)
1030 (ν_{C-O} éther)

RMN (CCl₄) : 1,3 (t, CH₃-CH₂-O)
2,3 (t. élargi, -CH₂-C=O)
4,15 (q, CH₃-CH₂-O)
3,5 (m, 2H en α de O du noyau tétrahydropyrannique)
4,5 (s. élargi, H du noyau tétrahydropyrannique en α de 2O)

Acide tétrahydropyrannyloxy-7 heptanoïque 35

Une manipulation identique à celle de la page 110 conduite sur 2,5 g d'ester 34 permet d'obtenir 2 g d'acide 35.

IR (film) : 3400 (ν_{O-H})
2800 - 2500 (large bande)
1710 (ν_{C=O} acide)

RMN (CCl₄) : disparition du groupement éthyle

BRANCHEMENT DE LA CHAÎNE EN 17 β : FORMATION DES AMIDES 24 ET 23

A. Méthode via l'azide

A une solution refroidie à 0°C de 0,9 g d'hydrazide 32 dans 12 ml d'eau distillée on ajoute 0,9 ml d'acide acétique et 0,44 ml d'HCl concentré, puis goutte à goutte et sous agitation magnétique, une solution de 0,5 g de nitrite de sodium dans 3 ml d'eau. L'azide blanc et huileux qui précipite est extrait à l'acétate d'éthyle à 0°C, lavé à l'eau froide, à une solution de bicarbonate de sodium à 5% et enfin à l'eau. La solution est séchée sur sulfate (IR : 2270 cm⁻¹) filtrée et ajoutée à 1 g d'amine (22a ou 4a) dissous dans 40 ml de THF à 0°C. L'agitation est poursuivie vingt quatre heures à 0°C puis deux heures à température ambiante. L'extraction est faite au chloroforme, la solution est lavée à l'acide chlorhydrique dilué, au carbonate de sodium en solution puis à l'eau. Après séchage sur sulfate et évaporation du solvant le produit obtenu est acétylé. Une chromatographie sur colonne de silice permet d'obtenir un dérivé pur (éluant AcOEt).

Il peut arriver (pour nos expériences une fois sur quatre), sans que l'on puisse en définir nettement la cause, qu'au lieu d'obtenir l'amide cherchée pratiquement pure, on obtienne un mélange (1/1) de ce produit et d'urée.

- Amide 24b

Rdt max. = 80%

F = 95°C-98°C (3 crist. éther de pétrole)

$[\alpha]_D = -74^\circ$ (C = 0,5)

IR (CCl₄) : 1680 ($\nu_{C=O}$ amide)

RMN (CDCl₃) : 0,78 (s, CH₃-18)

1,04 (s, CH₃-19)

2,05 (2s, CH₃-C)

||
O

4,00 (t. élargi, J=7 Hz, CH₂-OAc)

4,00 (m, H-17)

F = 72°C-77°C

$[\alpha]_D = -40^\circ$ (C = 0,8)

IR (CCl₄) : 1680 (ν_{C=O} amide)

RMN (CDCl₃) : 0,82 (s, CH₃-18)
 1,00 (s, CH₃-19)
 0,87 (d, J=6 Hz, CH₃-20)

Masse m/e : 529 (H⁺) ; 469 (M-(CH₃COOH))
 282 (M-60(NH₂C-(CH₂)₆-OAc))
 $\begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array}$

Analyse : C₃₂H₅₁O₅N

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 72,55 | H 9,70 | N 2,64 |
| Tr. | 72,47 | 9,45 | 2,89 |

- Urée 37

Rdt = 20%

RMN (CDCl₃) : 0,82 (s, CH₃-18)
 1,00 (s, CH₃-19)
 0,87 (d, J=7 Hz, CH₃-20)

Analyse : C₃₂H₅₂O₅N₂

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 70,55 | H 9,62 | N 5,14 |
| Tr. | 70,86 | 9,49 | 5,01 |

B. Méthode au réactif de WOODWARD

A une solution refroidie à 0°C de 1,6 g d'acide 33 dans 125 ml d'acétonitrile sec, on ajoute sous agitation magnétique 1,2 g de réactif K de WOODWARD et 1 ml de triéthylamine. Après deux heures d'agitation magnétique 1 g d'amine (22a ou 4a) est additionné et la température est maintenue à 0°C pendant quinze heures puis à 8°C pendant quarante huit heures. Après évaporation du solvant le produit est repris par du chloroforme (100 ml), lavé à l'eau (5 ml) à l'aide d'une solution normale d'acide chlorhydrique (5 ml), d'une solution saturée de bicarbonate de sodium (5 ml) puis à l'eau (5 ml). Après évaporation du solvant et chromatographie on obtient les amides (24a ou 23a) pures.

- Amide 24a

Rdt = 37% (identifiée sous forme de diacétate par comparaison à l'échantillon précédemment obtenu)

- Amide 23a

Rdt = 20% (même remarque que pour 24a)

C. Méthode via l'anhydride mixte

A une solution refroidie à 0°C de 2 g d'acide 35 dans 30 ml d'acétone on ajoute 3,5 ml de triéthylamine dans 30 ml d'acétone puis, goutte à goutte 3 ml de chloroformiate d'éthyle dissous dans 15 ml d'acétone. Une chromatographie sur plaque de silice montre la formation de l'anhydride mixte ($R_f = 0,9$ éluant éther). On ajoute alors 1,3 g d'amine (22b ou 4b) dissous dans 75 ml d'acétone. La température étant maintenue à 0°C on laisse la manipulation sous agitation magnétique pendant douze heures. On filtre le chlorhydrate de triéthylamine qui a précipité, évapore le filtrat qui, repris par le chloroforme est lavé à l'eau. Après séchage et évaporation du solvant le produit brut obtenu est chromatographié sur colonne de silice. On obtient les dérivés 24c ou 23c purs qui ne sont pas recristallisés.

- Amide 24c

Rdt = 80%

RMN ($CDCl_3$) : 0,72 (s, CH_3 -18)
1,04 (s, CH_3 -19)
3,2 - 4,1 (marge massif ; 7H adjacents à un oxygène)
4,55 et 4,68 (2s. élargis, 2H adjacents à deux oxygènes)
5,35 (m, H-6 et NH)

Analyse : $C_{36}H_{59}O_5N$

| | | | |
|---------|---------|---------|--------|
| Calc. % | C 73,80 | H 10,15 | N 2,39 |
| Tr. | 73,68 | 10,32 | 2,50 |

- Amide 23c

Rdt = 75%

| | |
|------------------|-------------------------------|
| RMN ($CDCl_3$) | : 0,82 (s, CH_3 -18) |
| | 0,99 (s, CH_3 -19) |
| | 0,875 (d, J=6 Hz, CH_3 -20) |

Analyse : $C_{38}H_{63}O_5N$

| | | | |
|---------|---------|---------|--------|
| Calc. % | C 74,34 | H 10,34 | N 2,28 |
| Tr. | 74,86 | 10,49 | 2,42 |

- régénération des alcools

500 mg de dérivés 24c ou 23c dissous dans 25 ml de méthanol sont chauffés à reflux en présence de 25 mg d'acide paratoluène sulfonique pendant une heure. Le produit est versé dans l'eau, extrait à l'éther puis lavé au bicarbonate de sodium et à l'eau. Après évaporation du solvant, les produits obtenus sont acétylés. On obtient ainsi les dérivés 24b et 23b qui sont purifiés par cristallisation.

Dérivés nitrés 26 et 25

4,5 ml d'acide nitrique fumant ($d = 1,49$) sont ajoutés (en cinq minutes) à une solution de 1,2 g de Δ -5 stéroïde (24b ou 23b) dans 45 ml d'acide acétique à température ambiante. Au bout de cinquante minutes, le produit est versé dans l'eau, filtré, dissous dans le chloroforme et lavé jusqu'à neutralité. Après chromatographie sur plaque de silice fluorescente (deux éluions AcOEt/hexane : 1/2) on obtient les dérivés nitrés purs et on récupère parfois un peu de produit de départ.

- Dérivé 26

$R_F = 0,33$ (éluant AcOEt/hexane : 1/1)

Rdt max. = 62% (à partir de 1,2 g de produit de départ)

$[\alpha]_D = -75^\circ$ (C = 1)

RMN ($CDCl_3$) : 0,72 (s, CH_3 -18)
1,15 (s, CH_3 -19)
5,5 (d. élargi, $J=10$ Hz, NH)
disparition du proton oléfinique

Analyse : $C_{30}H_{46}O_7N_2$

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 65,91 | H 8,48 | N 5,12 |
| Tr. | 65,66 | 8,77 | 5,22 |

- Dérivé 25

$R_F = 0,5$ (éluant AcOEt/hexane : 1/1)

Rdt max. = 30% (à partir de 500 mg de produit de départ ;
on récupère 200 mg de produit de départ
qui n'ont pas réagi : $R_F = 0,6$)

$[\alpha]_D = -45^\circ$ (C = 1)

RMN ($CDCl_3$) : 0,83 (s, CH_3 -18)
1,13 (s, CH_3 -19)
0,90 (d, $J=6$ Hz, CH_3 -20)
5,55 (d. élargi, $J=12$ Hz, NH)
disparition du proton oléfinique

Analyse : $C_{32}H_{50}O_7N_2$

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 66,87 | H 8,77 | N 4,87 |
| Tr. | 66,55 | 8,55 | 4,91 |

Réduction du groupement nitro en amine axiale 6 β : produits 27
et 28

440 mg de dérivé nitré (25 ou 26) sont dissous dans 10 ml d'acide acétique et hydrogénés sous une pression de 50 Kg/cm² en présence de catalyseur ADAMS (PtO₂) pendant vingt heures. Après filtration et évaporation du solvant on obtient l'amine qui est utilisée sans purification.

