Tetrahedron Letters,Vol.23,No.15,pp 1573-1576,1982 0040-4039/82/151573-04$03.00/0
Printed in Great Britain ©1982 Pergamon Press Ltd.

ORTHO-HYDROXYLATION SELECTIVE DES PHENOLS : I - VERS UN MODELE CHIMIQUE SIMPLE DES TYROSINASES.

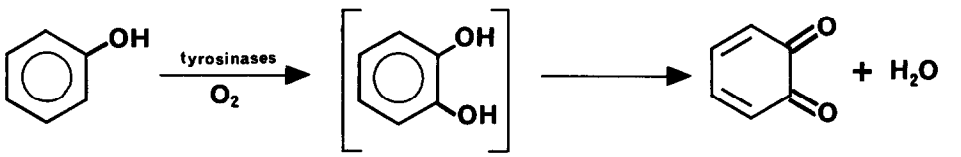
Patrice CAPDEVIELLE et Michel MAUMY

Laboratoire de Recherches Organiques de l'E.S.P.C.I.
(CNRS - ERA N°170) - 10 rue Vauquelin, 75231 - PARIS CEDEX 05

Abstract : The oxydation of cuprous phenoxides by molecular oxygen gives rise to catechols and ortho-benzoquinones. Such a new reaction provides a mechanistic approach to tyrosinase catalyzed oxidation of phenols.

Les tyrosinases (ou phénolases), métallo-enzymes dont le site actif comporte deux atomes de cuivre voisins [1], catalysent l'oxydation des phénols en *ortho*-benzoquinones, par l'intermédiaire de catéchols, en "activant" une molécule d'oxygène (fig. 1).

fig.1



Le mécanisme de l'ortho-hydroxylation sélective qui constitue la première étape n'avait pas encore été établi ; il pourrait s'apparenter aux quelques exemples connus d'oxydation chimique en *ortho* des phénols qui tous font appel à la formation d'un intermédiaire de structure générale **a** (fig. 2) dont l'évolution est schématisée ci-dessous :

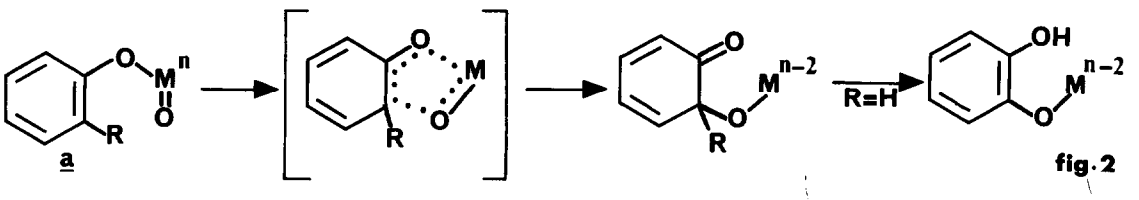


fig.2

L'exemple le plus directement comparable est l'oxydation des phénols par l'anhydride phénylsélénique selon BARTON et collaborateurs [2] [M = Se, n = 4, R = H] . On peut également assimiler à ce type de mécanisme cyclique (comme l'ont suggéré ADLER et coll. [3] puis KAISER et coll. [4]) les oxydations des catéchols (R = OH) ou des guaïacols ($R = OCH_3$) par les periodates, qui conduisent aux *ortho*-benzoquinones [5] [M = I, n = 7] . De même, la formation initiale de dérivés phénoliques de Pb^{IV}, $[Ar\text{-}O\text{-}Pb(OAc)_3]$ et leur évolution selon un mécanisme concerté rendent compte de la réaction d'*ortho*-acétoxylation des phénols par $Pb(OAc)_4$ selon CRIEGEE [6].

On peut donc supposer que le mécanisme d'action des tyrosinases fait intervenir une telle réaction cyclique d'oxydo-réduction à deux électrons, avec intervention de cuivre trivalent [M = Cu, n = 3] (fig. 2). Cette dernière hypothèse répond au fait que les deux atomes de cuivre des tyrosinases se trouvent initialement au degré d'oxydation + 1, tandis que la réduction d'une molécule d'oxygène (O_2) fait intervenir 4 électrons selon :

$$2\ X\text{-}Cu^{I} + O_2 \longrightarrow \left[X\text{-}Cu^{II}\text{-}O\text{-}O\text{-}Cu^{II}\text{-}X\right] \longrightarrow 2\ X\text{-}Cu^{III}\text{=}O$$

On observe, par ailleurs [7], que l'autoxydation des sels cuivreux dans les solvants aprotiques s'effectue suivant une loi cinétique d'ordre partiel 2 en Cu^{I}, en conformité avec la première étape de la réaction précédente.

