

MECANISME D'HYDROLYSE EN MILIEU BASIQUE AQUEUX D'ESTERS  
 ALLOPHANQUES, MODELES DE CARBOXYBIOTINE

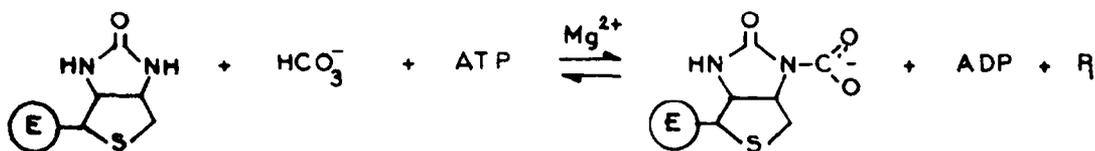
Par E. MONNIER, A. KLAEBE et J. J. PERIE  
 U. A. du CNRS 454 et 470, UER-PCA Bât. II R1 B2  
 Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne  
 31062 Toulouse Cedex, France

(Received in France 12 March 1984)

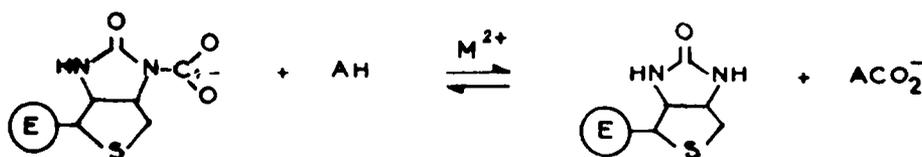
Abstract - This work is dealing with basic hydrolysis in water of allophanic esters as possible models of carboxybiotin. A complex mechanism is involved likely due to competition of nucleophilic attack on the two carbonyl groups of the substrate. The rate of hydrolysis is significantly increased by metallic cation ( $Mg^{2+}$ ), a specific effect which allows to consider characterization of selectivity of bond breaking between nitrogen and carboxylate group with other nucleophiles.

Résumé - Ce travail présente des résultats obtenus dans l'hydrolyse basique en milieu aqueux d'esters allophaniques cycliques modèles de carboxybiotine. Un mécanisme complexe est mis en évidence, vraisemblablement dû à la compétition entre les deux attaques possibles sur les deux groupements carbonyle du substrat. La réaction d'hydrolyse montre une accélération, par effet de sel spécifique, due à l'ion  $Mg^{2+}$ . Cet effet permet d'envisager la coupure entre atome d'azote et groupement carboxylate dans le cas d'autres nucléophiles comme cela se produit dans la réaction enzymatique.

Malgré le nombre important de travaux qui ont été consacrés au mode d'action de la biotine 1, 2, 3, 4 plusieurs aspects de la réactivité de ce coenzyme demeurent encore mal compris. En effet, s'il est bien établi que ces réactions se font en deux demi-étapes successives avec formation d'un intermédiaire carboxybiotine (schéma 1), l'étude détaillée des mécanismes mis en jeu reste à faire.



Première étape carbonatation de la biotine liée à l'enzyme



Deuxième étape transfert du groupe carbonate à un accepteur AH

Schéma 1

l'activation possible du coenzyme biotine par phosphorylation par un ATP ou bien, dans la deuxième étape, le mode de transfert du groupement carbonate de la carboxybiotine à l'accepteur carbanionique. Pour prendre un exemple, le transfert du groupement carboxylate de la carboxybiotine à l'acétylCoA pose une question relative à la réactivité, compte tenu des deux points suivants

- le carbone du groupement carboxylate de la carboxybiotine est un électrophile médiocre
- le groupement partant, l'anion imidazolidinone, est un mauvais nucléofuge

Dans un travail précédent nous avons tenté d'apporter des éléments de réponse à la première question <sup>5</sup>

Le présent article constitue une des approches que nous développons dans le but de dégager des éléments mécanistiques concernant la deuxième étape la réaction de transfert

Si l'on se réfère aux travaux antérieurs, cette étape de transfert pourrait relever de trois mécanismes d'activation <sup>6</sup>

- une activation électrophile du carbone qui serait assurée par toute espèce chimique susceptible de neutraliser la charge du carboxylate
- une activation nucléophile de l'accepteur, la réaction devant être facilitée par une augmentation du caractère carbanionique de cet accepteur
- une activation par augmentation du caractère nucléofuge du cycle uréido

Les études de réactions modèles qui ont été développées ont visé à confirmer la validité de ce schéma. CAPLOW tout d'abord a étudié la décarboxylation de la carboxylimidazolidinone (modèle de carboxybiotine) et il a montré que cette décarboxylation est unimoléculaire et qu'elle est ralentie par les cations métalliques <sup>7, 8</sup>, le faible pouvoir donneur du substrat est attribué par cet auteur au mauvais caractère groupe partant du cycle uréido, celui-ci étant trop peu basique pour être protoné. L'importance de ce facteur est illustrée par la décarboxylation des carbamates ou une catalyse acide par protonation de l'azote est effective <sup>9</sup> (schéma 2). Cet argument relatif

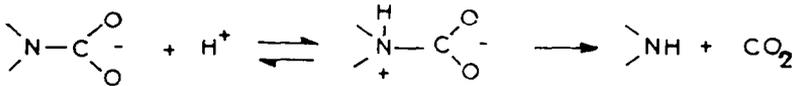
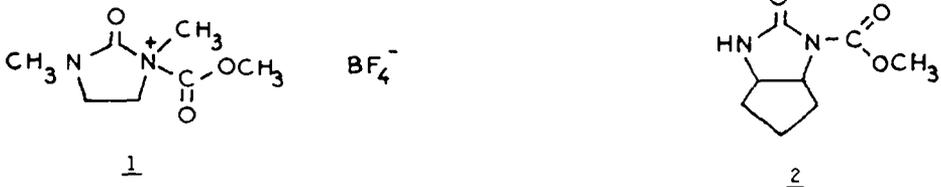


Schéma 2

à la nécessaire protonation de l'atome d'azote de la carboxybiotine a été confirmé ultérieurement <sup>10</sup> dans un travail relatif au transfert de groupe carboxylate à partir d'un donneur de structure 1

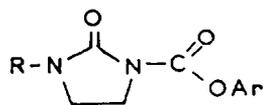


pour lequel une telle réaction est observée avec des nucléophiles du type amine, le groupe partant étant, dans ce cas, une molécule neutre. Dans ce même travail, il est en outre montré que selon le nucléophile, différentes réactions sont observées : réaction de transfert avec les amines, ou réactions d'ouverture de cycle, par attaque du carbonyle intracyclique dans le cas de nucléophiles tels que l'eau ou le méthanol.

Enfin un dernier type d'argument a été développé par MATSUMARA et coll <sup>11</sup> qui ont montré que des réactions de transfert de carboxylate avec une amine comme accepteur sont observées sur des substrats de type 2 en présence de cations divalents, alors qu'en leur absence, c'est une réaction d'ouverture de cycle qui a lieu.