Branchement de la chaîne en 6 β : produits 29 et 30

A une solution à 0°C de 480 mg de N-CBz histidine dans 30 ml d'acétronitrile on ajoute 400 mg de réactif K de WOODWARD et 0,3 ml de triéthylamine. Après deux heures 400 mg d'amine sont additionnés et l'agitation poursuivie à 0°C pendant quarante huit heures. Après évaporation du solvant le produit est dissous dans le chloroforme et lavé successivement par l'eau, le bicarbonate de sodium en solution à 10% puis par l'eau. Après purification sur colonne de silice on obtient le produit cherché pur.

- Produit 30

Le produit brut est chromatographié sur une colonne de 40 g de silice (inférieur à 0,08 mm) élué successivement par des mélanges de

200 ml d'AcOEt et 4 ml de MeOH

300 ml d'AcOEt et 15 ml de MeOH

Les fractions recueillies sont de 50 ml, les fractions 6 à 15 contiennent le produit cherché pur (216 mg). $R_F = 0,58$ (2 éluations CHCl₃/MeOH : 9/1). Le produit cristallise difficilement du méthanol (56 mg sont obtenus à partir de 500 mg après 3 cristallisations successives).

Rdt = 35%

F = 96°C-98°C (3 crist. MeOH)

$[\alpha]_D = -25^\circ$ (C = 0,8)

RMN (CDCl_3) : figure 24 (page 120)

0,675 (s, CH_3 -18)

0,83 (s, CH_3 -19)

2,05 (s, 2CH_3 -C-O)
 $\begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array}$

3,00 (m, CH_2 en α imidazole)

4,00 (t. \acute{e} largi, J=6, CH_2 -OAc)

3,5 à 4,2 (2m, H-6 et H-7)

4,5 (m, H-3)

5,1 (s, -O- CH_2 - φ)

5,5 (d. \acute{e} largi, J=9, NH)

6,75 et 7,52 (2s, 2H-imidazole)

7,35 (s, 5H aromatiques)

Analyse : $\text{C}_{44}\text{H}_{63}\text{O}_8\text{N}_5$

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 66,89 | H 8,04 | N 8,86 |
| Tr. | 66,69 | 7,78 | 8,84 |

- Produit 29

Le produit brut est chromatographié sur colonne de 40 g de silice (moyenne) élué successivement par :

100 ml AcOEt

100 ml AcOEt + 1 ml MeOH

100 ml AcOEt + 2 ml MeOH

100 ml AcOEt + 5 ml MeOH

100 ml AcOEt + 20 ml MeOH

Les fractions recueillies sont de 20 ml, les fractions 14 à 20 contiennent 140 mg du produit attendu.

RMN (CDCl_3) : 0,81 (s, CH_3 -18)

0,94 (s, CH_3 -19)

0,96 (d, J=6 Hz, CH_3 -20)

Spectre de RMN du produit 30

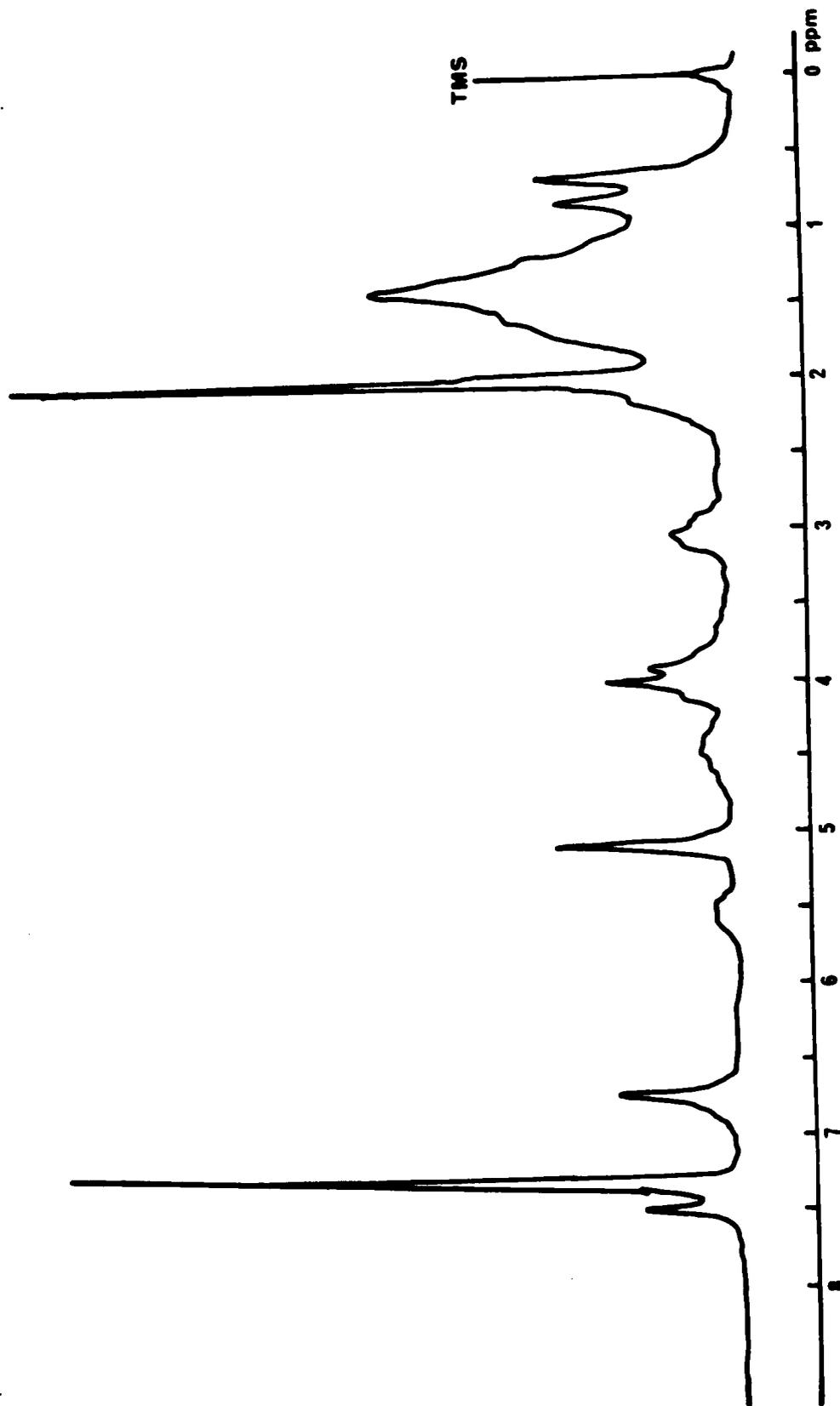


Figure 24

Analyse : $C_{46}H_{67}O_8N_5$

| | | |
|---------|---------|--------|
| Calc. % | C 67,53 | H 8,26 |
| Tr. | 67,20 | 7,94 |

- Produits 1 et 2

16 mg de produit sont laissés à température ambiante pendant une demi-heure dans 1 ml de soude méthanolique 0,5N . On ajoute alors 0,8 ml d'eau distillée puis on neutralise (pH = 7) le mélange à l'aide d'une solution N d'HCl (environ 0,5 ml). Le plus souvent un produit blanc chute*, on ajoute encore 1 ml d'eau et laisse le mélange douze heures à 8°C. Le produit recueilli est filtré, lavé abondamment à l'eau distillée, à l'éther, puis à l'eau distillée, à l'éther, puis à l'eau distillée. Les tentatives de recristallisation ont été vaines, mais le produit obtenu est pur (RMN, analyse) .

- dérivé 1

Analyse : $C_{40}H_{59}O_6N_5$

| | | |
|---------|---------|--------|
| Calc. % | C 68,05 | H 8,42 |
| Tr. | 68,24 | 7,97 |

RMN ($CDCl_3$) : disparition de $CH_3-C \begin{matrix} \text{N} \\ | \\ O \end{matrix}$

- dérivé 2

Analyse : $C_{42}H_{63}O_6N_5$

| | | |
|---------|---------|--------|
| Calc. % | C 68,73 | H 8,65 |
| Tr. | 68,41 | 9,04 |

* Si le produit ne chute pas il suffit d'évaporer un peu de méthanol .