Nous avons montré que l'action de l'oxygène sur des phénates cuivreux, préparés [8] au préalable sous atmosphère inerte, conduit effectivement à des produits *ortho*-hydroxylés puis à des orthoquinones (fig. 3) : le sel cuivreux du di-t-butyl-2,4 phénol **1**, en solution dans l'acétonitrile, évolue rapidement une fois mis en présence d'oxygène, même à -15°C. Des fractions aliquotes sont prélevées, hydrolysées et analysées par chromatographie liquide et/ou RMN. On constate ainsi que le premier produit formé est le di-t-butyl-3,5 catéchol **3** (fig. 3), en partie présent dans le milieu réactionnel sous forme de son sel cuivrique cyclique **2** ; la di-t-butyl-3,5 *ortho* benzoquinone **4** apparaît ensuite, puis enfin le dimère phénolique **5** [9], produit classique d'autoxydation du phénol **1** [10]. En considérant qu'il y a formation d'eau et d'espèces cuivriques parallèlement à la quinone **4**, on explique cette réaction parasite par l'hydrolyse du phénate cuivreux restant puis l'autoxydation du phénol **1** formé.

Le phénol **1** a été choisi en raison de la grande stabilité de la quinone **4** qui permet une étude complète du système. Des phénols non substitués en 2 et 4 permettent de

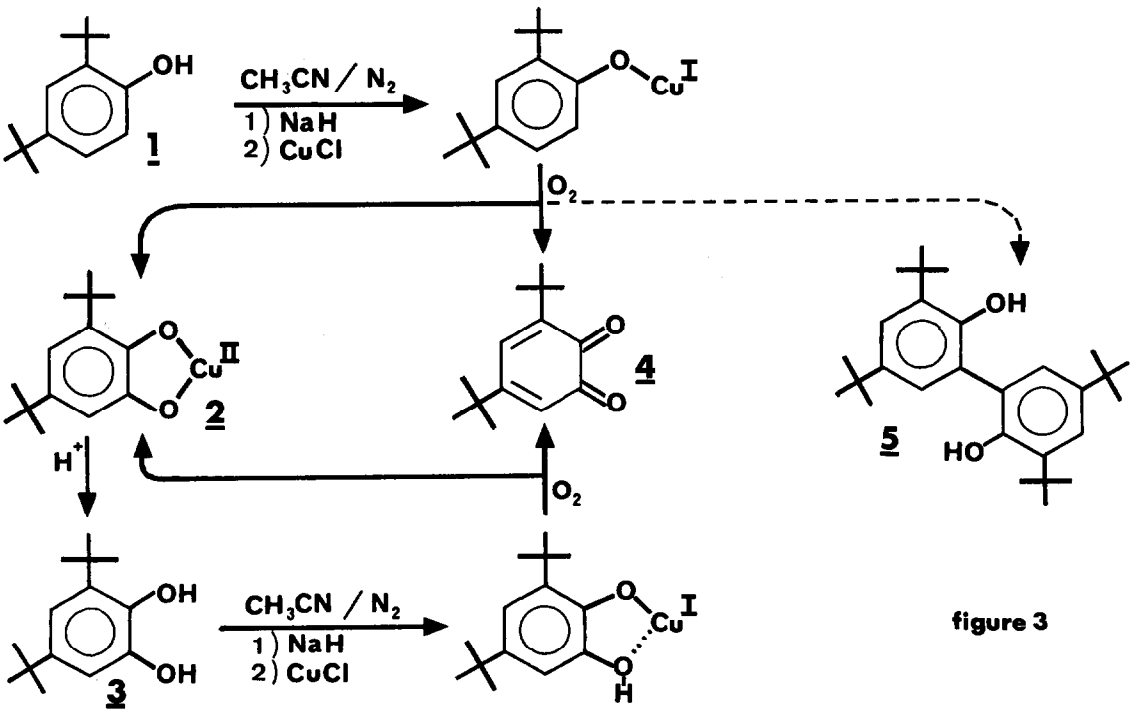


figure 3

constater la même sélectivité *ortho*, car ils conduisent également à des produits catécholiques et jamais à des hydroquinones.