Sur la base de ces précédents résultats, nous avons poursuivi l'étude des différents facteurs pouvant rendre compte de cette réaction de transfert

L'approche choisie est celle de l'étude cinétique de l'action de nucléophiles sur les esters allophaniques 3a, 3b et 3c, ceci avec différents objectifs



3a R = H , Ar = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

3b R = H , Ar = pNO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

3c R = CH<sub>3</sub> , Ar = pNO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

3

- étudier d'abord cette réactivité en milieu aqueux puis en milieu organique, l'écart de réactivité étant source d'information, un travail préliminaire relatif à cette partie a été publié<sup>12</sup>

- comparer la réactivité de ces esters en présence et en absence de cations métalliques puisque MATSUMARA et coll<sup>11</sup> ont montré que certains ions métalliques peuvent favoriser la réaction de transfert du groupe alcoxycarbonyle sur une amine dans le cas de N-alcoxycarbonyl 2-imidazolidinones

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats décrits ici sont relatifs à l'hydrolyse des substrats 3a, 3b et 3c en milieu aqueux basique tamponné (tampons borax et carbonate) avec et sans cation métallique (Mg<sup>++</sup>) à force ionique constante. Les mesures cinétiques sont faites à 298 K en suivant par spectroscopie UV, la disparition de la bande d'absorption des substrats et l'apparition de celles des ions phénate et paranitrophénate. La figure 1 représente le spectre en balayage pour l'hydrolyse de 3b

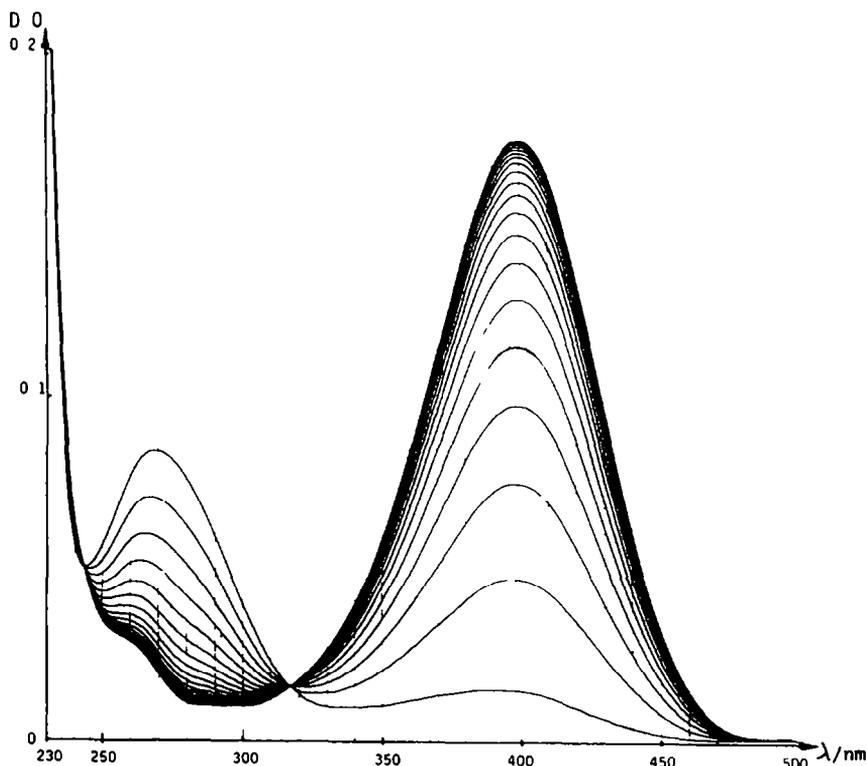


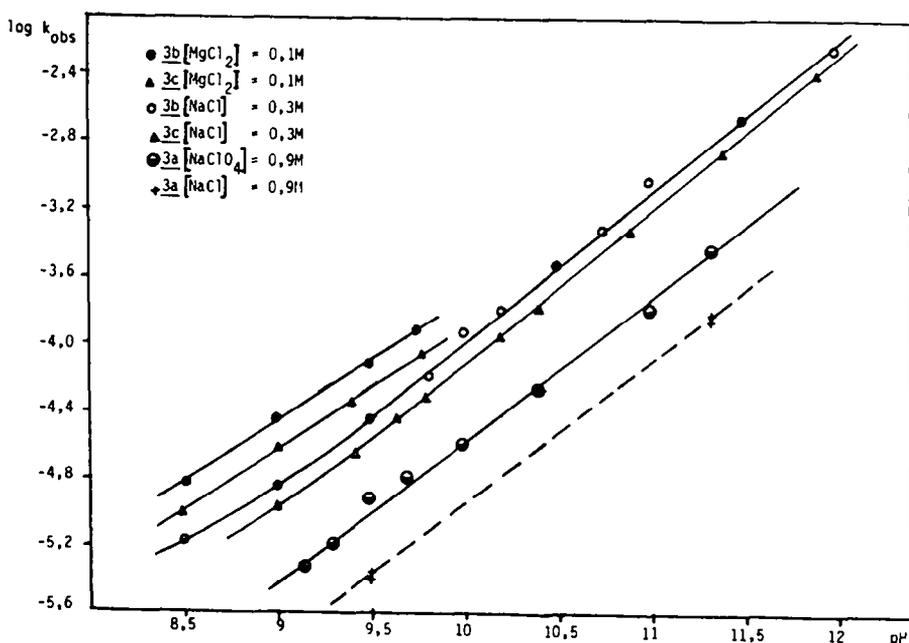
Figure 1 Enregistrement du spectre U V, en balayage de longueurs d'onde, pour l'hydrolyse du substrat 3b [3b] = 10<sup>-4</sup>M, pH = 11,0, Δt = 11 s, temp = 298 K, γ = 0,1

a- Sur le tableau 1 est indiquée l'influence de la force ionique sur la vitesse d'hydrolyse de 3a et de 3b, on peut constater que celle-ci a peu d'influence sur ces réactions dans tous les essais la force ionique a cependant été maintenue constante ( $\gamma = 0,4$ ) par adjonction de sel de sodium

Substrat	Force ionique $\gamma$	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
<u>3a</u> = $10^{-3}$ M	0,1	$3,44 \cdot 10^{-6}$
	0,4	$4,56 \cdot 10^{-6}$
	1	$4,56 \cdot 10^{-6}$
<u>3b</u> = $10^{-4}$ M	0,1	$3,31 \cdot 10^{-5}$
	0,4	$3,62 \cdot 10^{-5}$

**Tableau 1** Influence de la force ionique  $\gamma$  sur la constante de vitesse observée dans le cas de 3a et 3b  
 $\text{pH} = 9,50$ ,  $T = 298 \text{ K}$ , Tampon borax =  $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

b - L'influence du pH sur la vitesse d'hydrolyse de 3a, 3b et 3c, à 298 K, dans le tampon borax, à la concentration  $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ , a été étudiée dans le domaine de pH de 8,50 à 13,00, en absence d'ions magnésium et également en présence d'ions magnésium pour les substrats 3b et 3c pour des pH compris entre 8,50 et 10,00. Ce domaine de pH est limité en raison de la précipitation de l'hydroxyde à pH supérieur à 10. Les variations de  $\log_{10} k_{\text{obs}}$  en fonction du pH, pour les différents substrats, sont représentés sur la figure 2



**Figure 2** Variation de  $\log k_{\text{obs}}$  en fonction du pH pour les substrats étudiés  
temp = 298 K

Une première approche a été de tracer les meilleures droites passant par les points expérimentaux, ces droites ont toutes une pente inférieure à 1, l'écart à cette valeur ne pouvant être imputé à l'imprécision des mesures. Par ailleurs, dans le cas des substrats 3b et 3c (sans adjonction de  $MgCl_2$ ) les points représentant les  $k_{obs}$  se situent sur une courbe à allure sigmoïde pour les valeurs obtenues à pH inférieur à 9. L'ordre par rapport au nucléophile (l'ion hydroxyle) est donc différent de 1 dans tous les cas (tableau 2)

Substrat	a	ordre / $[OH^-]$
<u>3a</u> = $10^{-3}$ M	0,83 ± 0,02	
<u>3b</u> = $10^{-4}$ M	sans $MgCl_2$	0,87 ± 0,02
	avec $MgCl_2$	0,72 ± 0,02
<u>3c</u> = $10^{-4}$	sans $MgCl_2$	0,89 ± 0,02
	avec $MgCl_2$	0,73 ± 0,02