CHAPITRE III

I - PRODUITS ET APPAREILS UTILISES

L'acétate de paranitrophényle commercial est recristallisé dans un mélange éthanol-eau, le phényl-4 butyrate de paranitrophényle* et le phényl-5 valérate de paranitrophényle* sont recristallisés dans l'éthanol

- acétate de paranitrophényle F = 77,5°C-78°C
- phényl-4 butyrate de paranitrophényle* 40 F = 37°C
- phényl-5 butyrate de paranitrophényle* 41 F = 62,5°C-63°C

Les catalyseurs A , B et C utilisés au cours des différentes réactions proviennent tous du même lot de synthèse et sont de pureté identique (cf Chapitre II).

L'isopropanol a été distillé sur sulfate de magnésium (Eb = 82°C) .

Les tampons sont obtenus par dissolution de produit dans de l'eau fraîchement distillée et bouillie. Des solutions 0,1M d'acide N-2-hydroxy éthylpipérazine-N'-2 éthane sulfonique (HEPES ⁽⁸⁰⁾, pK_a = 7,55 à 20°C) auxquelles on ajoute les quantités adéquates de soude 0,5M

* produit donné par A. DUPAIX du Laboratoire d'Enzymologie Physico-Chimique et Moléculaire à ORSAY, que nous remercions.

permettent de préparer les tampons pH = 7 , pH = 7,5 et pH-8 .

La force ionique est maintenue constante ($\mu = 0,8$) par addition de chlorure de potassium 4M .

Les faibles volumes de solution sont prélevés à l'aide de micropipettes de PEDERSEN.

Le spectrophotomètre est un CARY-118 (VARIAN) muni d'un dispositif de thermostatisation.

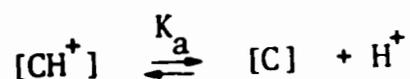
Le contrôle du pH est effectué, avant et après chaque réaction, au moyen d'un pH-mètre (ORION type 601-A) muni d'une électrode combinée (type semi-micro 91-02 ORION). La précision sur les mesures effectuées à 38°C est d'environ 0,02 unité de pH .

II - MESURE DES CONSTANTES DE DISSOCIATION DES ACIDES ET DES PHENOLS

Les constantes de dissociation ont été déterminées par dosages potentiométriques.

Le stéroïde est dosé à 38°C sous forme de chlorhydrate (addition d'HCl) ; sa concentration est de $5 \times 10^{-3} M$, dans un mélange isopropanol-eau (50% v/v), la force ionique étant ajustée à $\mu = 0,8$ par addition de chlorure de potassium. La titration est effectuée par addition de soude $5 \times 10^{-2} M$.

L'équilibre de dissociation est :

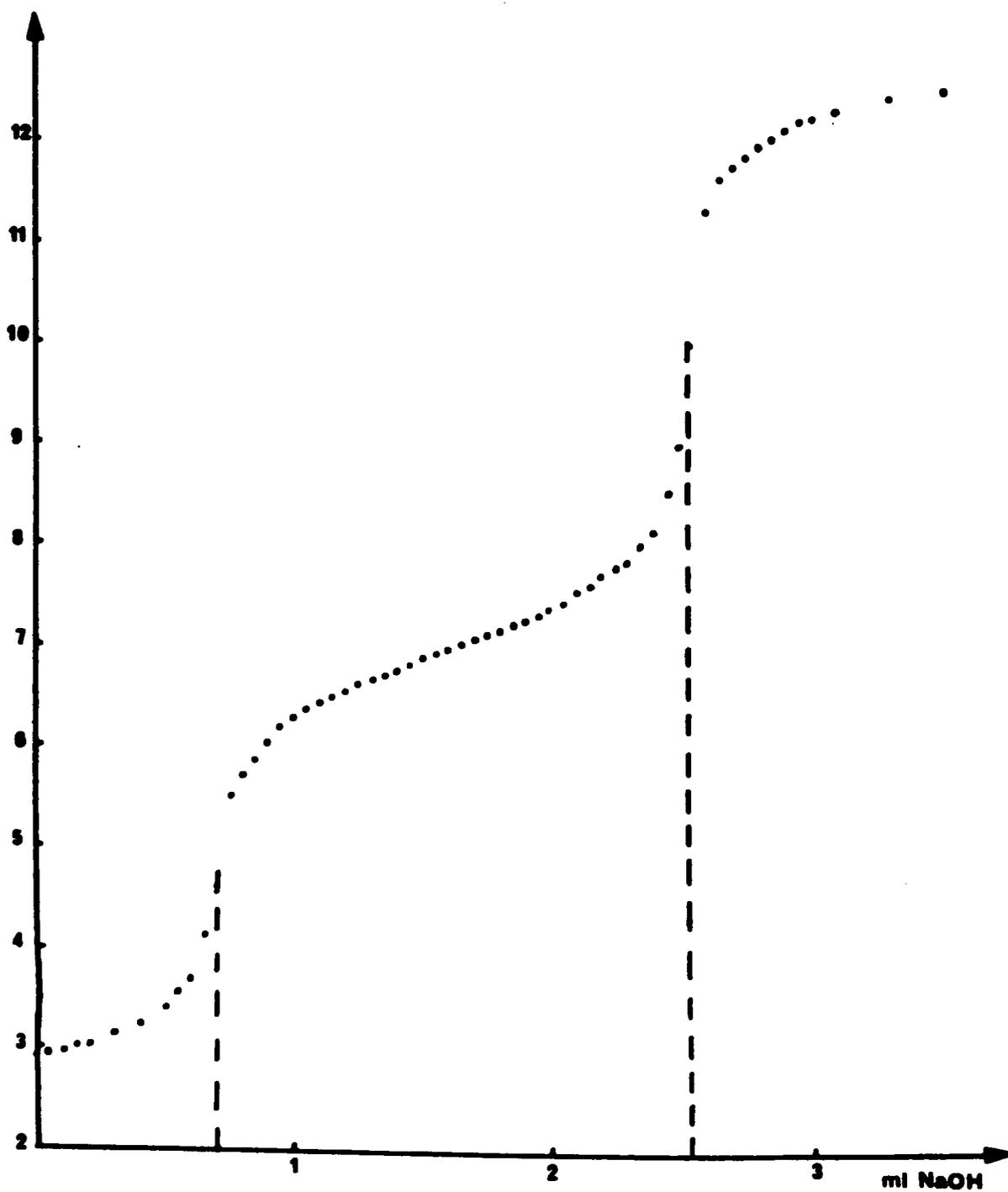


- [C] : concentration en forme libre de l'imidazole
(soit $[A]$, $[B]$, $[C]$)

- $[CH^+]$: concentration en forme protonée de l'imidazole
(soit $[A H^+]$, $[B H^+]$, $[C H^+]$).

Les pK_a sont déterminés en différents points de la courbe (figure 25 à titre d'exemple) par la relation :

Courbe de titrage du catalyseur C



addition de soude $5 \times 10^{-2} M$; $[C] = 5 \times 10^{-3} M$;
isopropanol-eau (50% v/v) ; $\mu = 0,8$; $38^{\circ}C$

Figure 25

$$pK_a = pH - \log \frac{[C]}{[CH^+]} \quad [1]$$

Les concentrations $[C]$ en forme libre de l'imidazole sont calculées à l'aide des expressions [1] et [2] :

$$[C]_t = [CH^+] + [C] \quad [2]$$

- $[C]_t$: concentration totale en catalyseur.

Ce sont des pK_a apparents déterminés dans les conditions de l'expérience, ils ne sont donc pas corrigés.

III - MESURE DES VITESSES ET TRAITEMENT DES DONNEES

Les vitesses des réactions ont été déterminées en dosant par spectrophotométrie visible le phénate libéré. On enregistre à longueur d'onde fixe la variation de la densité optique en fonction du temps.

Nous avons tout d'abord enregistré l'évolution du spectre de 480 à 240 nm en fonction du temps, au cours de l'hydrolyse de l'acétate de paranitrophényle catalysée par les stéroïdes A, B et C (figure 26 à titre d'exemple). La présence de points isobestiques montre qu'il n'y a pas de réaction parasite.

A la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de l'anion phénate (400 nm) on n'observe pas d'absorption des réactifs et des produits. On peut donc enregistrer à cette longueur d'onde la variation de la concentration en ion phénate en fonction du temps.