Il était important de montrer que les catécholates cuivreux (produits de la figure 2 : M = Cu, n = 3) sont bien des intermédiaires dans le passage : phénol → ortho-quinone; le sel cuivreux du di-t-butyl-3,5 catéchol **3** est préparé dans l'acétonitrile sous atmosphère inerte (fig. 3) ; mis en présence d'oxygène, il se transforme rapidement, à 0°C, en catécholate cuivrique **2** et en ortho-quinone **4** présentant ainsi un comportement globalement analogue à celui du phénate cuivreux. L'ortho-hydroxylation des phénols par les tyrosinases pourrait donc être décrite par le schéma général de la figure 4.

A l'état initial (A), le site actif de l'enzyme est très grossièrement représenté par une cavité qui recèle deux atomes de cuivre au degré d'oxydation + I [11]. L'échange d'un proton phénolique avec un atome de Cu^{I} permet la formation d'un phénate cuivreux (état (B)) ; ceci explique que le cuivre des tyrosinases ne subisse un échange isotopique [12] avec ^{64}Cu que lorsque l'enzyme est impliqué dans la réaction d'oxydation des phénols car les atomes de Cu^{I} se trouvent alors labilisés.

L'oxydation de l'état (B) par une molécule d'oxygène fait passer les deux atomes de cuivre au degré d'oxydation III (état (C)) ; celui qui se trouve lié au phénol évolue selon la réaction cyclique d'oxydation du noyau aromatique précédemment envisagée et conduit à un catécholate cuivreux (état (D)).

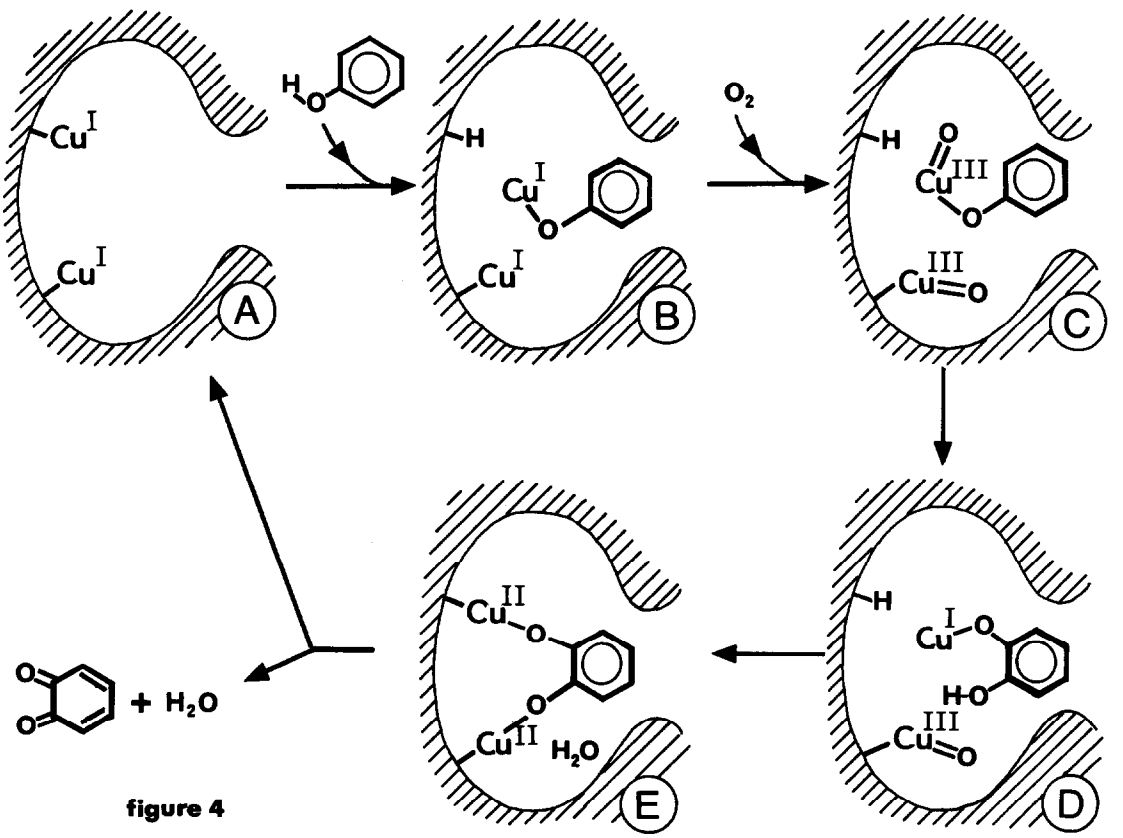
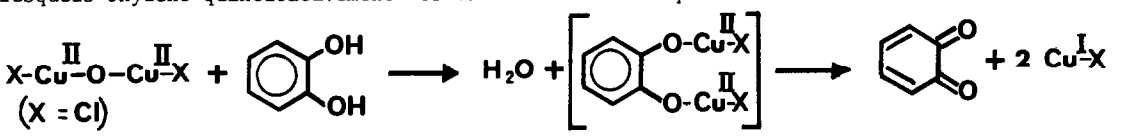


