

# COMPORTEMENT DES OXYDES D'YNEPHOSPHINE ET DE L'ENEDIYNEPHOSPHINE SECONDAIRES EN PRESENCE D'UN MILIEU BIOLOGIQUE : ETUDES DES ACTIVITÉS VIS-A-VIS DE L'ADN

Guon BABA<sup>1\*</sup>, Séikou Amadou TOURE<sup>2</sup>, Jean-François CONSTANT<sup>3</sup>,  
Dnissa SISSOUMA<sup>2</sup>, Ané ADJOU<sup>2</sup>, Jean-Marc DENIS<sup>4</sup>, Jean LHOMME<sup>4</sup>,  
Célestin Gokou TEA<sup>1</sup> et Thomas Yao N'GUESSAN<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Département de chimie (F.D.S.), Université de Lomé 01 B.P. 4574 Lomé 01 Togo

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Organique, UFR-SSMT, Université de Cocody-Abidjan ; 22  
B.P. 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire

<sup>3</sup> Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité, Université Joseph-  
Fourier, 38 041 Grenoble Cedex, France

<sup>4</sup> Synthèse et Electrosynthèse Organiques, équipe associée au CNRS, Université de  
Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35 042 Rennes Cedex, France

(Reçu le 09/12/2003 - Accepté le 26/02/2004)

---

*Summary* : We describe in this survey the behaviour of ynephosphine oxides in aqueous solution and basic medium. Topics covered include the order of stability related to five different structures of secondary ynephosphine oxides and the secondary enediynephosphine. Emphasis has been placed on cytotoxic activities with DNA.

*Mots clés* : ynephosphine, phosphaallène, ènediène, ène- yne-allènephosphine, cycloaromatisation, électrocyclisation, phosphaheptatriényne

---

## I - INTRODUCTION

Depuis la découverte des antibiotiques antitumoraux ènediènes notamment la Nécarzinostatine<sup>[1-6]</sup>, la Calichéamycine  $\gamma_1$ <sup>[7,8]</sup>, l'Espéramycine<sup>[9]</sup>, la Dynémicine A<sup>[10]</sup> puis la Kédarcidine<sup>[11]</sup>, extraits des produits naturels, la communauté scientifique s'est mobilisée

---

\* Auteur de correspondance

autour de cette nouvelle classe de composés. Ainsi, étant établi que le mode d'action de ces antibiotiques antitumoraux est lié au motif ènediène ou allène-ène-yne, de nombreux travaux réalisés autour de la chimie de ces structures consistent, d'une part, à rechercher leurs synthèses totales et comprendre leurs modes d'action et, d'autre part, à obtenir des nouvelles structures capables de présenter des activités comparables.

Nous avons décrit dans deux articles précédents, la synthèse des oxydes d'ynephosphine secondaires<sup>112,131</sup>. Dans ce nouvel article, nous décrivons le comportement des oxydes d'ynephosphine en présence d'un milieu biologique. Cinq différentes structures des oxydes d'ynephosphine secondaire simples et de l'oxyde de l'ènediènynephosphine secondaire ont été traitées avec l'ADN afin d'étudier leur activité cytotoxique éventuelle. Les mélanges obtenus ont été séparés par électrophorèse. Ensuite, un mécanisme illustrant le mode d'action de l'ADN avec les oxydes d'ynephosphine étudiés a été également proposé.

Auparavant, nous avons examiné la stabilité des oxydes d'ynephosphine secondaires dans l'eau, milieu proche du milieu biologique.

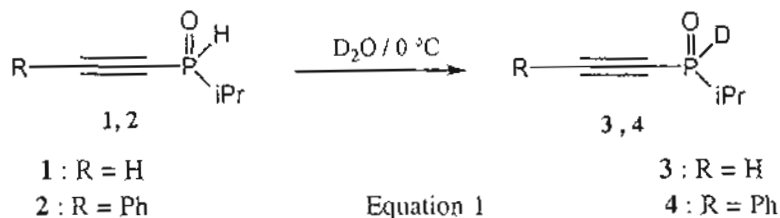
## II - ETUDE DU COMPORTEMENT EN MILIEU AQUEUX DES OXYDES D'YNEPHOSPHINE SECONDAIRE

### II.1 - Comportement des oxydes d'ynephosphines secondaire simples

#### II.1.1- *En solution aqueuse neutre*

Dans cette étude, nous avons choisi deux structures témoins pour étudier la stabilité : l'oxyde d'éthynyl(isopropyl)phosphine 1 et l'oxyde de la phényléthynyl(isopropyl)phosphine 2. A une concentration convenant à l'analyse par RMN (soit environ 5%), l'oxyde d'éthynyl (isopropyl) phosphine 1 est totalement soluble et l'échange proton/deutérium est immédiat. Du fait de la faible solubilité du dérivé phénylé 2, l'échange

proton/deutérium n'est total qu'au bout de trois heures à la température ambiante (Equation 1). L'analyse par RMN du phosphore ( $^{31}\text{P}$ ) indique le signal d'un produit unique : pour le composé 3 ( $\text{R} = \text{H}$ ),  $\delta = 17,8$  ppm ;  $^1\text{J}_{\text{PD}} = 81,61$  Hz (triplet) et pour le composé 4 ( $\text{R} = \text{Ph}$ ),  $\delta = 18,4$  ppm ;  $^1\text{J}_{\text{PD}} = 84,5$  Hz (triplet). La relative rapidité de l'échange proton/deutérium met en exergue l'activation de la liaison P-H.



Nous pouvons noter en plus de l'échange proton/deutérium, la stabilité des oxydes d'ynephosphine secondaire **1** et **2** en milieu aqueux neutre. Nous avons alors étudié leur comportement en milieu aqueux (davantage proche du milieu biologique) et en présence de quantités catalytiques de bases de Lewis faibles comparables aux bases puriques.

### II.1.2 - En solution aqueuse baso-catalysée

En présence de bases de Lewis, les oxydes d'ynephosphine secondaires subissent d'autres transformations chimiques à côté de l'échange proton/deutérium. Les résultats diffèrent selon la nature de la base. Nous avons réalisé des études en présence de triéthylamine, de pyridine ou de cytosine.