Cet ion est en équilibre avec le phénol correspondant

Evolution en fonction du temps du spectre d'absorption
des produits de la réaction d'hydrolyse de l'acétate de paranitrophényle
catalysée par C

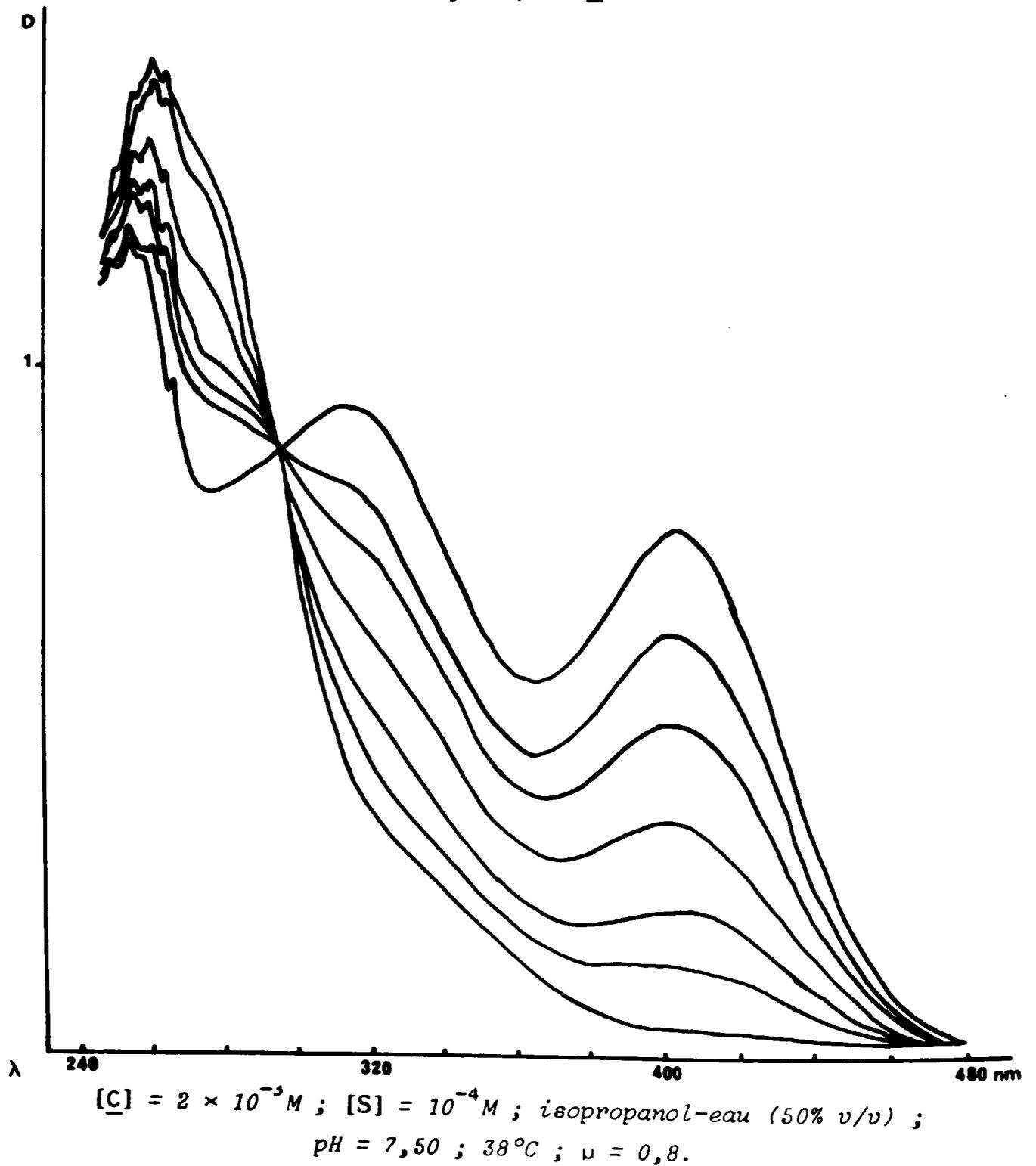
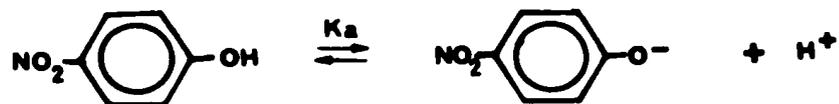


Figure 26



Le rapport des concentrations de ces composés n'est constant que si le pH ne varie pas au cours de la réaction. Nous avons vérifié, pour chacune des expériences effectuées, que les variations de pH sont inférieures à $\pm 0,02$.

Le coefficient d'extinction molaire de l'ion phénate est donc variable en fonction du pH. Il a été mesuré dans les conditions de la réaction (température, force ionique, solvant). Nous trouvons

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| $\epsilon = 5500$ | à | pH = 6,95 |
| $\epsilon = 9000$ | à | pH = 7,50 |
| $\epsilon = 13000$ | à | pH = 8,00 |

A - METHODE DES VITESSES INITIALES

Mode opératoire type

Pour chaque série d'expériences faites le même jour nous préparons un mélange de 5 ml d'une solution aqueuse de chlorure de potassium 4M, 5 ml d'une solution tampon 0,1M et 2,5 ml d'eau.

Les quantités voulues du mélange précédent (625 μl) et d'isopropanol (550 μl par exemple) sont introduites dans la cuve placée dans l'enceinte thermostatée du spectrophotomètre. Lorsque la température voulue est atteinte (38°C) 50 μl de la solution mère d'acétate de paranitrophényle (10^{-2}M) sont ajoutés. L'enregistrement de la variation de la densité optique permet de mesurer l'hydrolyse spontanée de l'acétate de paranitrophényle.

Au bout de dix minutes environ on ajoute 25 μl de la solution mère de stéroïde (10^{-2}M) et l'enregistrement de l'absorption est pour-

suivie en présence de ce catalyseur.

Dans ces conditions nous avons :

- mélange isopropanol-eau : 50% v/v
- force ionique : $\mu = 0,8$
- concentration en catalyseur : $[C] = 2 \times 10^{-4} M$
- concentration en substrat : $[S] = 4 \times 10^{-4} M$

Détermination des vitesses

Les courbes enregistrées (figure 27 à titre d'exemple) donnent la variation en fonction du temps de l'absorption (à 400 nm) due à l'apparition de l'ion phénate pour une concentration en substrat donnée.

La vitesse initiale est donnée par :

$$[1] \quad v_0 = \frac{dx}{dt} \quad \text{au temps } 0 \quad (x = \text{concentration en phénate au temps } t)$$

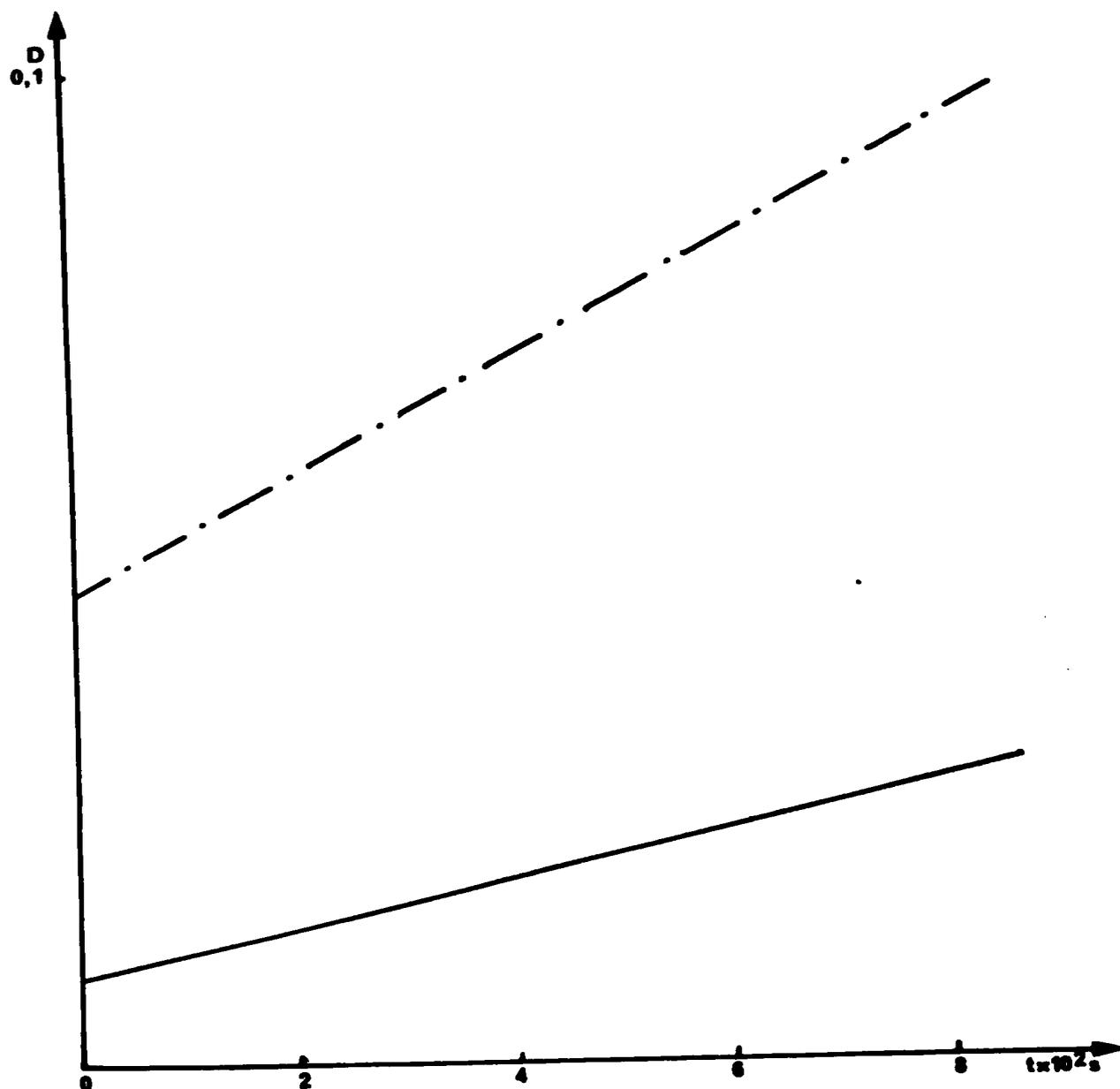
La concentration x est proportionnelle à la densité optique D :