Tableau 2. Ordre de la réaction d'hydrolyse par rapport à l'ion  $OH^-$  dans le cas des substrats 3a, 3b et 3c. Pour les deux derniers substrats l'ordre a été déterminé également en présence de  $MgCl_2$

La constante de vitesse apparente peut s'écrire sous la forme

$$k_{obs} = q [OH^-]^a$$

c - Influence des ions magnésium

Une première étude a été réalisée avec le substrat 3a ( $10^{-3}M$ ), la concentration en  $MgCl_2$  variant de 0 à 0,3 M, le pH étant maintenu constant à la valeur 9,50 ainsi que la force ionique, par adjonction de chlorure de sodium (figure 3). C'est donc bien un effet spécifique de cation divalent qui est recherché

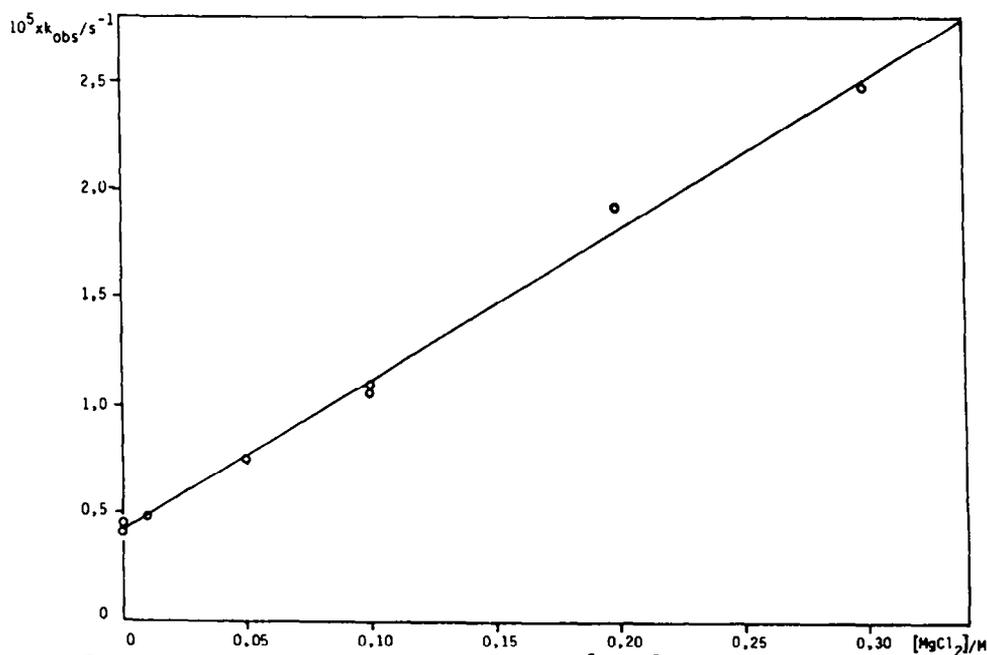


Figure 3. Variation de  $k_{obs}$  en fonction de  $[MgCl_2]$  dans le cas du substrat 3a

$$[3a] = 10^{-3}M, [borax] = 5 \cdot 10^{-2}M, pH = 9,50, temp = 298 K, \frac{1}{T} = 0,4$$

L'accélération de la réaction d'hydrolyse par le sel de magnésium est définie comme suit

$$\gamma_X = \frac{k_{\text{obs}}^X}{k_{\text{obs}}^0}$$

$\gamma_X$  accélération de la réaction en présence de  $\text{MgCl}_2$  à la concentration  $X$

$k_{\text{obs}}^X$  constante de vitesse expérimentale avec  $[\text{MgCl}_2] = X$

$k_{\text{obs}}^0$  constante de vitesse expérimentale avec  $[\text{NaCl}] = 0,3 \text{ M}$

$k_{\text{obs}}$  est une fonction linéaire croissante de la concentration en  $\text{MgCl}_2$  dont l'équation est de la forme

$$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1}) = 7,00 \cdot 10^{-5} [\text{MgCl}_2] + 4,18 \cdot 10^{-6}$$

Les accélérations pour différentes concentrations en chlorure de magnésium sont les suivantes

$$\begin{array}{ll} \gamma_{0,01} = 1,17 & \gamma_{0,1} = 2,67 \\ \gamma_{0,05} = 1,84 & \gamma_{0,3} = 6,01 \end{array}$$

Nous avons également étudié l'influence de l'anion du sel de magnésium les différents sels utilisés sont les chlorure, perchlorate et sulfate, ils ont des effets voisins sur la réaction étudiée ( $\text{pH} = 9,50$   $\gamma = 0,4$ ,  $[\text{Mg}^{++}] = 0,1 \text{ M}$ ) Les valeurs de  $\gamma_{0,1}$  sont respectivement égales à 2,67, 2,15 et 1,86

Avec le substrat 3b ( $10^{-4} \text{ M}$ ) le domaine de concentration en  $\text{MgCl}_2$  étudié varie entre 0 et 0,1 M, les pH entre 8,50 et 9,80, la force ionique est maintenue constante à 0,4 (figure 4)

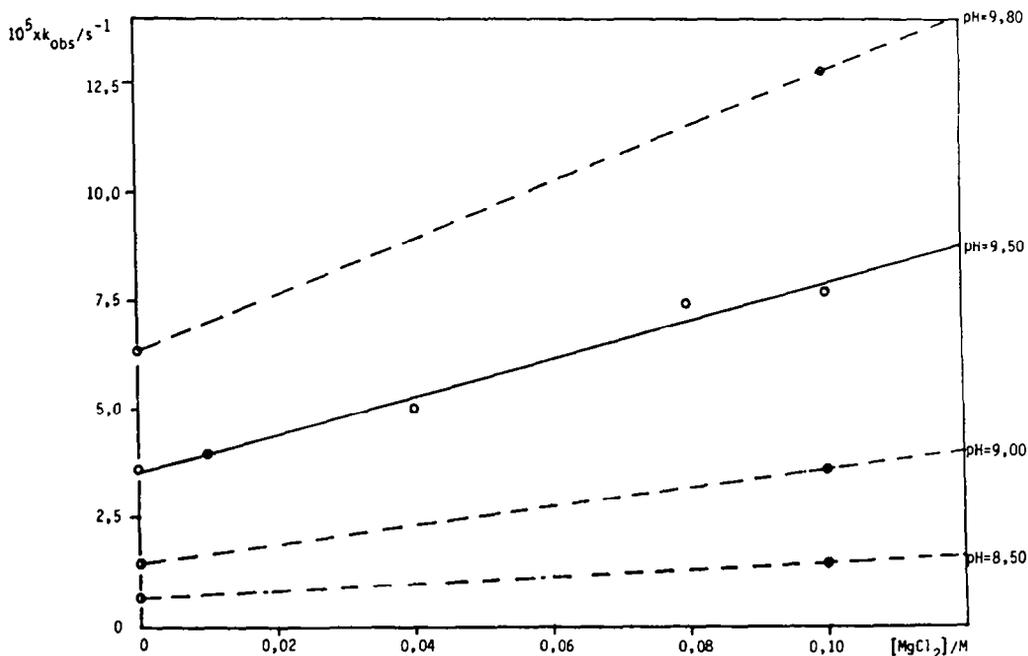


Figure 4 Variation de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de  $[\text{MgCl}_2]$  à différents pH dans le cas du substrat 3b. La linéarité de la relation a été établie à pH 9,50 et a été supposée également vraie pour les autres pH (courbes en pointillés)