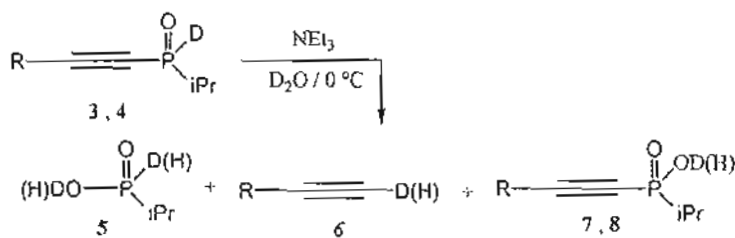
#### II.1.2.1 - En présence de triéthylamine

La triéthylamine a été la première base utilisée. La manipulation consiste à ajouter à  $0^\circ\text{C}$  une quantité catalytique de base à une solution

aqueuse (D<sub>2</sub>O) d'oxyde d'ynephosphine secondaire 1 ou 2 sous atmosphère inerte. L'évolution du mélange réactionnel a été suivie par RMN <sup>31</sup>P à température ambiante.

- Pour le dérivé 1, on observe la disparition rapide de l'oxyde d'ynephosphine deutérié et la formation comme produit principal de l'acide isopropylphosphinique 5 (Equation 2) résultant du clivage de la liaison C-P (C≡C-P)<sup>(14)</sup>. On observe aussi, en proportion faible (< 5% environ), l'acide éthynyl(isopropyl)phosphinique 7 (<sup>31</sup>P, δ = 24,3 ppm) résultant de l'insertion d'oxygène dans la liaison P-D (P-H) de l'oxyde d'ynephosphine précurseur 3.

- La faible solubilité dans l'eau du dérivé phénylé 2 entraîne une cinétique de transformation plus lente. On observe après introduction de la base, la disparition lente de l'oxyde d'ynephosphine 4 et la formation des produits 5 (<sup>31</sup>P, δ = 39 ppm, <sup>1</sup>J<sub>PD</sub> = 75 Hz), et 6 liés au fractionnement de la liaison C-P acétylénique et du dérivé 8 (<sup>31</sup>P, δ = 24,8 ppm), produit d'oxydation du substrat 4.

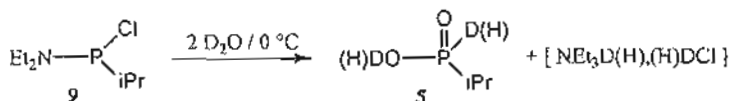


Equation 2

**• Identification des produits formés**

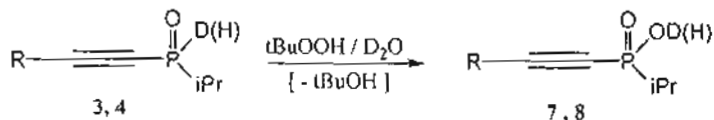
Nous avons caractérisé les acides phosphiniques 5, 7 et 8 grâce à une synthèse univoque que nous avons réalisée. L'identification est obtenue par comparaison de leurs données spectrales à celles des produits issus de la synthèse univoque :

- la synthèse de l'acide isopropylphosphinique 5 a été obtenue par hydrolyse de l'aminochloro(isopropyl)phosphine 9 dans D<sub>2</sub>O (Equation 3). Le rendement est quantitatif (supérieur à 95% en produit brut suffisamment pur pour des analyses). Le produit a été caractérisé par RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P). Le déplacement chimique en RMN du phosphore est fonction du pH du milieu : il vaut 47,6 ppm (<sup>1</sup>J<sub>PD</sub> = 82 Hz, triplet) en milieu neutre et 39 ppm (<sup>1</sup>J<sub>PD</sub> = 75 Hz, triplet) en milieu basique (triéthylamine).



Equation 3

- la synthèse univoque des acides ynephosphiniques 7 et 8 a été obtenue par oxydation des oxydes d'ynephosphine 3 et 4 correspondants (formes deutériées respectives de 1 et 2) à l'aide du tertiobutylhydroperoxyde (tBuOOH) en solution dans D<sub>2</sub>O (Equation 4). Le rendement est de l'ordre de 90%. Les acides 7 et 8 ont été caractérisés par RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P). Le déplacement chimique en RMN du phosphore est fonction du pH du milieu (29 et 28 ppm pour 7 et 8 en absence de base ou respectivement 24,3 et 24,8 ppm en présence de base).



Equation 4

Lors du traitement en milieu aqueux des oxydes d'ynephosphine secondaires en présence de triéthylamine, la rupture de la liaison C-P

acétylénique et l'insertion d'oxygène dans la liaison P-D(H) sont les principales réactions observées. Le clivage d'une telle liaison C-P acétylénique a été déjà signalé dans la littérature<sup>[14]</sup>. Toutefois, la coupure doit être induite par l'action d'un réactif nucléophile introduit en quantité stœchiométrique. L'observation de ce clivage par l'action d'une base de Lewis telle que la triéthylamine utilisée en quantité catalytique, est donc tout à fait remarquable et n'a jamais été signalée dans la littérature à notre connaissance.

#### *II.1.2.2. En présence de pyridine ou de cytosine*

Après introduction à température ambiante d'une quantité catalytique de pyridine (ou de cytosine) à une solution aqueuse (D<sub>2</sub>O) des oxydes d'ynephosphine 1 ou 2, une transformation lente est observée par RMN <sup>31</sup>P. Les produits principaux sont observés sous la forme de deux massifs de signaux complexes centrés à 50 et 75 ppm.

L'acide isopropylphosphinique 5 ( $\delta^{31}\text{P} = 39$  ppm,  $^1\text{J}_{\text{PD}} = 75$  Hz) et les acides ynephosphiniques 7 et 8, sont observés à l'état de trace.

La formation des acides phosphiniques 7 et 8 est évitée lorsque l'on utilise des solutions dégazées et les tubes scellés sous vide.

### **II.2 – Comportement en milieu aqueux de l'oxyde de l'ènediynephosphine secondaire 11**

Nous avons synthétisé l'oxyde de l'ènediynephosphine (isopropyl)phosphine 11 par hydrolyse de la liaison P-N de l'amino-ènediynephosphine 10 à l'aide de l'Amberlyst 15 (Schéma 1) avec un rendement de l'ordre de 80%. L'ènediynephosphine précurseur 10 a été lui même obtenu par condensation de l'aminochlorophosphine sur l'acétylure du 7-méthoxyhept-3-ène-1,5-diyne 9 à basse température<sup>[15]</sup>. L'oxyde du (Z)-ènediynephosphine (isopropyl)phosphine 11 et le précurseur 10 ont été caractérisés par spectrométrie de masse et spectroscopie de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P) :

$\delta = 12$  ppm ( $^1J_{PH} = 507$  Hz) pour l'oxyde 11 et  $\delta = 42$  ppm pour l'aminophosphine 10.