$$[2] \quad x = \frac{D}{\epsilon} \quad \text{au pH considéré}$$

A titre d'exemple, la figure 27 donne la variation de la densité optique en fonction du temps en absence de catalyseur et en présence de catalyseur pour l'hydrolyse catalysée par $[A]$ de l'acétate de parani-trophényle. La différence des pentes des droites ainsi obtenues permet de calculer v_{cat} à partir des équations [1] et [2].

A partir des valeurs de v_{0cat} obtenue pour chacune des valeurs de S_0 , nous traçons la courbe $v_{0cat} = f(S_0)$ (cf page 58). L'erreur sur v_0 provient d'une part de l'erreur de mesure faite sur la détermination des pentes des courbes enregistrées (cette erreur estimée d'après la reproductibilité est de 7%). L'autre cause d'erreur provient de l'évaluation de ϵ (erreur estimée à 3% d'après les résultats de l'ex-

Variation en fonction du temps de la densité optique à 400 nm
au cours de l'hydrolyse de l'acétate de paranitrophényle



— hydrolyse spontanée (absence de catalyseur)
- . — hydrolyse en présence de catalyseur A : $[A] = 10^{-4} M$
pH = 7,5 ; $\mu = 0,8$; 38°C ; mélange isopropanol-eau 50% v/v) ;
 $[S_0] = 4 \times 10^{-4} M$

Figure 27

périence).

Régénération du catalyseur A

Une manipulation identique à celle décrite dans le mode opératoire type a été effectuée sur des quantités cent fois plus importantes de tous les réactifs et solvants. Au bout d'une heure alors que l'avancement de la réaction est de 18% environ, nous évaporons à température ordinaire, sous le vide de la trompe à eau, une partie de l'isopropanol, un produit chute. On ajoute alors de l'eau et filtre 9 mg de produit (quantité théorique à obtenir 13,65 mg). Le spectre de RMN de ce produit enregistré sur XL-100 VARIAN est rigoureusement identique à celui du catalyseur A de départ.

B - CINÉTIQUES EN PRÉSENCE D'UN EXCES DE CATALYSEUR

Mode opératoire type

Dans la cuve thermostatée du spectrophotomètre, nous laissons incuber un mélange de 200 μ l d'une solution de chlorure de potassium 4M, 300 μ l d'une solution tampon 0,1M, 250 μ l d'isopropanol et 200 μ l de la solution de stéroïde 10^{-2} M dans l'isopropanol. Après environ cinq minutes d'incubation 50 μ l de la solution de substrat 10^{-3} M dans l'isopropanol sont ajoutés et l'apparition de paranitrophénate enregistrée. La cuve témoin contient tous les produits à la même concentration que dans la cuve de mesure, sauf l'ester.

Dans ces conditions nous avons :

- mélange isopropanol-eau : 50% v/v
- force ionique : $\mu = 0,8$
- concentration en catalyseur : $[C] = 2 \times 10^{-3}$ M
- concentration en substrat : $[S] = 5 \times 10^{-5}$ M

Détermination des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre

La vitesse d'apparition du phénate peut être mise sous la

forme :

$$v = \frac{dx}{dt} = - \frac{d(a-x)}{dt} = k_{obs} (a-x) t$$

a est la concentration initiale en ester (ou la concentration en phénate au temps infini, soit dix temps de demi-réaction), x la concentration en phénate au temps t . Par intégration nous obtenons :

$$\ln \frac{a-x}{a} = - k_{obs} t$$

Les densités optiques D_t et D_∞ sont proportionnelles aux concentrations en phénate à l'instant t et au temps ∞ . L'équation précédente peut être mise sous la forme :

$$\ln \frac{D_\infty - D_t}{D_\infty} = k_{obs} t$$

La pente k_{obs} de la droite $\ln(D_\infty - D_t)$ en fonction du temps est calculée par la méthode des moindres carrés. L'erreur sur k_{obs} est généralement faible (indice de corrélation supérieur à 0,9998 pendant 70 à 80% de la réaction suivant la rapidité de la réaction et la quantité de catalyseur). La reproductibilité est de 5%. Cependant, il n'est pas facile de connaître avec précision la densité optique de fin de réaction, les réactions étant généralement assez lentes. C'est pourquoi nous avons mesuré le pK_a ($pK_a = 7,03$) du paranitrophénol dans les conditions de l'expérience, connaissant la valeur du coefficient d'extinction moléculaire du paranitrophénate à un pH donné, nous pouvons en déduire sa valeur aux autres pH et la comparer aux mesures effectuées. Nous avons observé pour les manipulations les plus lentes une différence de 10% par rapport à la valeur théorique, l'écart entre ces valeurs introduit une erreur de 2% dans la détermination des constantes de vitesse.

CHAPITRE IV

Acétomido-17 β acétoxy-3 β androstène-5 44a

L'amine 22a est acétylée dans les conditions habituelles.

F = 192°C-193°C (3 crist. MeOH)

IR (CCl₄) : 3460 (ν_{NH})
1735 ($\nu_{\text{C=O}}$ acétate)
1685 ($\nu_{\text{C=O}}$ amide)

RMN (CDCl₃) : 0,72 (s, CH₃-18)
1,02 (s, CH₃-19)

Acétamido-17 β acétoxy-3 β nitro-6 androstène-5 45a

Une nitration effectuée dans les conditions décrites page 116 conduit au produit cherché.

Rdt = 45%

F = 171°C-173°C (3 crist. MeOH)

UV : λ_{max} (EtOH) = 250 nm, ϵ = 2100

RMN (CDCl₃) : 0,70 (s, CH₃-18)
1,15 (s, CH₃-19)

Essai d'obtention de la diamine

La réduction du groupement nitro en amine axiale est effectuée conformément au mode opératoire décrit page 118. L'amine en 17 est alors régénérée par action de la potasse méthanolique chauffée par un bain à 180°C. On n'obtient que des traces de diamine qui sont difficilement séparables de l'acétamide de départ.

Thioacétamido-17 β acétoxy-3 β androstène-5 44b

700 mg d'acétamide 44a sont dissous dans 25 ml de pyridine et 700 mg de pentasulfure de phosphore sont ajoutés. La solution est agitée et chauffée à reflux pendant deux heures trente ⁽⁸¹⁾. La manipulation (totalement noire) est évaporée à sec puis dissoute dans le chloroforme et lavée à l'eau, à l'aide d'une solution 0,2N d'acide sulfurique, puis à l'eau jusqu'à neutralité. Le produit obtenu après évaporation est noir. Après filtration sur colonne de silice (éluant CHCl₃/MeOH : 9/1) puis chromatographie sur silice (éluant AcOEt) le produit est orange foncé. Il éclairci encore après chauffage dans l'acétate d'éthyle en présence de noir animal. L'échantillon analytique est obtenu après trois cristallisations dans le méthanol.

Rdt = 60%

F = 248°C-250°C (3 crist. MeOH)

IR (CHCl₃) : 3400 (ν_{N-H})
1735 ($\nu_{C=O}$)

RMN (CDCl₃) : 0,80 (s, CH₃-18)
1,03 (s, CH₃-19)
1,45 (s, CH₃-C)
2,56 (s, CH₃-C)
4,6 (m, H-3 et H-17)
5,35 (m, H-6)
7,15 (m, NH)

Analyse : $C_{23}H_{35}O_2NS$

| | | | | |
|-----------------|---------|--------|--------|--------|
| Calc. \bar{x} | C 70,92 | H 9,06 | N 3,60 | S 8,21 |
| Tr. | 70,96 | 9,17 | 3,48 | 8,48 |

Essai d'hydrolyse du thioacétamide 44b

400 mg de thioacétamide 44b sont dissous dans 2,5 ml de méthanol absolu, on ajoute 40 ml de méthanol saturé d'ammoniac sec. Cette solution est mise dans un autoclave à l'étuve à 100°C pendant dix huit heures. Le solvant est évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 50 ml de chloroforme et extrait de la manière habituelle. Une chromatographie sur plaque analytique montre que le thioacétamide n'a pratiquement pas été hydrolysé.