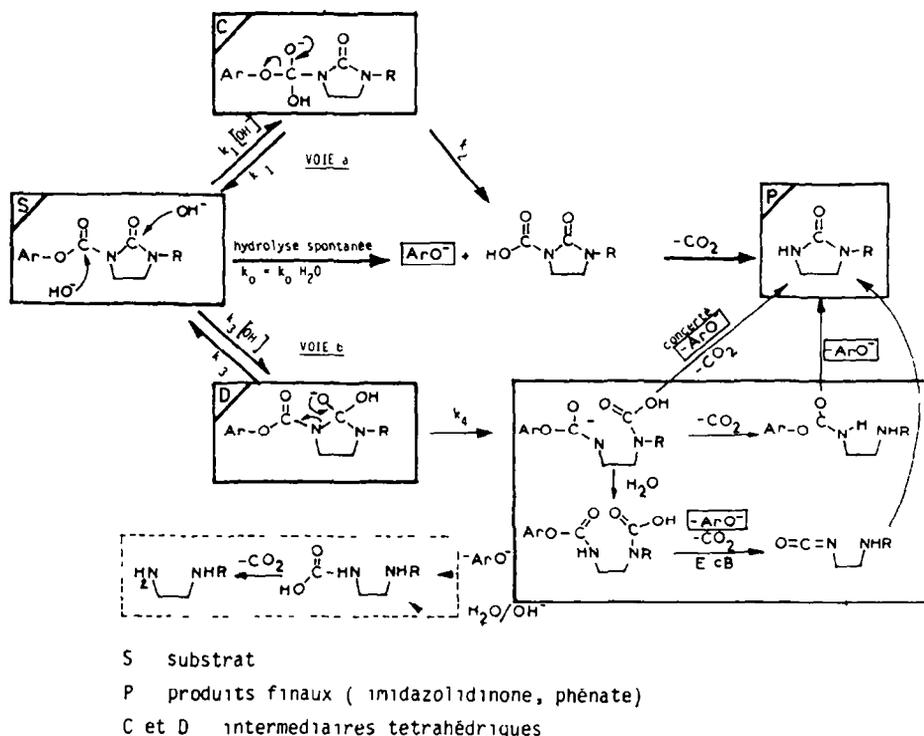
Dans tous les cas la constante de vitesse expérimentale est une fonction linéaire croissante de la concentration en magnésium, les pentes des droites  $k_{\text{obs}} = m[\text{MgCl}_2] + n$  sont données dans le tableau 3

L'accélération  $\gamma_{0,1}$  a été calculée aux différents pH, sa valeur est à peu près constante et égale à  $2,2 \pm 0,2$

Dans le cas du substrat 3a (groupe partant phénate) une accélération du même ordre de grandeur (2,67) est observée pour des rapports de concentrations magnésium/substrat 10 fois plus faibles, il y a donc une relation entre l'effet du cation métallique et la nature du groupe partant



- une compétition entre une attaque nucléophile sur carbonyle "ester" (extracyclique) et le carbonyle "uréido" (intracyclique) des substrats (schéma 4)



Schema 4

Ce dernier mécanisme implique le passage par deux intermédiaires réactionnels tétraédriques, l'attaque de OH<sup>-</sup> sur le carbonyle "ester" devant être a priori prépondérante sur celle du carbonyle "uréido" <sup>10</sup>

Les produits résultant de ce schéma réactionnel sont, en plus de l'ion ArO<sup>-</sup>, la 2-imidazolidinone et l'éthylène diamine, la première résultant soit d'une décarboxylation rapide de l'acide allophanique (voie a) soit de la cyclisation d'un intermédiaire diamine N-carboxylée ou isocyanate (voie b) (schéma 4)

L'éthylènediamine, dont la présence pouvait traduire sans ambiguïté l'existence de la voie b, n'a pas été détectée. Cela ne nous permet pas d'exclure cette voie car la cyclisation des deux intermédiaires possibles doit être extrêmement rapide <sup>13</sup> et dans ces conditions le seul produit formé par cette voie est en fait une 2-imidazolidinone. La compétition entre les deux voies a et b ne peut donc être établie par l'analyse des produits de la réaction.

Equations cinétiques des mécanismes proposés

L'hypothèse de l'état stationnaire appliquée à l'intermédiaire I du schéma 3 donne

$$k_{obs} = \frac{(k_3 + k_4[H^+]) (k_1 + k_2[OH^-])}{(k_4 + k_{-1})[H^+] + (k_3 + k_{-2})}$$

avec  $K_w = [H^+][OH^-]$   
 ce qui devient  $k_{obs} = \frac{[OH^-]^2 (k_2k_3) + [OH^-] (k_1k_3 + k_2k_4K_w) + (k_1k_4K_w)}{[OH^-] (k_{-2} + k_3) + (k_4 + k_{-1})K_w}$

qui est de la forme  $k_{\text{obs}} = \frac{a[\text{OH}^-]^2 + b[\text{OH}^-] + c}{d[\text{OH}^-] + e}$

Pour le schéma 4 nous ferons les hypothèses suivantes Les concentrations des espèces autres que S, C, D et P sont négligeables et cinétiquement non déterminantes, l'étape correspondant à la constante de vitesse  $k_4$  est la réaction la plus lente de l'ensemble des réactions postérieures à la formation de l'intermédiaire tétrahédrique D, l'ouverture du cycle ( $k_4$ ) est vraisemblablement plus lente que la décarboxylation (concertée ou non) et que la cyclisation. La conservation de la masse s'écrit

$$[S_0] - [P] = [S] + [C] + [D]$$

$S_0$  représente la concentration initiale en substrat

$$\begin{aligned} \frac{d[P]}{dt} &= \frac{-d([S_0] - [P])}{dt} = \frac{-d[S] + [C] + [D]}{dt} \\ -\frac{d[S]}{dt} &= (k_0 + k_1[\text{OH}^-] + k_3[\text{OH}^-])[S] - k_{-1}[C] - k_{-3}[D] \\ -\frac{d[C]}{dt} &= (k_{-1} + k_2)[C] - k_1[\text{OH}^-][S] \\ -\frac{d[D]}{dt} &= (k_{-3} + k_4)[D] - k_3[\text{OH}^-][S] \\ \frac{d[P]}{dt} &= \frac{-d([S] + [C] + [D])}{dt} = k_0[S] + k_2[C] + k_4[D] \quad (1) \end{aligned}$$

D'autre part la variation suivie expérimentalement est

$$-\frac{d([S_0] - [P])}{dt} = k_{\text{obs}}([S_0] - [P])$$

en identifiant cette équation devient

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{\text{obs}}([S] + [C] + [D]) \quad (2)$$

La combinaison des équations (1) et (2) donne

$$k_0[S] + k_2[C] + k_4[D] = k_{\text{obs}}([S] + [C] + [D])$$

L'hypothèse de l'état stationnaire sur C et D conduit à l'équation

$$k_{\text{obs}} = \frac{\frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_3 k_4}{k_{-3} + k_4} [\text{OH}^-] + k_0}{\frac{k_1}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_3}{k_{-3} + k_4} [\text{OH}^-] + 1}$$

qui est de la forme  $k_{\text{obs}} = \frac{a[\text{OH}^-] + b}{c[\text{OH}^-] + d}$

Les courbes de "profil de pH" (figure 2) s'avèrent insuffisantes pour analyser ce mécanisme. En effet l'étude cinétique est limitée à une zone restreinte de pH d'une part en raison de la vitesse trop faible des réactions à faible pH, d'autre part à cause de la précipitation de l'hydroxyde de magnésium à pH trop élevé lorsque les réactions sont étudiées en présence de cet ion métallique. Nous nous sommes aidés du traitement informatique des données expérimentales pour tenter de résoudre le problème.