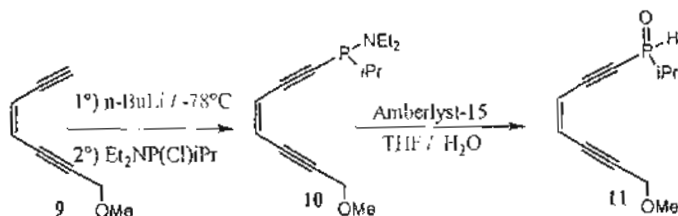
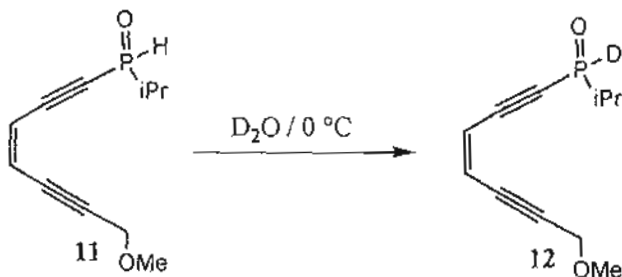


Schéma 1

### II.2.1 - Stabilité en solution aqueuse neutre

L'oxyde de l'ènediynephosphine secondaire 11 présente une bonne stabilité en solution aqueuse neutre, en l'absence de base et d'oxygène. Dans l'eau lourde  $\text{D}_2\text{O}$ , le contrôle par RMN du phosphore indique uniquement l'échange proton/deutérium observé également chez les structures simples d'oxydes d'éthynylphosphine secondaire (Equation 5) :  $\delta = 17,8$  ppm et  $^1J_{PD} = 82$  Hz (triplet).



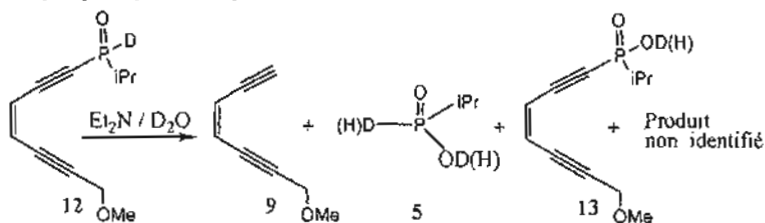
Equation 5

Les bases précédemment utilisées (triéthylamine, pyridine et cytosine) pour les composés simples ont été utilisées pour le composé chromophore 11.

### 11.2.2 - Traitement à l'aide de triéthylamine

Les produits obtenus par traitement à température ambiante de l'oxyde de l'ènediynephosphine **11** dans de l'eau deutériée (D<sub>2</sub>O) en présence d'une quantité catalytique de triéthylamine, sont ceux principalement observés comme pour les structures simples par RMN <sup>31</sup>P. Ce sont l'acide isopropylphosphinique **5** ( $\delta^{31}\text{P} = 39 \text{ ppm}$ ,  $^1\text{J}_{\text{PD}} = 75 \text{ Hz}$  issu du clivage de la liaison C-P et de l'acide ènediyn(eisopropyl)phosphinique **13** ( $\delta = 24,6 \text{ ppm}$ ) résultant de l'insertion d'oxygène dans la liaison P-D(H) (Equation 6).

On observe aussi un signal à 40 ppm ( $^1\text{J}_{\text{PH}} = 492 \text{ Hz}$ ) caractéristique d'un oxyde de phosphine secondaire, ce produit n'ayant pas été observé parmi les produits issus du traitement d'oxydes d'ynephosphine simple. Sa formation serait donc propre à la structure ènediynephosphine-oxyde.



Equation 6

Equation 6

### 11.2.3 - Traitement à l'aide de pyridine

Afin de limiter la réaction d'oxydation, le traitement de l'oxyde de l'ènediynephosphine **11** avec la pyridine a été réalisé par introduction de l'échantillon en solution aqueuse (D<sub>2</sub>O) et d'une quantité catalytique de base dans un tube de verre scellé après avoir dégazé le milieu réactionnel.



Après dix heures à température ambiante, puis chauffage du mélange réactionnel à 40°C pendant 15 minutes, l'analyse par RMN  $^{31}\text{P}$  révèle, en plus du substrat deutérié **12** ( $\delta = 17,8$  ppm,  $^1J_{\text{PD}} = 82$  Hz) non totalement transformé et des acides **5** ( $\delta = 39$  ppm  $^1J_{\text{PD}} = 75$  Hz) et **13** ( $\delta = 24,6$  ppm) formés en faible quantité, la présence d'un signal de forte intensité à 40 ppm ( $^1J_{\text{PH}} = 492$  Hz).

Contrairement aux observations faites lors du traitement des structures simples en milieu basique, nous notons l'absence de produits d'auto-condensation.

### **II.3 - Interprétation des résultats**

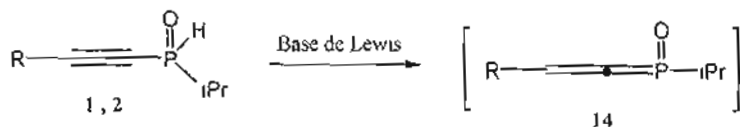
A l'issue de cette étude, nous pouvons constater que les mêmes processus réactionnels relatifs aux produits de clivage **5** et d'oxydation **13** déjà observés chez les oxydes d'ynephosphine simples **1** et **2**, se retrouvent dans le cas de l'oxyde de l'ènediynne(isopropyl)phosphine **11**. Ces processus sont liés à la réactivité de la fonction ynephosphine-oxyde. L'oxyde de l'ènediynnephosphine chromophore **11** a toutefois révélé un comportement spécifique.

#### *II.3.1 - Résultats liés à la fonction ynephosphine-oxyde*

Les réactions de clivage de la liaison C-P acétylénique, importantes en présence de la triéthylamine, faibles avec la pyridine, et l'oxydation de l'oxyde d'ynephosphine en acide correspondant sont observées dans les deux types de structures (les dérivés simples **1** et **2** d'une part et le chromophore **11** d'autre part). Elles apparaissent donc générales.

L'observation par RMN  $^{31}\text{P}$  de très nombreux produits en proportion majoritaire qui se présentent sous la forme de massifs de signaux complexes après traitement de la solution des oxydes d'ynephosphine **1** et **2** en milieu basique (pyridine, cytosine), est en

l'aveur de la formation d'une espèce instable très réactive. Les produits correspondant à ces massifs seraient dus à l'autocondensation d'un intermédiaire instable, attribué à un oxyde de phosphallène<sup>(16-18)</sup>. Cette réaction d'autocondensation est parfaitement reproductible, quelles que soient les conditions opératoires (variation de la température, de la concentration de la base et du substrat, présence ou non d'oxygène). L'oxyde de phosphallène 14 (Equation 7) postulé proviendrait d'un réarrangement d'oxydes d'ynephosphine correspondant 1 et 2 (ou de leurs formes deutériées respectives de 3 et 4). Le précurseur subit alors une migration-1,3 du proton lié à l'atome de phosphore.