Hydroxy-3 β trifluoroacétamido-17 β androstène-5 44c (82)

A une suspension de 1,9 g d'hydroxy-amine dans 14 ml de pyridine sèche, on ajoute en dix minutes en agitant la suspension 6 ml d'anhydride trifluoroacétique. Une gomme se forme, on laisse l'agitation pendant deux heures à température ambiante. On verse dans 100 ml d'eau glacée légèrement acide (1 ml d'HCl concentré), extrait à l'éther, lave à l'eau. Une chromatographie analytique (éluant pentane/éther : 1/2) montre un produit unique à $R_F = 0,85$. Ce produit est le trifluoroacétoxy-3 β trifluoroacétamido-17 β androstène-5. Le trifluoroacétate en position 3 risquant de n'être pas stable dans les conditions de nitration de la double liaison nous effectuons une saponification de cet acétate en dissolvant le produit à chaud dans 10 ml d'éthanol et en ajoutant à température ambiante 3,8 g de bicarbonate de sodium dans 50 ml d'eau. On laisse vingt quatre heures sous agitation puis après avoir ajouté de l'eau on extrait au chloroforme, lave, sèche. Après évaporation on obtient une huile qui recristallise du méthanol.

Rdt = 90%

F = 220°C (3 crist. MeOH)

RMN (CDCl₃) : 0,75 (s, CH₃-18)
1,02 (s, CH₃-19)
3,6 (m, H-3)
3,9 (m, H-17)
5,3 (m, H-6)
6,2 (m, N-H)

Acétoxy-3β trifluoroacétamido-17β androstène-5 44d

Une acétylation dans les conditions habituelles du produit 44c donne le dérivé 44d.

F = 208°C-210°C

RMN (CDCl₃) : peu différent du spectre précédent
1,05 (s, CH₃-19)
4,6 (m, H-3)

Acétoxy-3β nitro-6 trifluoroacétamido-17β androstène-5 45b

La nitration est effectuée dans les conditions de la page 116. A partir de 345 mg de Δ - 5 stéroïde, on obtient 117 mg d'un dérivé nitré pur, qui cristallise du méthanol.

F = 181°C-183°C

RMN (CDCl₃) : 0,76 (s, CH₃-18)
1,17 (s, CH₃-19)
disparition du proton oléfinique

l'évaporation des eaux mères de cristallisation montre la pré-

sence d'un produit (100 mg) de R_F identique à celui du produit précédent ($R_F = 0,33$, éluant pentane/éther : 1/1). Nous n'avons pas réussi à recristalliser ce produit qui demeure non identifié.

RMN ($CDCl_3$) : 0,8 (d, $J=7$ Hz, 3H)
1,17 (s, 3H)
2,02 (s, 3H)
4,00 (t. élargi, 1H)
4,50 (m, 1H)
6,50 (m, 1H)

Diamino-6 β ,3 β trifluoroacétamido-17 β androstène-5 46b

La réduction catalytique sous pression du dérivé 45b conduit à l'amine-6 β (chlorhydrate F = 230°C (décomposition)). Une saponification de 300 mg dans la potasse méthanolique permet d'obtenir la diamine en faible quantité (Rdt = 10%) difficilement purifiable et identifiée sous forme de diacétamide (voir caractéristiques ci-dessous).

Benzyluréthane 44e

2 g d' amino-17 β hydroxy-3 β androstène-5 22a sont dissous dans 20 ml de pyridine auquel on ajoute 6 ml de chloroformiate de benzyle. Le mélange est laissé quatre heures à température ambiante, extrait au chlorure de méthylène, lavé à l'acide puis à l'eau, évaporé et filtré sur colonne de silice (éluant éther). Le produit recueilli est acétylé (fonction alcool en 3) après extraction le produit brut obtenu est chromatographié sur colonne de silice (éluant pentane/éther : 3/2).

F = 140°C-143°C

RMN ($CDCl_3$) : 0,63 (s, CH_3 -18)
1,02 (s, CH_3 -19)
4,5 (s, CH_2 - C_6H_5)
7,4 (s, 5H aromatiques)

Analyse : $C_{21}H_{29}O_6N_3$

| | | | |
|---------|---------|--------|---------|
| Calc. % | C 60,13 | H 6,97 | N 10,02 |
| Tr. | 59,80 | 6,89 | 9,85 |

- Cétone 49

225 mg.

- à $R_F = 0,3$

F = 192°C-194°C (2 crist. MeOH)

UV (EtOH) : $\lambda_{max} = 258 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1350$)

IR (CCl_4) : 1745 ($\nu_{C=O}$ dans un cycle à 5)
1735 ($\nu_{C=O}$ acétate)
1650 ($\nu_{C=C}$)
1410 (δCH_2 en α C=O)

RMN ($CDCl_3$) : 0,91 (s, CH_3 -18)

1,18 (s, CH_3 -19)

(C_5D_5N) 0,79 (s, CH_3 -18)

1,02 (s, CH_3 -19)

Analyse : $C_{21}H_{29}O_5N$

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 67,18 | H 7,79 | N 3,73 |
| Tr. | 67,20 | 7,84 | 3,65 |

Acétoxy-3 β nitro-6 oximino-17 androstène-5 48

L'oxime 48 est obtenue selon la deuxième méthode décrite page 103, à partir de 2 g de la cétone 49. Après recristallisation du méthanol, on obtient 1,3 g de produit.

Rdt = 65%

F = 125°C-127°C (3 crist. MeOH)

RMN ($CDCl_3$) : 0,96 (s, CH_3 -18)

1,18 (s, CH_3 -19)

Analyse : $C_{21}H_{30}O_5N_2$

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 64,59 | H 7,74 | N 7,17 |
| Tr. | 64,76 | 8,01 | 7,07 |

Acétoxy-3 β diamino-6 β ,17 β androstane 47

700 mg d'oxime 48 sont dissous dans 40 ml d'acide acétique, on ajoute 30 mg de catalyseur ADAMS (PtO_2). L'hydrogénation est faite sous pression (100 atmosphères) pendant seize heures. Après filtration du catalyseur et évaporation du solvant on obtient 590 mg. Pour analyse, nous préparons des échantillons de dichlorhydrate et de diacétamide.

- Dichlorhydrate

F = 280°C (dec.)

Analyse : $C_{21}H_{38}N_2O_2Cl_2$

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 59,84 | H 9,09 | N 6,65 |
| Tr. | 59,63 | 9,12 | 6,52 |

- Diacétamide

F = 146°C-148°C (3 crist. MeOH)

RMN ($CDCl_3$) : 0,72 (s, CH_3 -18)
1,00 (s, CH_3 -19)

Analyse : $C_{23}H_{40}N_2O_4$

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 67,61 | H 9,87 | N 6,86 |
| Tr. | 67,43 | 9,72 | 6,66 |

Cyanhydrine 51

2 g d'acétoxy-3 β céto-17 méthyl-17 $\alpha\beta$ D-homoandrostène-5 10 sont dissous dans 50 ml d'éthanol, on ajoute 12 g de cyanure de potassium en poudre fine et on refroidit à 0°C. En agitant vivement la solution, on

ajoute goutte à goutte 12 ml d'acide acétique. Le mélange est encore agité une heure à 0°C et deux heures à température ambiante, il est alors versé dans l'eau. Le produit brut qui chute est filtré, abondamment lavé à l'aide d'une solution d'acide acétique à 2%. Il est alors dissous dans l'acétate d'éthyle et lavé plusieurs fois à l'eau puis séché et évaporé.

La cyanhydrine obtenue a été utilisée brute sans recristallisation car elle se décompose très facilement par chauffage.

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| IR (CCl ₄) | : 3410 (ν _{OH}) |
| | 2240 (ν _{C≡N}) |
| RMN (CDCl ₃) | : 0,93 (s, CH ₃ -18) |
| | 1,00 (s, CH ₃ -19) |
| | 0,99 (d, J=5 Hz, CH ₃ -20) |
| (C ₅ D ₅ N) | : 1,12 (s, CH ₃ -18) |
| | 0,98 (s, CH ₃ -19) |
| | 1,02 (d, CH ₃ -20) |

Acétoxy-3β nitro-6 cêto-17 méthyl-17αβ D-homoandrostène-5 53

2 g de cyanhydrine 51 non purifiée sont dissous dans 50 ml d'acide acétique on ajoute assez rapidement (cinq minutes) 10 ml d'acide nitrique fumant et laisse la manipulation à température ambiante pendant une demi-heure. La solution est versée dans l'eau. Un produit blanc chute, il est filtré, abondamment lavé à l'eau. Une chromatographie sur plaque analytique (éluant pentane/éther : 1/1) montre la présence de deux produits. Ce mélange, constitué par la cyanhydrine nitrée 52 et la cétone nitrée 53, est dissous dans 60 ml d'éthanol et 7 ml de pyridine et chauffé à reflux pendant deux heures trente. Au bout de ce temps la cétone en 17 est totalement régénérée et on obtient un produit pur qui recristallise du méthanol (20 ml).