Discrimination de modèles mathématiques  $k_{\text{obs}} = f([\text{OH}^-])$

Pour chacune des cinq séries de valeurs expérimentales correspondant aux substrats 3a, 3b, 3b/Mg<sup>++</sup>, 3c et 3c/Mg<sup>++</sup>, six modélisations, par des fonctions correspondant à diverses possibilités de mécanisme, ont été étudiées<sup>14a</sup>. A titre d'exemple les résultats des meilleurs traitements obtenus à l'aide du programme de lissage VA04A<sup>14b</sup> pour le substrat 3b sont donnés (figures 5 et 6) pour montrer les critères de discrimination choisis, pour cela, plusieurs équations sont testées en fonction de leur accord avec les données expérimentales. Les différents modèles essayés sont

$$\begin{array}{ll}
 M_1 & k_{\text{obs}} = a[\text{OH}^-] \\
 M_2 & k_{\text{obs}} = a[\text{OH}^-] + b \\
 M_3 & k_{\text{obs}} = a[\text{OH}^-]^b \\
 M_4 & k_{\text{obs}} = \frac{a[\text{OH}^-]}{b[\text{OH}^-] + c} \\
 M_5 & k_{\text{obs}} = \frac{a[\text{OH}^-] + b}{c[\text{OH}^-] + d} \\
 M_6 & k_{\text{obs}} = \frac{a[\text{OH}^-]^2 + b[\text{OH}^-] + c}{d[\text{OH}^-] + e}
 \end{array}$$

Les critères de sélection que nous avons retenus sont basés à la fois sur la répartition suffisamment aléatoire des points expérimentaux par rapport à la courbe calculée et sur la minimisation de la somme des carrés des écarts relatifs entre valeurs expérimentales et calculées.

Les meilleurs accords obtenus correspondent précisément aux modèles  $M_5$  (schéma 4) et  $M_6$  (schéma 3), figures 5 et 6. Le modèle  $M_3$  donne un traitement assez satisfaisant mais ne correspond à aucun schéma cinétique envisageable.

Dans le cas du schéma 3

$$k_{\text{obs}} = \frac{a[\text{OH}^-]^2 + b[\text{OH}^-] + c}{d[\text{OH}^-] + e}$$

les valeurs calculées des paramètres permettent d'estimer certaines des constantes de vitesse

$$\begin{aligned}
 a &= k_2 k_3 = 381 \\
 b &= k_1 k_3 + k_2 k_4 \cdot 10^{-14} = 1,65 \\
 c &= k_1 k_4 \cdot 10^{-14} = 5,76 \cdot 10^{-6} \\
 d &= k_{-2} + k_3 = 817 \\
 e &= (k_4 + k_{-1}) \cdot 10^{-14} = 1,59
 \end{aligned}$$

Il nous semble possible de faire les hypothèses suivantes

$$k_4 \gg k_{-1} \quad \text{et} \quad k_3 \gg k_{-2}$$

en effet le  $pK_a$  du groupe partant  $\text{ArO}^-$  ( $pK_a \text{ pNO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH/pNO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O}^- = 7,2$ ) est très inférieur à celui du groupe partant  $\text{OH}^-$  ( $pK_a \text{ H}_2\text{O/OH}^- = 15,74$ ). Il en résulterait que

$$\begin{aligned}
 d &\simeq k_3 \simeq 820 \text{ s}^{-1} \\
 e \cdot 10^{14} &\simeq k_4 \simeq 1,6 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1} \\
 c/e &\simeq k_1 \simeq 3,6 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1} \\
 a/d &\simeq k_2 \simeq 0,47 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}
 \end{aligned}$$

Dans le cas du schéma 4 de la forme  $k_{\text{obs}} = \frac{a[\text{OH}^-] + b}{c[\text{OH}^-] + d}$

étant donné la complexité du schéma réactionnel, il n'est possible d'évaluer que certaines constantes de vitesse ( $k_0$  et  $k_1$ ) et de proposer un classement pour les autres, en se basant sur des considérations de réactivités chimiques.

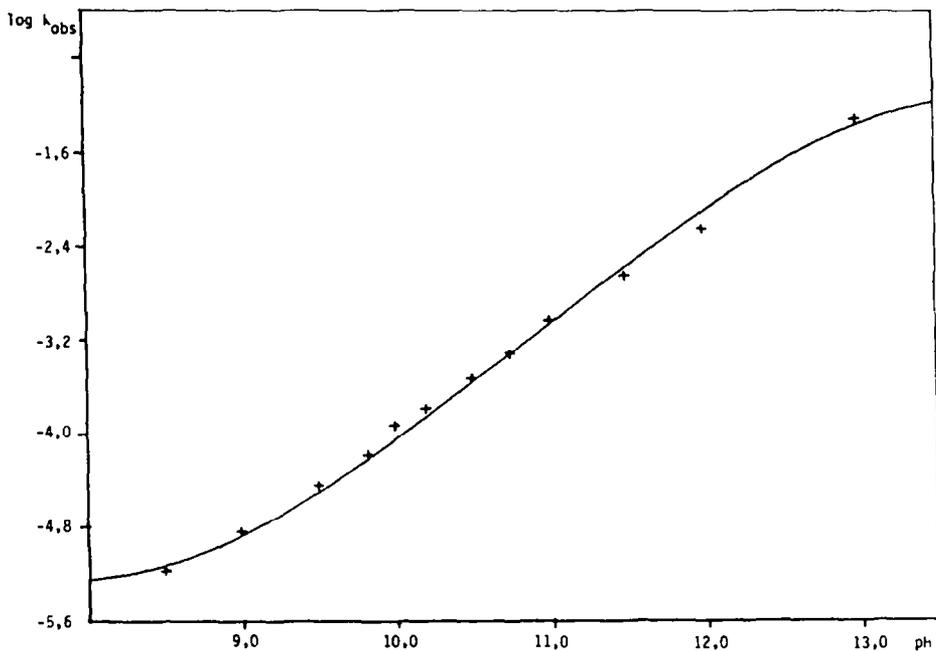


Figure 5 Modélisation de l'hydrolyse du substrat 3b par le modèle M5

$$k_{\text{obs}} = \frac{a [\text{OH}^-] + b}{c [\text{OH}^-] + d}$$

+ points expérimentaux Valeurs des coefficients calculés  $a = 1,15$ ,  
 $b = 6,56 \cdot 10^{-6}$ ,  $c = 13,7$ ,  $d = 1,37$

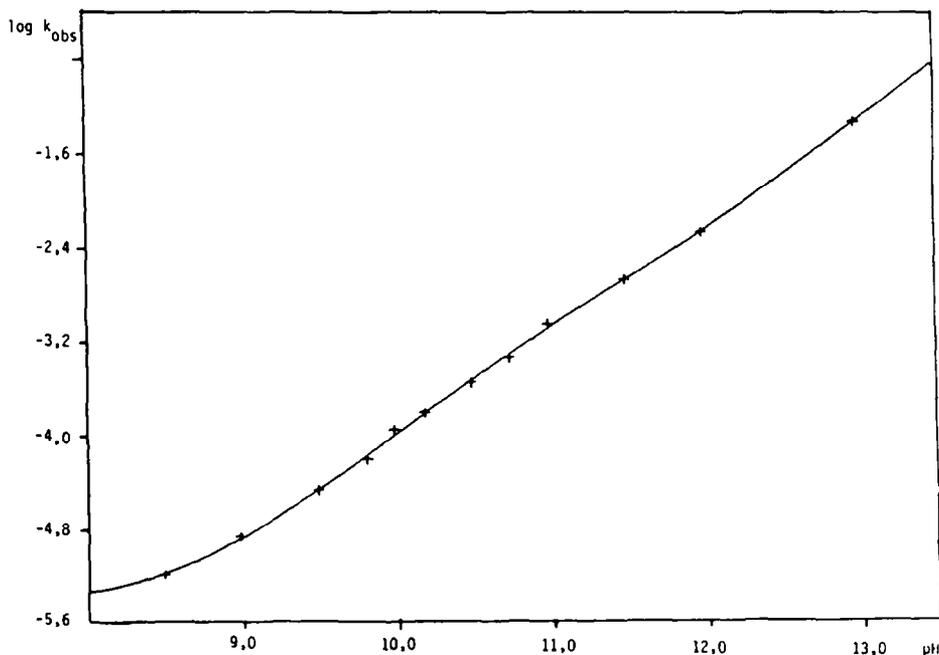


Figure 6 Modélisation de l'hydrolyse du substrat 3b par le modèle M6

$$k_{\text{obs}} = \frac{a[\text{OH}^-]^2 + b[\text{OH}^-] + c}{d[\text{OH}^-] + e}$$