Equation 7

### II.3.2 - Résultats propres au groupement *enediynephosphine-oxyde*

L'absence de produits d'autocondensation en quantité notable et l'apparition d'un nouveau produit ( $\delta^{31}\text{P} = 40$  ppm et  $^1\text{J}_{\text{PH}} = 492$  Hz) sont spécifiques à la fonction *enediynephosphine-oxyde*. Dans l'hypothèse que les produits d'autocondensation seraient dus à une espèce intermédiaire, très vraisemblablement l'oxyde de phosphallène, il est probable que dans le cas du chromophore, l'oxyde de phosphallène correspondant soit plus stable et évolue vers une structure unique. En effet, le phosphahéptatriényne 15, phosphallène issu de 11, est un site potentiel d'une réaction de cycloaromatisation<sup>[6,19,20]</sup>. L'oxyde de phosphine observé ( $\delta^{31}\text{P} = 40$  ppm et  $^1\text{J}_{\text{PH}} = 492$  Hz) et non identifié peut vraisemblablement provenir d'une telle réaction.

Ainsi, l'intervention d'une réaction d'électrocyclisation, au niveau de l'oxyde de l'ènediynephosphine 11 par réarrangement de la fonction oxyde-ynephosphine en oxyde-phosphaallène conduirait à l'oxyde de phosphine aromatique 17 via l'oxyde du phosphahéptatriényne 15 et le biradical phosphinyle 16 (Schéma 2) suivant un mécanisme analogue au réarrangement de type Bergman-Myers<sup>[2,6,21,22]</sup>.

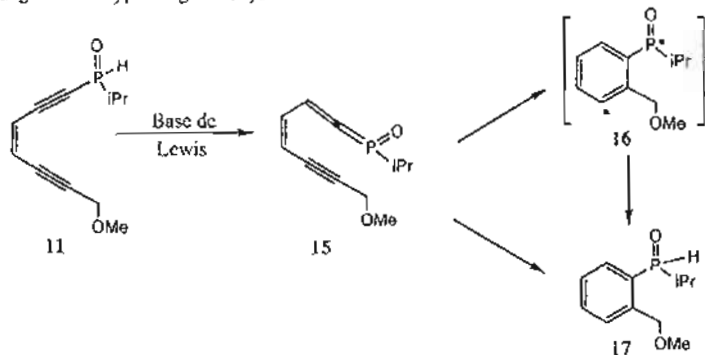


Schéma 2

Toutefois, la synthèse univoque du produit d'électrocyclisation attendu et d'autres caractérisations ont été nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Nous avons réalisé la synthèse univoque du composé 17 par l'action de l'Amberlyst-15 sur l'aminophosphine 18 en présence d'une quantité stœchiométrique d'eau<sup>[13]</sup>. Le rendement de la réaction est de 90%. Il a été caractérisé par RMN et par spectrométrie de masse. Ses principales données spectroscopiques de RMN <sup>31</sup>P sont  $\delta = 42$  ppm et  $^1J_{\text{PH}} = 465$  Hz (doublet). Son homologue deutérié 19 a été également synthétisé dans les mêmes conditions en présence de D<sub>2</sub>O. Les caractéristiques spectroscopiques de ce dernier sont

$\delta^{31}\text{P} = 43,63$  ppm (triplet) et  $^1\text{J}_{\text{PD}} = 75$  Hz en absence de base et  
 $\delta^{31}\text{P} = 44,43$  ppm (triplet) et  $^1\text{J}_{\text{PD}} = 74,1$  Hz en présence de base.

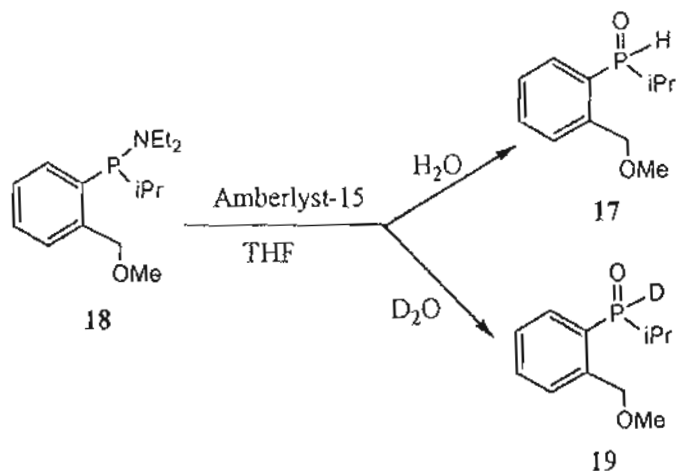


Schéma 3

La différence notable entre les constantes de couplage  $^1\text{J}_{\text{PH}}$  du composé 15 et du produit non identifié ( $D = 27$  Hz) rend nécessaire d'autres caractérisations afin de pouvoir tirer une conclusion adéquate. La confirmation d'une réaction d'électrocyclisation de l'oxyde de phosphine 11 indiquerait que la vitesse de cette réaction est plus élevée que la vitesse d'oligomérisation de l'oxyde du phosphorène intermédiaire.

Au regard de ces différents résultats, il apparaît que les oxydes d'ynéphosphine secondaire, stables en milieu neutre, évoluent rapidement en présence de bases de Lewis faibles. Ils possèdent une grande réactivité, propriété pouvant être mise à profit en synthèse organique.

### III - ETUDE DES ACTIVITES DES OXYDES D'YNEPHOSPHINE SECONDAIRES VIS-A-VIS DE L'ADN

Les résultats obtenus lors du traitement des oxydes d'ynephosphine ou de l'ènediynephosphine secondaires en présence d'une base de Lewis faible telle que la pyridine ou la cytosine, sont en faveur de leur isomérisation en oxydes de phosphallène correspondant. L'intervention d'une réaction d'électrocyclisation est par ailleurs postulée dans le cas du chromophore 11. Nous nous sommes intéressés à l'étude de cytotoxicité des oxydes d'ynephosphine secondaire et de l'oxyde de l'ènediynephosphine (Schéma 4) dans la mesure où la littérature stipule que les structures possédant des motifs ènediynes ou allène-ène-yne sont effectivement douées d'activité cytotoxique<sup>[1-11]</sup>.

#### III.1 - Résultats expérimentaux

Les études portant sur l'activité de cinq dérivés des oxydes d'éthynylphosphine secondaire dont nous avons précédemment décrit la synthèse et de l'oxyde de l'ènediynephosphine 11 sur l'ADN ont été réalisées dans le Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité du Professeur Jean Lhomme (Université Joseph-Fourier, Grenoble).