Rdt = 65%

F = 203°C-205°C (3 crist. MeOH)

IR (CCl₄) : 1715 (ν_{C=O})

RMN (CDCl₃) : 0,67 (s, CH₃-18)
1,13 (s, CH₃-19)
0,94 (d, J=7 Hz, CH₃-20)

Analyse : C₂₃H₃₃O₅N

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 68,46 | H 8,24 | N 3,47 |
| Tr. | 68,48 | 8,00 | 3,71 |

Acétoxy-3β nitro-6 oximino-17 méthyl-17αβ D-homoandrostène-5 54

L'oxime est préparée selon la méthode habituelle ; on obtient à partir de 1 g de cétone, l'oxime 54 avec un rendement de 50% en produit pur cristallisé du méthanol.

Rdt = 50%

F = 239°C-241°C (3 crist. MeOH)

RMN (CDCl₃) : 0,71 (s, CH₃-18)
1,12 (s, CH₃-19)
1,00 (d, J=7 Hz, CH₃-20)

Analyse : C₂₃H₃₄O₅N₂

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 66,00 | H 8,19 | N 6,69 |
| Tr. | 66,11 | 8,19 | 6,61 |

Diamino-6β,17β acétoxy-3β méthyl-17αβ D-homoandrostane 3

Une hydrogénation identique à celle qui conduit au produit 47 permet d'obtenir la diamine 43 à partir de l'oxime 54. Ce produit est purifié par l'intermédiaire de la formation du dichlorhydrate.

- *Dichlorhydrate*

400 mg de la diamine sont dissous dans 3 ml de méthanol. On ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré, puis, peu à peu de l'éther. Le chlorhydrate cristallise par repos à 0°C. On obtient 150 mg de dichlorhydrate.

F > 305°C (dec.)

- *Régénération de la diamine* 3

A une solution de 100 mg de chlorhydrate dans 10 ml de méthanol, on ajoute progressivement une solution N de soude jusqu'à pH = 10. On fait précipiter l'amine par addition progressive d'eau, puis après filtration, l'amine est recristallisée du méthanol.

F = 90°C-92°C (2 crist. MeOH)

- *Diacétamide*

F = 175°C-177°C (3 crist. MeOH)

RMN (CDCl₃) : 0,83 (s, CH₃-18)
1,00 (s, CH₃-19)
0,90 (d, J=7 Hz, CH₃-20)

Nitro-6 conessine 56

1 g de conessine 55 est dissous dans 15 ml d'acide acétique, 2,5 ml d'acide nitrique fumant sont ajoutés goutte à goutte pendant cinq minutes, la température de la réaction est d'environ 30°C. L'agitation est poursuivie pendant trois quarts d'heure. On verse alors la solution dans 250 ml d'eau contenant 50 ml d'ammoniac, un produit blanc chute, il est filtré jusqu'à neutralité. On obtient 800 mg de produit qui est purifié par cristallisation du méthanol.

Rdt = 58%

F = 150°C-152°C (3 crist. MeOH)

UV (EtOH) : λ_{\max} = 265 nm (ϵ = 1600)
RMN (CDCl_3) : 1,04 (s, CH_3 -19)
1,03 (d, CH_3 -20)
2,19 et 2,27 (2s, CH_3 -N)
3,00 (d. élargi, $J=10$ Hz, H-3)

Analyse : $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{O}_2\text{N}_3$

| | | | |
|---------|---------|--------|---------|
| Calc. % | C 71,78 | H 9,79 | N 10,46 |
| Tr. | 72,31 | 9,49 | 10,37 |

Nitro-6 conadiénime-3,5 57

A 10 g de nitro conessine 56 dissous dans 275 ml de benzène on ajoute 3,45 g (1,5 ml) d'iodure de méthyle. Le mélange est chauffé à reflux pendant six heures. Après refroidissement la solution est filtrée. L'iodométhylate solide recueilli n'est pas purifié mais directement mis en présence d'une solution de 20 g d'oxyde d'argent dans 100 ml de méthanol et 100 ml d'eau. L'agitation est poursuivie pendant quatre heures sous azote. La solution est filtrée sur célite et évaporée sous vide. Le produit restant est pyrolysé pendant une heure dans l'évaporateur rotatif à 80°C et sous le vide donné par la trompe à eau. Le produit obtenu est extrait au benzène, lavé à l'eau. Le résidu est trituré avec de l'acétone : on fait ainsi précipiter 2,6 g de produit, qui, recristallisé du méthanol donne 2,2 g de diène pur.

Rdt = 25%

F = 100°C-101°C (3 crist. MeOH)

RMN (CDCl_3) : 1,00 (s, CH_3 -19)
1,05 (d, $J=7$ Hz, CH_3 -20)
2,23 (s, CH_3 -N)
3,05 (d. élargi, $J=10$ Hz, CH_2 -N)
6,05 et 6,55 (système AB, $J=10$ Hz
 H_3 et H_4 oléfiniques, le signal du
proton H_3 (6,05 ppm) est élargi par
le couplage J^3 avec les 2H en α)

(C₆D₆) : 0,72 (s, CH₃-19)
 1,05 (d, J=7 Hz, CH₃-20)
 1,175 (s, CH₃-N)
 5,75 et 6,75 (système AB, J=10 Hz,
 H₃ et H₄)

Analyse : C₂₂H₃₂N₂O₂

| | | | |
|---------|---------|--------|--------|
| Calc. % | C 74,12 | H 9,04 | N 7,95 |
| Tr. | 73,62 | 9,32 | 7,85 |

Amino-6β conanine 43

2 g de nitro-6 conadiénine-3,5 57 sont dissous dans 30 ml d'acide acétique et hydrogénés en présence d'oxyde de platine à température ambiante et sous pression (50 atmosphères) pendant douze heures. On filtre le catalyseur, évapore le solvant, dissout le produit dans l'acétate d'éthyle, lave la solution plusieurs fois (eau, bicarbonate, eau). Le produit apparaît sous forme d'une gomme blanche qui ne cristallise pas. Après formation du chlorhydrate puis régénération de l'amine à partir de celui-ci, on obtient quelques cristaux (200 mg).

F = 92°C-94°C (1 crist. MeOH/H₂O)

RMN (CDCl₃) : 1,00 (s, CH₃-19)
 1,05 (d, J=6 Hz, CH₃-20)
 2,21 (s, CH₃-N)
 3,7 (m, H-6)

(C₆D₆) : 1,05 (s, CH₃-19)
 1,05 (d, J=6 Hz, CH₃-20)
 2,15 (s, CH₃-N)

Analyse : C₂₂H₃₈N₂

| | | | |
|---------|---------|---------|--------|
| Calc. % | C 79,94 | H 11,59 | N 8,48 |
| Tr. | 79,63 | 11,25 | 8,22 |

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - B. CAPON, *Quat. Rev.*, 1964, 18, 45.
- 2 - T.C. BRUICE et S.J. BENKOVIC, "Bioorganic Mechanisms", Benjamin, New York 1966, Chapitres I et II.
- 3 - T.H. FIFE, "Advances in Physical Organic Chemistry" Academic Press, London 1975, vol. XI page 1.
- 4 - D.M. BLOW, "The Enzymes" ed. P. Boyer, Academic Press, New York 1971, Chapitre VI.
- 5 - R. BRESLOW, *Quat. Rev.*, 1972, 1, 553.
- 6 - J.P. GUTHRIE et S. O'LEARY, *Canad. J. Chem.*, 1975, 53, 2150.
- 7 - M.F. ALDERSLEY, A.J. KIRBY, P.W. LANCASTER, R.S. Mc DONALD et C.R. SMITH, *J. chem. Soc., Perkin I*, 1974, p. 1487.
- 8 - T.C. BRUICE, "The Enzymes" ed. P. Boyer, Academic Press, New York 1970, vol. II, Chapitre IV.
- 9 - J.M. YON, *Biochimie*, 1976, 58, 61.
- 10 - W.P. JENCKS, "Catalysis in Chemistry and Enzymology", Mc Graw Hill 1969, Chapitres VI à IX.
- 11 - G.P. HESS, "The Enzymes" ed. P. Boyer, Academic Press, New York 1971, Chapitre VII.
- 12 - D.M. BLOW, J.J. BIRKTOFF et B.S. HARTLEY, *Nature*, 1969, 221, 337.
- 13 - S.G. WALEY, *Quat. Rev.*, 1967, 21, 379.
- 14 - H.P. KASSERA et K.J. LAIDLER, *Canad. J. Chem.*, 1969, 47, 4031.
- 15 - M.L. BENDER, "Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins" ed. Wiley-Interscience 1971.
- 16 - T.C. BRUICE et G.L. SCHMIR, *J. amer. chem. Soc.*, 1958, 80, 148.
- 17 - C. ASO, T. KUNITAKE et S. SHINKAI, *J. chem. Soc. Chem. Com.*, 1968, p. 1483.