+ points expérimentaux Valeurs des coefficients calculés  $a = 381$ ,  
 $b = 1,65$ ,  $c = 5,76 \cdot 10^{-6}$ ,  $d = 817$ ,  $e = 1,59$

$$b/d = k_0 = 4,79 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

$$a/d = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_3 k_4}{k_{-3} + k_4} \approx 0,84 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

$$c/d = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_3}{k_{-3} + k_4} \approx 10 \text{ M}^{-1}$$

Nous ferons les hypothèses suivantes  $k_2 \gg k_{-1}$ , en effet, comme nous l'avons signalé plus haut le  $pK_a$  du groupe partant (paranitrophénate) est inférieur à celui du groupe partant  $\text{OH}^-$ , d'autre part la voie a est majoritaire par rapport à la voie b ( $k_1 \gg k_3$ )

$$\frac{k_3 k_4}{k_{-3} + k_4} < k_3 \text{ et } \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \approx k_1 \Rightarrow a/d \quad k_1 \approx 0,84 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

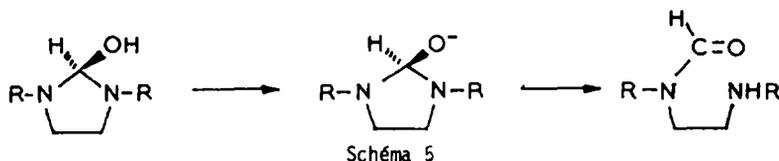
Ces hypothèses sont en accord avec une estimation précédemment publiée<sup>15</sup> D'autre part  $k_2 \gg k_1[\text{OH}^-]$  puisque dans le cas d'un bon groupe partant ( $\text{ArO}^-$ ), l'étape lente est la formation de l'intermédiaire

$k_4$  et  $k_{-3}$  peuvent être, à priori, du même ordre de grandeur l'ion hydroxyde (constante  $k_{-3}$ ) pourrait être un meilleur groupe partant que l'anion carboxydiamine (constante  $k_4$ ), mais cette différence doit être faible à cause de l'énergie de tension libérée lors de l'ouverture de cycle. Les constantes  $k_{-1}$  et  $k_{-3}$  qui correspondent au départ du même groupe  $\text{OH}^-$  à partir des intermédiaires tétraédriques C et D respectivement, devraient être du même ordre de grandeur. Nous pouvons donc proposer le classement suivant

$$k_3[\text{OH}^-] < k_1[\text{OH}^-] \ll k_2 \quad \text{et} \quad k_{-1} \approx k_{-3} \approx k_4 \ll k_2$$

Il serait bien sûr intéressant de pouvoir comparer les valeurs des constantes de vitesse déterminées ici dans le cas de l'un et l'autre schéma, avec celles de réactions équivalentes de la littérature

Une situation approchante est présentée ci-dessous (schéma 5)



dans laquelle la constante  $k_2$  d'ouverture du cycle ( $180 \text{ s}^{-1}$ )<sup>16</sup> est bien entendu compatible avec les estimations faites à partir du schéma cinétique 4, mais elle est également du même ordre de grandeur que la constante de vitesse  $k_3$  qui correspond à la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique du schéma 3

Bien que cette voie ne permette pas d'accéder à toutes les constantes de vitesse, on peut cependant noter l'intérêt des méthodes de modélisation en tant qu'outil de résolution de systèmes cinétiques complexes en effet dans notre cas il est clair que le meilleur accord entre points expérimentaux et modèles testés est obtenu avec les deux modèles chimiques retenus

La distinction entre ces deux derniers doit être faite avec d'autres critères, l'analyse des produits de fin de réaction ne peut être utilisée, les deux voies conduisant aux mêmes produits

Le seul critère distinctif est celui d'absence de catalyse générale, argument qui privilégie le schéma 4 par rapport au schéma 3. Bien que ce critère reste isolé notons qu'il va dans le même sens que d'autres résultats de la littérature

- l'observation faite par d'autres auteurs<sup>25</sup> de l'absence de catalyse générale dans l'hydrolyse d'autres allophanates

- le fait que dans le cas de partition d'intermédiaires tétraédriques entre réactifs et produits - c'est celui illustré par le schéma 3 - une catalyse acido-basique générale est observée<sup>22</sup>

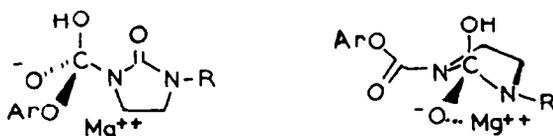
### Rôle du cation $Mg^{++}$ sur l'hydrolyse des esters allophaniques

Les résultats précédents montrent qu'un sel de magnésium catalyse la réaction d'hydrolyse des esters étudiés cet effet du cation n'est pas simplement un "effet de sel" (la force ionique est maintenue constante) Nous avons observé que l'effet catalytique de  $Mg^{++}$  est d'autant plus grand que sa concentration augmente à force ionique constante et d'autre part que l'ordre de la réaction, par rapport à  $OH^-$ , est diminué en présence de cet ion

Le magnésium peut intervenir à différents niveaux aussi bien dans le schéma 3 que dans le schéma 4

a) Le cation peut chélater les deux groupes carbonyles du substrat dans l'état fondamental De telles chélation ont été mises en évidence<sup>17</sup> par spectroscopie IR et par RMN  $^{13}C$  et décrits également pour d'autres ions métalliques<sup>18</sup>  $Zn^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Fe^{3+}$  et  $Co^{3+}$  Dans tous les cas, excepté l'ion cobalt, ces complexes sont de type  $L_2M$  (L = ligand imidazolidinone) On peut prévoir que cette chélation aura pour effet d'une part d'augmenter l'électrophilie des atomes de carbone des groupes carbonyles et d'autre part de stabiliser l'état fondamental du substrat

b) Le cation peut interagir sur l'état de transition avec la charge négative qui se développe sur l'un ou l'autre des carbonyles (schéma 6)



Schema 6

L'effet global se traduira par une augmentation de la vitesse de réaction, si le terme stabilisation de l'état de transition est prépondérant, ce qui est en général le cas, la charge étant plus forte dans l'état de transition que dans l'état fondamental

c) On peut prévoir un effet sur l'ouverture du cycle uréido (schéma 4), si l'étape postérieure à la formation de l'intermédiaire tétrahédrique est lente, ce doit être le cas puisque l'amidure qui se forme lors de cette ouverture est un mauvais groupe partant. Dans ce cas, l'ion métallique doit intervenir en stabilisant ce dernier

Les résultats cinétiques doivent être analysés en tenant compte de ces remarques

L'accélération observée en présence du cation  $Mg^{++}$  (voisine de 2 pour un rapport  $Mg^{++}$ /substrat de 100 pour 3a (figure 3) et 1000 pour 3b (figure 4) et 3c, à force ionique constante) doit avoir pour origine des structures chélatées. Il est connu que les cations divalents n'activent pas le groupe carbonyle des esters phénoliques vis-à-vis de l'attaque nucléophile<sup>19</sup> même lorsque le sel métallique est, comme dans notre cas, en grand excès par rapport au substrat

La relative modicité des effets observés ici doit être due à la compétition entre l'accélération résultant de la complexation du substrat (surtout dans l'état de transition) par le métal et l'inhibition due à celle du nucléophile  $OH^-$