Chaque produit est testé sur le plasmide d'*E. coli* (250 ng dans 10 µl de volume total). Le temps de contact des produits avec l'ADN est de trois heures. Les manipulations ont été réalisées dans l'eau pure et sont de deux types :

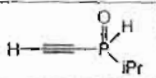
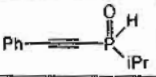
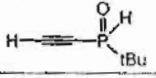
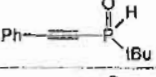
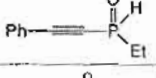
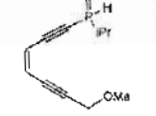
a) le traitement de l'ADN par les produits à tester et l'analyse par électrophorèse après élimination des produits qui n'ont pas réagi, (résultats A, Schéma 4) ;

b) le traitement de la solution précédente par la pipéridine à chaud et l'analyse par électrophorèse (résultats B, Schéma 4).

La séparation par électrophorèse des produits obtenus après dépôt dans les puits d'un gel d'agarose, est représentée dans le schéma 4.

Les colonnes a et b correspondent à l'ADN de référence qui n'a pas été soumis à l'action des oxydes d'ynéphosphine.

**TABLEAU :** Structure des substrats et références des différents résidus formés

Structure des substrats	Référence (milieu neutre)	Référence (milieu basique)
ADN	a	b
1 	1a	1b
2 	2a	2b
20 	20a	20b
21 	21a	21b
22 	22a	22b
11 	11a	11b

## SEPARATION PAR ELECTROPHORESE

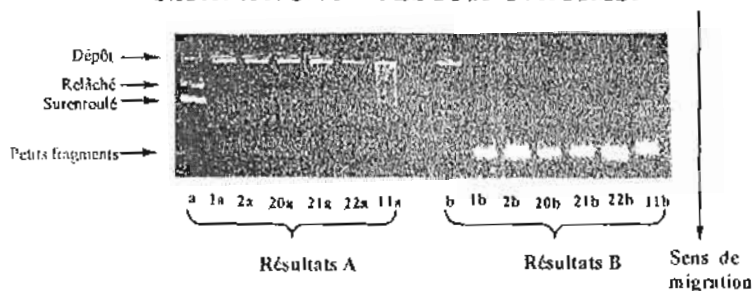


Schéma 4

### III.2 - Interprétation des résultats

#### III.2.1 - Fixation et coupure de l'ADN

L'évolution de l'ADN témoin (colonnes a et b) est comparée aux données de l'électrophorèse des résidus des produits mis au contact de l'ADN (résultats A et B) :

- les produits testés possèdent un taux de fixation de l'ADN assez élevé car l'ADN ne migre pas et reste piégé dans les puits de dépôt sous forme de précipité (colonnes 1a, 2a, 20a, 21a, 22a, 11a).

- l'échantillon correspondant au chromophore 11 (colonne 11a) a un comportement différent de celui des oxydes d'ynéphosphine simples : il semble en marge de la propriété de fixation, être capable également de couper l'ADN. En effet, on observe des traînées dans le couloir de migration, colonne 11a).

#### III.2.2 - Nature des produits de fixation

Les produits de fixation sont des "alkali labiles" puisqu'on retrouve quasiment la totalité de l'ADN sous forme de petits fragments après traitement à la pipéridine à chaud (colonnes 1b, 2b, 20b, 21b, 22b, 11b).

Le comportement particulier de l'oxyde de l'ènediynephosphine sur le plan expérimental, vient renforcer l'hypothèse de l'intervention d'une réaction d'électrocyclisation.

### III.2.3 - Mécanisme proposé

Le mécanisme proposé s'inspire de celui des ynesylfones décrites dans la littérature et qui provoquent le clivage de l'ADN<sup>[23-28]</sup>.

La cytotoxicité serait liée à l'électrophilie de la fonction phosphoallène-oxyde (Schéma 5) sur laquelle s'additionnent les sites nucléophiles de l'ADN.

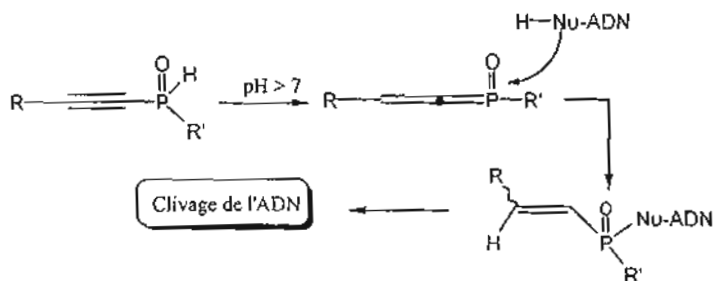


Schéma 5

Dans le cas du composé chromophore 11, en plus du mécanisme de type électrophile afférent à la fonction phosphoallène-oxyde, l'activité peut être induite par un mécanisme d'électrocyclisation conduisant à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Le clivage de l'ADN serait donc induit par le biradical phosphinyle intermédiaire 16 (Schéma 6).

Ce comportement particulier de l'oxyde de l'ènediynephosphine 11 sur le plan expérimental, vient renforcer l'hypothèse de l'intervention d'une réaction d'électrocyclisation de type Bergman-Myers<sup>(21,22)</sup> (Schéma 6).



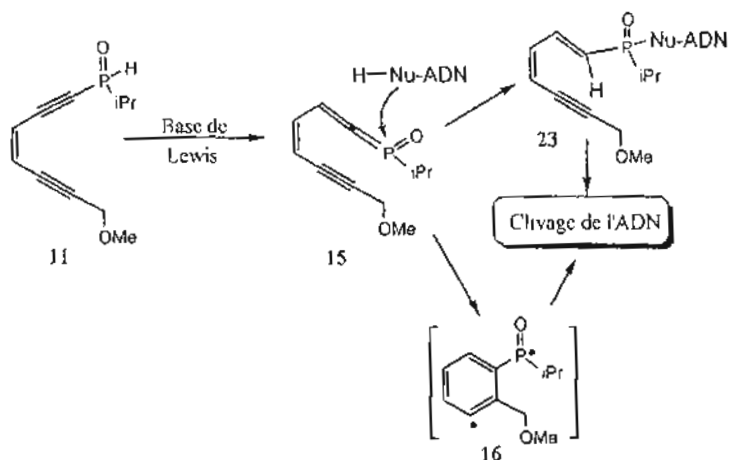


Schéma 6

#### IV – CONCLUSION

Les comportements des oxydes d'ynephosphine secondaires simples et d'un dérivé chromophore ont été étudiés sur le plan chimique et vis-à-vis d'un milieu biologique. Leur comportement chimique est tout à fait remarquable. Ces composés sont stables en milieu aqueux neutre. La vitesse de la réaction d'échange isotopique proton / deutérium rend compte de la forte activation de la liaison P-H. Ils évoluent rapidement en présence de base de Lewis :

- on observe un clivage de la liaison C-P acétylénique, majoritaire avec la triéthylamine, faible avec la pyridine ou la cytosine et une oxydation des oxydes d'ynephosphine en acides ynephosphiniques correspondants. Ces réactions sont observées aussi bien avec les oxydes d'ynephosphine simples qu'avec le chromophore énediynephosphine oxydé.