- 18 - J.P. GUTHRIE et Y. UEDA, J. chem. Soc. Chem. Com., 1974, p. 111.
- 19 - Y. IWAKURA, K. UNO, F. TODA, S. ONOZUKA, K. HATTORI et M.L. BENDER, J. amer. chem. Soc., 1975, 97, 4432.
- 20 - T. MAUGH et T.C. BRUICE, J. amer. chem. Soc., 1971, 93, 3237.
- 21 - T.H. FIFE et B.M. BENJAMIN, J. chem. Soc. Chem. Com., 1974, p. 525.
- 22 - A.J. KIRBY et G.J. LLOYD, J. chem. Soc., Perkin II, 1974, p. 637.
- 23 - T.H. FIFE et B.M. BENJAMIN, J. amer. chem. Soc., 1973, 95, 2059.
- 24 - G. DEFAYE et M. FETIZON, Bull. Soc. chim. France, 1969, p. 1632.
- 25 - G.R. PETTIT, R.L. SMITH, A.K. DAS GUPTA et J.L. OCCOLOWITZ, Canad. J. Chem., 1967, 45, 501.
- 26 - D.N. KIRK et A. MUDD, J. chem. Soc., (C), 1970, p. 2045.
- 27 - J. FRIED et J.A. EDWARDS, "Organic Reactions in Steroid Chemistry", V.N.R., New York 1972, vol. II, p. 382.
- 28 - E.P. OLIVETO, L. WEBER et E.B. HERSHBERG, J. amer. chem. Soc., 1954, 76, 4482.
- 29 - R.S. ROSENFELD, J. amer. chem. Soc., 1957, 79, 5540.
- 30 - N.S. BHACCA et D.H. WILLIAMS, "Application of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry", Holden-Day, 1964.
- 31 - W.R. BAMFORD et T.S. STEVENS, J. chem. Soc., 1952, p. 4735.
- 32 - H. HIRSCHMANN, F.B. HIRSCHMANN et A.P. ZALA, J. org. Chem., 1966, 31, 375.
- 33 - D.N. KIRK et M.P. HARTSHORN, "Steroid Reaction Mechanisms", Elsevier Amsterdam 1968, p. 339.
- 34 - H.O. HOUSE, "Modern Synthetic Reactions", Second Edition Benjamin, Menlo Park, California 1972, p. 76.
- 35 - K. JANKOWSKI et C. BERSE, Canad., J. Chem., 1969, 47, 751.
- 36 - C.W. SHOPPEE, N.W. HUGHES et B.C. NEWMAN, J. chem. Soc., (C), 1970, p. 558.
- 37 - G. CLEVE et G. SCHULZ, Tetrahedron, 1971, 27, 1415.
- 38 - Annual Reports on NMR Spectroscopy, E.F. Mooney, Academic Press London 1970, vol. III, p. 159.
- 39 - J.B. STOTHERS, "Carbon-13 NMR Spectroscopy", Academic Press 1972.
- 40 - H. EGGERT et C. DJERASSI, J. org. Chem., 1973, 38, 3788.
- 41 - H. EGGERT, C.L. VAN ANTWERD, N.S. BHACCA et C. DJERASSI, J. org. Chem., 1976, 41, 71.

- 42 - M.J. GASIC, Z. DJARMATI et S.W. PELLETIER, *J. org. Chem.*, 1976, 41, 1219.
- 43 - G. DEFAYE et M. FETIZON, *Bull. Soc. chim. France*, 1969, p. 2835.
- 44 - C.R. ECK et B. GREEN, *J. chem. Soc. Chem. Comm.*, 1972, p. 537.
- 45 - R. ROBINSON et L.H. SMITH, *J. chem. Soc.*, 1937, p. 1847.
- 46 - H. ADKINS, R.M. ROSS, D.C. SCHOEDER, C.L. MAHONEY et W.W. GILBERT, *J. amer. chem. Soc.*, 1954, 76, 147.
- 47 - Y.S. KLAUSNER et M. BODANSKY, *Synthesis*, 1972, p. 453.
- 48 - R.B. WOODWARD et R.A. OLOFSON, *J. amer. chem. Soc.*, 1961, 83, 1007.
- 49 - G.R. PETTIT, R.L. SMITH et H. KLINGER, 1967, 10, 145.
- 50 - NGUYEN-DANG TÂM, *Bull. Soc. chim. France*, 1967, p. 3805.
- 51 - J.A. Mac LAREN, *Austral. J. Chem.*, 1958, 11, 360.
- 52 - Z.V. ZARETSKII, "Mass Spectrometry of Steroids", John Wiley, New York 1976.
- 53 - M.L. BENDER et J.L. KEZDY, *Annu. Rev. Biochem.*, 1965, 34, 49.
- 54 - D.M. BLOW, *Accounts Chem. Res.*, 1976, 9, 145.
- 55 - S.A. BERNHARD, "Structure et Fonction des Enzymes", Ediscience 1969.
- 56 - M.L. BENDER et B.W. TURNQUEST, *J. amer. chem. Soc.*, 1957, 79, 1652.
- 57 - T.C. BRUICE et G.L. SCHMIR, *J. amer. chem. Soc.*, 1957, 79, 1663.
- 58 - W.P. JENCKS et J. CARRIUOLO, *J. amer. chem. Soc.*, 1961, 83, 1743.
- 59 - T. KUNITAKE et S. SHINKAI, *Bull. chem. Soc. Jap.*, 1970, 43, 2581.
- 60 - S. SHINKAI et T. KUNITAKE, *Bull. chem. Soc. Jap.*, 1971, 44, 3086.
- 61 - J.P. GUTHRIE et Y. UEDA, *J. chem. Soc. Chem. Comm.*, 1973, p. 898.
- 62 - J.P. GUTHRIE et Y. UEDA, *J. chem. Soc. Chem. Comm.*, 1974, p. 991.
- 63 - C.A. BLYTH et J.R. KNOWLES, *J. amer. chem. Soc.*, 1971, 93, 3017.
- 64 - C.A. BLYTH et J.R. KNOWLES, *J. amer. chem. Soc.*, 1971, 93, 3021.
- 65 - R. HERSHFIELD et M.L. BENDER, *J. amer. chem. Soc.*, 1972, 94, 1376.
- 66 - D. OAKENFULL, *J. chem. Soc., Perkin II*, 1973, p. 1006.
- 67 - J.P. FREEMAN, *J. org. Chem.*, 1961, 26, 4190.
- 68 - C.Y. SHIUE, K.P. PARK et L.B. CLAPP, *J. org. Chem.*, 1970, 35, 2063.
- 69 - M. KOBAYASHI et H. MITSUHASHI, *Chem. pharm. Bull. Jap.*, 1973, 21, 1069.
- 70 - J.R. BULL, E.R.H. JONES et G.D. MEAKINS, *J. chem. Soc.*, 1965, p. 2601.
- 71 - G. DEFAYE et P. JAUDON, *C.R. Acad. Sc.*, 1971, 272C, 702.

- 72 - H. HEUSSER, P.Th. HERZIG, A. FÜRST et Pl.A. PLATTNER, *Helv. chim. Acta*, 1950, 33, 1093.
- 73 - A. ERCOLI et P. de RUGGIERI, *J. amer. chem. Soc.*, 1953, 75, 650.
- 74 - P.K. BHATTACHARYYA, B.D. KULKARNI, S. KANTHAMANI et C.R. NARAYANAN, *Chem. and Ind.*, 1962, p. 1377.
- 75 - S. SIDDIQUI et R.H. SIDDIQUI, *J. indian chem. Soc.*, 1934, p. 787.
- 76 - D. PORTSMOUTH, A.C. STADMILLER et R.H. ABELES, *J. biol. Chem.*, 1967, 242, 2751.
- 77 - F. SONDEIMER, O. MANCERA, H. FLORES et G. ROSENKRANZ, *J. amer. chem. Soc.*, 1956, 78, 1742.
- 78 - O.A. PRINS et C.W. SHOPPEE, *J. chem. Soc.*, 1946, p. 494.
- 79 - K.I.H. WILLIAMS, M. SMULOWITZ et D.K. FUKUSHIMA, *J. org. Chem.*, 1965, 30, 1447.
- 80 - N.E. GOOD, G.D. WINGET, W. WINTER, T.N. CONNOLY, S. IZAWA et R.M.M. SING, *Biochem.*, 1966, 5, 467.
- 81 - M.L. WOLFRAM, M.W. WINKLEY et S. INOWJE, *Carbohydr. Res.*, 1969, 10, 97.
- 82 - R.A. LUCAS, D.F. DICKEL, R.L. DZIEMIAN, M.J. CEGLOWSKI, B.L. HENSLE et H.B. Mac PHILLAMY, *J. amer. chem. Soc.*, 1960, 82, 5688.