Cette remarque peut s'appuyer sur des résultats relatifs à l'hydrolyse basique d'esters aliphatiques en présence de cations divalents<sup>20</sup> aucun effet n'est observé en présence d'ion calcium dont la constante d'association avec l'ion  $OH^-$  est assez élevée ( $K = 20 M^{-1}$ ) alors qu'une accélération de 10% (jugée notable) est obtenue avec l'ion barium (moins associé à la base). La comparaison des constantes d'association entre  $OH^-$  et le cation  $Ca^{++}$  d'une part et entre  $OH^-$  et le cation  $Mg^{++}$  ( $K = 380 M^{-1}$ ) d'autre part, peut expliquer nos résultats

Les effets observés sur la sélectivité méritent d'être soulignés comme cela a été indiqué (voir § c) ci-dessus), l'effet du magnésium est plus marqué pour le groupe partant phénate que pour le paranitrophénate. Le fait d'observer un effet catalytique plus marqué avec un moins bon groupe partant, plus basique, pourrait traduire une complexation du cation  $Mg^{++}$  sur le groupe

partant Notons toutefois qu'aucun changement de mécanisme n'a été mis en évidence en présence de cations métalliques, celui-ci ne pouvant être montré par l'analyse des produits puisque les coupures b' et b" (schéma 7) conduisent à la formation des mêmes entités, phénate, anhydride carbonique et 2-imidazolindione substituée

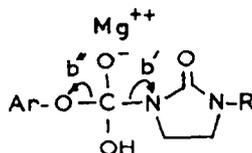


Schéma 7

Ce travail sera donc poursuivi avec l'étude d'autres nucléophiles permettant de distinguer les deux modes de coupure et un éventuel rôle du cation sur l'un ou l'autre des processus, comme cela a été précédemment proposé <sup>11</sup>

Par ailleurs, le fait que l'écart à l'ordre 1 soit augmenté en présence de cations métalliques signifie que la sélectivité de l'hydrolyse est diminuée. En effet cet écart, traduisant un mécanisme plus complexe que la seule hydrolyse de la fonction ester, implique une réaction compétitive l'ouverture du cycle ureido (réaction favorisée par la présence d'un cation métallique comme cela a été mentionné précédemment)

Notons enfin que l'effet de cation est à peu près équivalent avec 3b et 3c c'est à dire indépendant de l'aptitude du substrat à s'énoliser (cas de 3b), ceci va à l'encontre du schéma proposé par MATSUMARA <sup>11</sup> cité précédemment, selon lequel l'effet du cation serait précisément de stabiliser une forme énolique du substrat

## CONCLUSION

L'étude de l'hydrolyse basique des allophanates cycliques modèles de carboxybiotine, fait apparaître les caractéristiques suivantes

- dépendance linéaire de la constante de vitesse apparente en fonction du pH, avec dans certains cas, amortissement de la courbe pour les plus faibles valeurs du pH du domaine étudié,
- absence de catalyse acido-basique générale, en accord avec ce qui est généralement observé pour l'hydrolyse des esters <sup>21</sup>
- mécanisme complexe qui peut être ramené à deux schémas possibles soit une variation du partage d'un intermédiaire tétraédrique entre réactifs et produits différents, selon les valeurs du pH, comme cela a été observé pour d'autres systèmes <sup>22</sup>, soit une compétition de l'attaque du nucléophile sur les deux groupes carbonyles du substrat

Bien qu'un choix définitif ne puisse être fait, l'absence de catalyse générale suggère que le schéma 4 est le plus probable

La réaction est accélérée de façon significative et spécifique par l'addition d'un cation divalent métallique, ce qui ne peut être confondu avec un effet de sel primaire, le choix a dû être limité au cation  $Mg^{++}$  dont l'effet catalytique est généralement faible comparé à celui obtenu avec d'autres cations métalliques, en particulier le zinc <sup>23</sup>, cette limite étant imposée par la précipitation des hydroxydes correspondants. Les mécanismes doivent être vraisemblablement complexes puisqu'en plus de ceux déjà mentionnés (sur la charge se développant dans l'état de transition) la complexation doit aussi concerner le groupe partant, puisque des effets différents sont observés selon la nature de ce dernier (l'ion phénate meilleur ligand que l'ion paranitrophénate)

Aucune interprétation cependant ne peut être donnée, pour l'instant, de l'action du cation sur la sélectivité de la coupure entre atomes d'azote et groupement carboxylate dans le cas du nucléophile  $OH^-$ . Ce travail est donc à poursuivre avec d'autres nucléophiles en particulier les amines, des essais préliminaires nous montrent qu'il s'agit là d'une situation plus favorable l'observation d'un ordre 1 strict par rapport au réactif, indique qu'il s'agit d'un mécanisme plus simple

Ce travail nous a permis de préciser la réactivité en milieu basique aqueux de ces esters allophaniques, un de nos objectifs ultérieurs est la comparaison avec un milieu organique, plus proche de la situation enzymatique ou l'influence des cations doit être plus marquée

## PARTIE EXPERIMENTALE

Les cinétiques ont été suivies, à l'aide de spectromètre U V UNICAM S P 1800 et BECKMAN U V 5260 couplés aux calculateurs HEWLETT PACKARD 85 et TEKTRONIX 4051, par l'apparition de la bande d'absorption de l'ion phénate (275 nm) ou paranitrophenate (400 nm), les cuves sont thermostatées à  $25 \pm 0,1$  °C La concentration des substrats est de  $10^{-3}$  M pour 3a et  $10^{-4}$  M pour 3b et 3c La force ionique est maintenue constante par adjonction d'une quantité convenable de sel de sodium (chlorure ou perchlorate), suivant les expériences cinétiques deux valeurs de la force ionique ont été utilisées  $\mu = 0,4$  et 1

Les spectres infra-rouge ont été enregistrés sur un spectromètre PERKIN ELMER 683, les spectres RMN  $^1\text{H}$  ont été réalisés sur VARIAN T 60 (60 MHz) et BRUCKER WH (90 MHz) à transformée de FOURIER, référence TMS

Les solutions tampons ont été préparées à partir d'eau fraîchement bidistillée sur hydroxyde de sodium et permanganate de potassium

- Le tampon borax a été préparé à partir de tétraborate disodique ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  R P Normapur Prolabo), et d'une solution aqueuse de NaOH, saturée (12 N) (ceci afin d'éviter la solubilisation du carbonate de sodium qui se forme au contact de l'air), ou de HCl

Nous pouvons considérer que l'erreur d'ajustement du pH est de l'ordre de 0,02 unité pH. En faisant l'approximation à 1, pour l'ordre de la réaction par rapport à  $\text{OH}^-$ , dans les représentations graphiques

$\log_{10} k_{\text{obs}} = f(\text{pH})$ , une variation  $\text{dpH} = 0,02$  se traduira par

$$\log_{10} \left( \frac{k}{k'} \right) = 0,02 \Rightarrow \frac{k}{k'} = 10^{0,02} = 1,047$$

Une variation de pH de 0,02 unité se traduira donc par une modification de 4,7% de la constante de vitesse

L'erreur maximale sur le traitement des données cinétiques a été évaluée dans la plupart des cas Elle est en général de l'ordre de 1% et ne peut traduire, par exemple, l'écart aux conditions de pseudo-premier ordre par rapport au substrat (conditions que l'on s'est efforcé de réaliser en se plaçant en milieu tamponné ou en grand excès de base par rapport au substrat)

Nous avons confirmé la présence de 2-imidazolindione en chromatographie sur couche mince Par contre, aucune trace d'éthylène diamine ( $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NHR}$ ) n'a été décelée, plusieurs essais ayant été réalisés, avec un échantillon de référence, par chromatographie en phase liquide (H P L C) et sur couche mince (C C M)