figure 4

L'atome de cuivre trivalent restant est responsable de la dernière étape d'oxydation. Nous avons observé [13] que de telles espèces réagissent avec les sels cuivreux par une réaction d'oxydo-réduction qui conduit à des complexes cuivriques μ-oxo :

$$X\text{-}Cu^{III}\text{=}O \;+\; Cu^{I}\text{-}X \longrightarrow X\text{-}Cu^{II}\text{-}O\text{-}Cu^{II}\text{-}X$$

lesquels oxydent quantitativement les catéchols en orthoquinones :



Le passage de l'état (D) à (E) correspond donc à une oxydo-réduction entre Cu^{I} et Cu^{III} avec formation de H_2O ; l'étape finale est l'oxydation du substrat catécholique en orthoquinone, qui régénère les deux atomes de Cu^{I} de l'état initial (A) et ferme ainsi le cycle catalytique.

Si l'on voulait disposer d'une réaction d'*ortho*-hydroxylation sélective réellement préparative (qui manque à l'arsenal synthétique) il était évidemment nécessaire, au cours de l'autoxydation des phénates cuivreux, d'éviter la formation d'ortho-benzoquinones souvent instables et de bloquer entièrement les catéchols formés sous forme de leurs sels cuivriques. Dans l'article suivant, nous décrivons un nouveau système catalytique que nous avons mis au point et qui réalise avantageusement cette transformation.

Bibliographie et Notes

1. N. MAKINO, P. Mc MAHILL, H.S. MASON et T.H. MOSS, J. Biol. Chem., 249, 6062 (1974) ; K. LERCH, F.E.B.S. Letter, 69, 157 (1976) ; W.H. VANNESTE et A. ZUBERBÜHLER, in "Molecular mechanisms of oxygen activation", O. HAYAISHI ed. Academic Press, 1974 p. 374 et références citées.
2. D.H.R. BARTON, A.G. BREWSTER, S.V. LEY et M.N. ROSENFELD, J. Chem. Soc., Chem. Comm., 985 (1976) ; D.H.R. BARTON, S.V. LEY, P.D. MAGNUS et M.N. ROSENFELD, J. Chem. Soc., Perkin Trans., 567 (1977).
3. E. ADLER, I. FALKEHAG et B. SMITH, Acta Chem. Scand., 16, 529 (1962).
4. E.T. KAISER et S.W. WEIDMAN, J. Amer. Chem. Soc., 86, 4354 (1964).
5. E. ADLER et S. HEMESTARN, Acta Chem. Scand., 9, 319 (1955) ; E. ADLER et R. MAGNUSSON, Acta Chem. Scand., 13, 505 (1959) ; E. ADLER, J. DAHLEN et G. WESTIN, Acta Chem. Scand., 14, 1580 (1960).
6. R. CRIEGEE, in "Oxidation in Organic Chemistry", K.B. WIBERG ed., vol. A, Academic Press, 277 (1965).
7. E. OCHIAI, Tetrahedron, 20, 1831 (1964) ; P. CAPDEVIELLE et M. MAUMY, Tetrahedron, à paraître.
8. Préparation : traitement des phénols (ou des catéchols) par un équivalent de NaH dans CH_3CN puis échange avec un équivalent de CuCl (précipitation de NaCl).
9. Bilan réactionnel : une expérience type d'oxydation du phénate cuivreux issu du phénol 1 est traitée par un réducteur ($SnCl_2$ en milieu chlorhydrique) ; les produits de la réaction sont extraits classiquement et séparés : on constate un taux de conversion de 66 % du phénol (1), des rendements de 78 % en catéchol (2) et de 20 % en dimère (4).
10. E. MÜLLER, R. MAYER, B. NARR, A. RIEKER et K. SCHEFFLER, Ann. 645, 25 (1961).
11. D. KERTÉSZ et R. ZITO, Biochim. Biophys. Acta, 96, 447 (1965).
12. H. DRESSLER et C.R. DAWSON, Biochim. Biophys. Acta, 45, 515 (1960).
13. M. MAUMY, P. CAPDEVIELLE, P. DOSTERT et M. LANGLOIS : brevet français, n° de dépôt 81.21606 (18 novembre 1981).

(Received in France 15 February 1982)