- les données de RMN  $^{31}\text{P}$  sont en faveur d'une électrocyclisation de type Myers impliquant l'oxyde de l'ènediynephosphine (base pyridine). Ce résultat, fondamental impliquerait une tautomérie ynephosphine-oxyde/phosphaallène-oxyde.

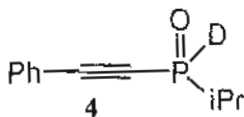
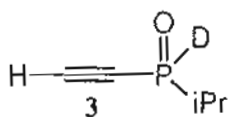
Leur comportement vis-à-vis de l'ADN montre qu'ils possèdent tous une activité cytotoxique (fixation de l'ADN). Le fait que l'ènediynephosphine oxydée soit en plus capable de cliver l'ADN est en faveur d'un mécanisme de type radicalaire qui vient renforcer l'hypothèse d'une cycloaromatisation de ce dérivé chromophore.

## V - PARTIE EXPERIMENTALE

### V.1 - Traitement en milieu aqueux des oxydes d'ynephosphine 1 et 2

#### V.1.1 - Réaction d'échange H/D en milieu neutre

Lorsque l'on solubilise l'oxyde d'ynephosphine 1 ou 2 dans l'eau deutériée ( $\text{D}_2\text{O}$ ), on observe par RMN du phosphore, un triplet résultant du couplage du phosphore avec le deutérium après échange isotopique proton/deutérium. Cet échange est immédiat avec le dérivé non substitué 1 et plus lent avec le dérivé phénylé 2 compte tenu de la faible solubilité de ce dernier dans l'eau. Ils conduisent respectivement à 3 et 4.



$$\delta^{31}\text{P} = 17,8 \text{ ppm}, \quad {}^1J_{\text{PD}} = 81,6 \text{ Hz}$$

$$\delta^{31}\text{P} = 18,4 \text{ ppm}, \quad {}^1J_{\text{PD}} = 84,5 \text{ Hz}$$

*V.1.2 - Réaction en présence de la triéthylamine.*

Dans un tube de RMN ( $\varnothing = 5$  mm) contenant 80 mg d'oxyde d'ynephosphine 1 ou 2 dans  $D_2O$ , on ajoute à  $0^\circ C$  0,5 équivalent de triéthylamine. Le tube est conservé une demi-heure environ à température ambiante, puis examiné par RMN du phosphore. On observe :

- à 24,3 ppm, un signal (singulet) attribué à l'acide (isopropyl) ynephosphinique 7 et à 24,8 ppm pour le dérivé phénylé 8.
- à 39,0 ppm, un triplet, caractéristique d'une structure renfermant une liaison P-D. La constante de couplage  $^1J_{PD}$  est de 75 Hz. Ce signal correspond à l'acide isopropylphosphinique 5.

Les acides 5, 7 et 8 ont été identifiés par comparaison de leurs spectres ( $^1H$ ,  $^{31}P$ ,  $^{13}C$ ) avec ceux des produits correspondants obtenus par synthèse univoque.

*V.1.3 - Réaction en présence de pyridine ou de cytosine*

Le traitement des oxydes d'ynephosphine en présence de pyridine a été effectué en milieu aqueux non dégazé puis en milieu aqueux dégazé.

**- Utilisation de la pyridine ou de la cytosine en milieu non dégazé**

Dans un tube de RMN ( $\varnothing = 5$  mm) contenant 50 mg d'oxyde d'ynephosphine 1 (ou 2) on ajoute à  $0^\circ C$  0,5 équivalent de pyridine ou de cytosine. Le tube est conservé une demi-heure environ à température ambiante. On observe alors par RMN du phosphore les acides 5 et 7 (ou 8) à côté de deux massifs complexes centrés à 50 et 75 ppm correspondant vraisemblablement aux produits d'autocondensation des oxydes de phosphallène formés par réarrangement des oxydes d'ynephosphine 3 et 4.

- Utilisation de la pyridine ou de la cytosine en milieu dégazé

En milieu dégazé, seul l'oxyde d'éthynylphosphine 1 a été étudié. La manipulation consiste à dégazer sous vide, un tube de verre contenant un mélange d'oxyde et de base (pyridine, cytosine) en solution dans l'eau deutériée. Le tube est conservé à température ambiante pendant quatre jours puis, le mélange réactionnel est transféré dans un tube de RMN ( $\varnothing = 5$  mm) pour analyse spectroscopique. La réaction est totale avec 0,5 équivalent de base.

On observe par RMN du phosphore les signaux déjà signalés lors de la réaction en milieu non dégazé (pyridine ou cytosine). En revanche, les acides isopropylphosphinique 5 et ynephosphinique 7 sont formés en proportion très faible (< 5%) par rapport aux produits représentés sous forme de massifs complexes.

## V.2 - Synthèse univoque des acides isopropylphosphiniques

### V.2.1 - Synthèse de l'acide isopropylphosphinique 5

L'addition à 0°C de 200 mg de chloro(diéthylamino)isopropyl phosphine 9 dans 1 cm<sup>3</sup> de D<sub>2</sub>O conduit quantitativement à l'acide isopropylphosphinique 5. Le rendement est supérieur à 95%.

#### Acide isopropylphosphinique-d (en milieu neutre)

RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 47,6 (tm, <sup>1</sup>J<sub>PD</sub> = 82,0 Hz) ; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 3,16 (dd, 6 H, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 19,9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub>CH) ; 4,05 (db, H, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 15,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,2 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ; RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 15,74 (qm., <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 128,6 Hz, CH<sub>3</sub>CH) ; 29,45 (ddm, <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 128,6 Hz, <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 92,6 Hz, CHCH<sub>3</sub>).

*Acide isopropylphosphinique-d (en présence de Et<sub>3</sub>N)*

RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, D<sub>2</sub>O/Et<sub>3</sub>N) δ : 39,0 (tm, <sup>1</sup>J<sub>PD</sub> = 75,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 18,0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 14,0 Hz) ; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O/Et<sub>3</sub>N) δ : 0,73 (dd, 6 H, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 18,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,1 Hz, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH) ; 1,25 (m, H, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 14,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, CHCH<sub>3</sub>).