### Synthèse du N-phénoxy-carbonyl-1,2-imidazolindione 3a

Selon la méthode de SCHAEFFER et BHARGAVA <sup>24</sup>

Un mélange de 0,066 mole (10,3 g) de chloroformate de phényle fraîchement distillé (0,15 Torr = 74-78 °C) et de 0,066 moles (5,68 g) de 2-imidazolindione est porté à reflux dans 80 ml de chloroforme, séché sur tamis, et agité pendant 45 heures (fin de dégagement de HCl)

Le mélange est refroidi puis filtré, on récupère 7,42 g de cristaux blancs, qui, recristallisés à chaud dans le chloroforme, fournissent 0,75 g de produit dont le point de fusion est 191 °C (litt 189 °C <sup>24</sup>, 190-193 °C <sup>7</sup>) IR (KBr) 3250 (N-H), 1795 (C(O)-N), 1700 (N-C(O)-N),  $\text{cm}^{-1}$  Rendement 55% U V ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  257 (2,37), 2,59 (2,39), 265 (2,28), nm (log  $\epsilon$ ) RMN  $^1\text{H}$  (DMSO  $d_6$ ) 3,43 et 4,0 (4H, 2m), 7,3 (1H, s), 7,4 (5H, m) CCM R<sub>f</sub> 0,17 (silice 60 F 254 Merck,  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3 - 85/15$ ) Trouvé C, 58,26, H, 4,98, N, 13,76, O, 23,35 Calc Pour  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$  C, 58,25, H, 4,85, N, 13,59, O, 23,30 %

### Synthèse du N-carboxy-paranitrophényl-2-imidazolindione 3b

Selon la méthode de CAPLOW <sup>7</sup>

Un mélange de 0,021 mole (4,23g) de chloroformate de paranitrophényle et de 0,020 mole (1,72g) de 2-imidazolindione est porté à reflux dans 24 ml de chloroforme, séché sur tamis, pendant 9 heures (fin de dégagement de HCl)

Après refroidissement, la solution est évaporée sous vide et l'on obtient environ 4g de produit que l'on recristallise dans un mélange eau/éthanol (1/1) Après séchage et lavage au n-pentane, nous obtenons des cristaux blancs (2,58g) dont le point de fusion est 230 °C (litt 228-230 °C) Rendement après recristallisation 61% IR (KBr) 3255 (N-H), 1785-1805 (C(O)-N), 1695 (N-C(O)-N),  $\text{cm}^{-1}$  U V ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  271 (4,04), nm (log  $\epsilon$ ) RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) 3,52 et 4,02 (4H, AB, J<sub>AB</sub> = 8 Hz), 5,78 (1H, s), 7,45 et 8,32 (4H, AB, J<sub>AB</sub> = 9 Hz) CCM R<sub>f</sub> 0,16 (Silice 60 F 254 Merck,  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3 - 85/15$ ) Trouvé C, 47,85, H, 3,62, N, 16,13, O, 32,20 Calc pour  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_5$  C, 47,81, H, 3,59, N, 16,73, O, 31,87 %

### Synthèse du 1N-paranitrophénoxy-carbonyl-3N-méthyl-2-imidazolindione 3c

Un mélange de 0,01 mole (2,02g) de chloroformate de paranitrophényle et de 0,01 mole (1g) de N-méthyl-2-imidazolindione est porté à reflux dans 25ml de dichlorométhane séché sur tamis, après environ 4 jours, on refroidit et par filtration 2,54g de cristaux sont récupérés Rendement 95%

Le produit obtenu est recristallisé dans le diméthylformamide, les cristaux obtenus ont un point de fusion de 182 °C

IR (KBr) 1785 (-C(O)-N), 1710 (N-C(O)-N),  $\text{cm}^{-1}$  UV (CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\text{max}}$  272 (4,16), nm. (log  $\epsilon$ )  
 RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 3,56 et 3,93 (4H, AB, J<sub>AB</sub> = 7 Hz), 3,1 (3H, s), 7,41 et 8,28 (4H, AB, J<sub>AB</sub> = 9Hz)  
 CCM Rf 0,49 (Silice 60 F 254 Merck, CHCl<sub>3</sub>/COCH<sub>3</sub> - 85/15) (Trouvé C, 49,90, H, 4,09, N, 15,86, O, 30,14 Calc C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> C, 49,81, H, 4,15, N, 15,85, O, 30,19 %)

## REMERCIEMENTS

Mme C VIDAL, MM J C MICHEAU et D LAVABRE pour leurs conseils et leur aide pour la partie traitement des données, Mr le Professeur J FASTREZ, de l'Université de LOUVAIN pour ses suggestions concernant les schémas cinétiques

## BIBLIOGRAPHIE

- 1) H G WOOD, Trends in biochemical Sciences, 1, 4 (1976)
- 2) H G WOOD, R E BARDEN, Ann Rev Biochem, 46, 385 (1977)
- 3) C M VISSER, R.M KELLOGG, Bioorg Chem, 7, 79 (1977)
- 4) M J WIMMER, J A ROSE, Ann Rev Biochem, 47, 1031 (1978)
- 5) C BLONSKI, Thèse de Doctorat de 3ème cycle n° 2846 de l'Université P Sabatier, Toulouse, France, 11 juillet 1983
- 6) J MOSS, M D LANE, "Advances in Enzymology", 35, 321 (1971)
- 7) M CAPLOW, J Am Chem Soc, 87, 5774 (1965)
- 8) M CAPLOW, M JAGER, J Am Chem Soc, 89, 4513 (1969)
- 9) J L JOHNSON, D L MORRISON, J Am Chem Soc, 94, 1323 (1972)
- 10) M J CRAVEY, H KOHN, J Am Chem Soc, 102, 3928 (1980)
- 11) N MATSUMARA, H KAWAI, Y OTSUJI, E IMOTO, Bull Soc Chim Japan, 50, 2417 (1977)
- 12) E MONNIER, A KLAEBE, J PERIE, Tetrahedron Letters, 24, 3067 (1983)
- 13) R E BARNETT, W P JENCKS, J Am Chem Soc, 91, 2358 (1969)
- 14) a - E MONNIER, Thèse de Docteur-Ingénieur n° 806 de l'Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 9 juillet 1982  
 b - M J D POWELL, Comp J, 155 (1964), adapté par P ANDRE, Thèse de 3ème cycle, n° d'ordre 1963, Université de Toulouse (1975)
- 15) H K HALL, M K BRANDT, R M MASON, J Am Chem Soc, 80, 6420 (1958)
- 16) D R ROBINSON, Tetrahedron Letters, 48, 5007 (1968)
- 17) H KONDO, D HORIGUCHI, S IKEDA, J SUNAMOTO, J Org Chem, 44, 4430 (1979)
- 18) R J BERNI, R R BENERITO, W M AYRES, H B JONASSEN, J Inorg Nucl Chem, 25, 807 (1963)
- 19) T H FIFE, T J PRYZSTAS, J Am Chem Soc, 102, 7297 (1980)
- 20) R P BELL, G M WAIND, J Chem Soc, 1979 (1950)
- 21) A J KIRBY, "Hydrolysis and formation of esters of organic acids", in Comprehensive Chemical Kinetics, C H BAMFORD, C F H TIPPER, Elsevier, Londres (1972)
- 22) G M BLACKBURN, W P JENCKS, J Am Chem Soc, 90, 2638 (1968)
- 23) M F DUNN, in Structure and Bonding, 23, 61, Springer Verlag, Berlin (1975)
- 24) H J SHAEFFER, P S BHARGAVA, J Pharm Sci, 53, 137 (1964)
- 25) M M AL SABBAGH, M CALMON, J P CALMON, J Chem Soc, Perkin-Trans II, 1233 (1984)