L'acide isopropylphosphinique 5 a également été synthétisé sous sa forme non deutériée.

Une solution de 600 mg (3,3 mmol) de chloro(diéthylamino)isopropylphosphine 9 dans 1 cm<sup>3</sup> d'éther est ajoutée à 0°C à 10 cm<sup>3</sup> d'éther contenant 120 µl d'eau. Après 15 minutes d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé et l'acide isopropylphosphinique, obtenu avec 96% de rendement (290 mg), est caractérisé par RMN.

*Acide isopropylphosphinique (forme non deutériée de 5)*

RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 42,0 (dhd, <sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 523,7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 19,5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 14,5 Hz) ; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,06 (dhd, 6 H, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 19,5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,2 Hz, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH) ; 1,74 (dd, H, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 14,5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1,2 Hz, CHCH<sub>3</sub>) ; 6,76 (dd, H, <sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 523,7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1,2 Hz, P-H) ; 10,71 (s, H, P-OH) ; RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 14,04 (qm, <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 128,1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 1,1 Hz, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH) ; 27,68 (dddh, <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 126,9 Hz, <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 95,4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CH</sub> = 18,7 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CH</sub> = 4,0 Hz, CHCH<sub>3</sub>). 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

*V.2.2 - Synthèse des acides (isopropyl)ynephosphiniques-d 7 et 8*

A une solution d'oxyde d'ynephosphine dans D<sub>2</sub>O, on ajoute à 0°C une quantité équimolaire de tertiobutylhydroperoxyde (<sup>t</sup>BuOOH) en solution dans l'eau (70%). Après une heure d'agitation à température

ambiante, l'eau et l'alcool formé sont évaporés. Le rendement est de l'ordre de 70%.

*Acide éthynyl(isopropyl)phosphinique 7 (analyse en milieu neutre)*

RMN  $^{31}\text{P}$  (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 29,0 ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 0,91 (dd, 6 H,  $^3\text{J}_{\text{PH}} = 20,0$  Hz,  $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7,1$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ) ; 1,70 (h, H,  $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7,1$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ) ; 3,26 (d, H,  $^3\text{J}_{\text{HP}} = 10,0$  Hz,  $\text{HC}\equiv\text{CP}$ ) ; RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 16,96 (qm,  $^1\text{J}_{\text{CH}} = 128,6$  Hz,  $^2\text{J}_{\text{CP}} = 2,7$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ) ; 31,66 (ddm,  $^1\text{J}_{\text{CH}} = 121,7$  Hz,  $^1\text{J}_{\text{CP}} = 115,8$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ) ; 79,14 (dd,  $^1\text{J}_{\text{CP}} = 180,7$  Hz,  $^2\text{J}_{\text{CH}} = 46,2$  Hz,  $\text{C}\equiv\text{CP}$ ) ; (dd,  $^1\text{J}_{\text{CH}} = 252,2$  Hz,  $^2\text{J}_{\text{CP}} = 32,5$  Hz,  $\text{HC}\equiv\text{CP}$ ).

*Acide éthynyl(isopropyl)phosphinique 7 (analyse en présence de pyridine)*

RMN  $^{31}\text{P}$  (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{Pyridine}$ )  $\delta$  : 24,30 ppm ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{Pyridine}$ )  $\delta$  : 1,04 (dd, 6 H,  $^3\text{J}_{\text{PH}} = 19,0$  Hz,  $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7,1$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ) ; 1,65 (dh, H,  $^2\text{J}_{\text{PH}} = 15,2$  Hz,  $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7,1$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ) ; 3,08 (d, H,  $^3\text{J}_{\text{PH}} = 9,2$  Hz,  $\text{HC}\equiv\text{C}$ ).

*Acide isopropyl(phényléthynyl)phosphinique 8 (analyse en milieu neutre)*

RMN  $^{31}\text{P}$  (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 28,10 (h,  $^3\text{J}_{\text{PH}} = 19,0$  Hz) ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  : 1,10 (dd, 6 H,  $^3\text{J}_{\text{PH}} = 19,0$  Hz,  $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7,0$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ) ; 1,8 (dh, H,  $^2\text{J}_{\text{PH}} = 15,0$  Hz,  $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7,0$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ).

*Acide phényléthynyl(isopropyl)phosphinique 8 (analyse en présence de pyridine) RMN  $^{31}\text{P}$  (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ /Pyridine) : 24,8 ppm.*

### V.3. Traitement en milieu aqueux du chromophore 11

Comme nous l'avons signalé dans le cas des oxydes d'ynephosphine secondaires simples, la dissolution de l'oxyde de l'ènediynephosphine 11 dans l'eau deutériée se traduit par un échange isotopique proton/deutérium rapide du proton lié au phosphore ( $\delta^{31}\text{P} = 17,8$  ppm,  $^1\text{J}_{\text{PD}} = 82$  Hz. un triplet).

#### V.3.1 - Réactions en milieu non dégazé en présence de la triéthylamine

Dans un ballon contenant 50 mg (0,24 mmol) de l'oxyde 11, on ajoute à  $0^\circ\text{C}$ ,  $5\text{ cm}^3$  d'eau deutériée. La suspension obtenue est transférée dans un tube de RMN ( $\varnothing = 5$  mm) et on additionne 0,5 équivalent de base. La solution devient limpide après homogénéisation. On effectue ensuite le contrôle par RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ), ce qui indique la présence de trois produits dont les déplacements chimiques sont 39 ppm (triplet,  $^1\text{J}_{\text{PD}} = 75$  Hz), 24,6 ppm (s) et 40 ppm ( $\delta$ ,  $^1\text{J}_{\text{PH}} = 492$  Hz). Ce dernier produit n'a pas été identifié. Il s'agit vraisemblablement du produit de cycloaromatisation 17.

Le produit de déplacement chimique  $\delta = 39$  ppm est l'acide phosphinique 5 (en forte proportion), déjà identifié par synthèse univoque. L'acide ènediynephosphinique 13 (24,6 ppm), en faible proportion, a été identifié par analogie avec les acides ynephosphiniques simples 7 et 8 (déplacement chimique dans la même zone en RMN  $^{31}\text{P}$ ).

#### V.3.2 - Réactions en milieu dégazé en présence de pyridine

Nous avons utilisé la pyridine en opérant en milieu aqueux dégazé. Un tube de verre contenant le mélange réactionnel d'oxyde 11 (20 mg ; 0,1 mmol) et de pyridine (0,06 mmol ; 40  $\mu\text{l}$  d'une solution 1,5 M de

pyridine dans D<sub>2</sub>O), est dégazé, scellé sous vide puis conservé à température ambiante pendant dix heures. Le tube est ensuite chauffé pendant 15 minutes à 40°C. La transformation du substrat n'est pas totale.

On observe par RMN <sup>31</sup>P les acides phosphiniques 5 (à 39 ppm) et 13 (à 24,6 ppm) et un déplacement chimique à 40 ppm attribué au produit de cycloaromatisation 17.

#### **V.4 - Traitement des oxydes d'ynephosphine secondaire avec l'ADN**

Chaque produit est testé sur le plasmide d'E.coli. (250 ng dans 10 µl de volume total). La réaction est réalisée dans l'eau pure, le temps de contact étant de 3 heures. Les réactifs en excès sont éliminés par précipitation à l'éthanol (75% final) en présence d'acétate de sodium (0,2 M final). Pour parfaire la précipitation, ce mélange est refroidi et maintenu à -20°C pendant deux heures puis centrifugé à 4°C (12000 g pendant 20 minutes). Le culot d'ADN modifié est lavé avec 50 µl d'éthanol à 70% puis séché à l'air libre et repris dans 50 µl d'eau. Cet échantillon est alors divisé en deux parties aliquotes de 25 µl.

##### *V.4.1 - Traitement en milieu neutre*

La première aliquote est évaporée à sec et reprise dans le tampon de charge. Après dépôt des produits dans les puits dans un gel d'agarose, la séparation par électrophorèse des produits donne les résultats A.

Seul l'ADN de référence qui n'a pas été traité avec les oxydes d'ynephosphine migre sous les formes relâchée et surenroulée. L'ADN mis en contact avec les oxydes d'ynephosphine reste piégé dans les puits et ne migre pas. En revanche, dans le cas de l'oxyde l'ènediynephosphine, on observe des traînées dans le couloir de migration.



*V.4.2 - Traitement en milieu neutre*

A la deuxième aliquote de 25 µl, on ajoute 25 µl de pipéridine (2 M) et le mélange est porté au reflux pendant 30 minutes à 90°C puis évaporé à sec. Les résidus sont repris par une solution de tampon de charge et une partie de la solution est déposée dans les puits dans un gel d'agarose. Après migration et traitement par une solution de bromure d'éthidium, les données de l'électrophorèse sont représentées par les résultats B.

Contrairement aux résultats A, ici tous les produits traités migrent sauf l'ADN de référence.

Tous les oxydes d'ytre ou d'ènediynephosphine traités possèdent une réaction de fixation avec l'ADN. Le composé 11 semble en outre couper l'ADN.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] - N. ISHIDA, K. MIYAZAKI, K. KUMAGAÏ & M. RIKIMARU, *J. Antibiot.* (1965), 18, 68.
- [2] - K.C NICOLAOU & W.-M. DAI, *Angew. Chem., Int. Ed., Engl.* (1991), 30, 1387-1530.
- [3] - K. EDO, M. MIZUGAKI, Y. KOIDE, H. SETO, K. FURIHATA, N. OTAKE & N. ISHIDA, *Tetrahedron Lett.* (1985), 26, 331-334.
- [4] - A.G MYERS & P.J. PROTEAU, *J. Am. Chem. Soc.* (1989), 111, 1146-1147.
- [5] - I.H. GOOLDBERG, *Acc.Chem. Res.* (1991), 24, 191.
- [6] - A.G. MYERS, *Tetrahedron Lett.* (1987), 28, 4493-4496.
- [7] - M.D. LEE, T.S. DUNNE, M.M. SIEGEL, C.C. CHANG, G.O. MORTON & D.B. BORDERS, *J. Am. Chem. Soc.* (1987), 109, 3464-3466.
- [8] - M.D. LEE, T.S. DUNNE, C.C. CHANG, G.A. ELLESTAD, M.M. SIEGEL, G.O. MORTON, W.J.

- McGahren & D.B. Borders, *J. Am. Chem. Soc.* (1987), 109, 3466-3468.
- [9] - a) J GOLIK, J CLARDY, G. DUBAY, G. GROENEWOLD, H KAWAGUCHI, M. KONISHI, B. KRISHNAN, H. OHKUMA, K. SAITOH & T. W DOYLE, *J. Am. Chem. Soc.* (1987), 109, 3461-3462 ;
- b) J. GOLIK, G DUBAY, G. GROENEWOLD, H. KAWAGUCHI, M. KONISHI, B. KRISHNAN, H. OHKUMA, K SAITOH & T.W. DOYLE, *J. Am. Chem. Soc.* (1987), 109, 3462-3464.
- [10] - M. KONISHI, H. OHKUMA, K. MATSUMOTO, T. TSUNO, H. KAMEI, T. MIYAKI, T. OKI, H. KAWAGUCHI, G.D. VAN DUYN & J. CLARDY, *J. Antibiot.* (1989), 42, 1449.
- [11] - a) J.E LEET, D.R. SCHROEDER, S.J. HOFSTEAD, J. GOLIK, K.L. COLSON, S. HUANG, S.E. KLOHR, T.W. DOYLE & J.A. MATSON, *J. Am. Chem. Soc.* (1992), 114, 7946 ;
- b) J.E. LEET, D.R. SCHROEDER, D.R. LANGLEY, K.L. COLSON, S. HUANG, S.E. KLOHR, M.S. LEE, J. GOLIK, S.J. HOFSTEAD, T.W. DOYLE & J.A. MATSON, *J. Am. Chem. Soc.* (1993), 115, 8432.
- [12] - G. BABA, J-F. PILARD, K. TANTAOUI, A.-C. GAUMONT & J.-M. DENIS, *Tetrahedron Lett.*, (1995), 36, 4421-4424.
- [13] - G. BABA, S.A. TOURÉ, C.G. TÉA, J.-M. DENIS, TH. Y. N'GUESSAN, *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*, (2002), 014, 25-41.
- [14] - W. VOSKUIL & F. ARENS, *Rec. Trav. Chim. (Pays-Bas)* (1962), 81, 993-1008.
- [15] - G. BABA, C.G. TEA, S.A. TOURE, M. LESVIER & J.-M. DENIS, *Journal of Organometallic Chemistry*, (2002), 643-644, 342-349.
- [16] - J.-C. GUILLEMIN, T. JANATI & J.-M. DENIS, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1992), 415-416.
- [17] - J.-C. GUILLEMIN, T. JANATI, J.-M. DENIS, P. GUENOT & P. SAVIGNAC, *Tetrahedron Lett.* (1994), 35, 245-248.

- [18] - T. KAWASHIMA, Y. MIKI & N. INAMOTO, *Chem. Lett.* (1986), 1883-1884.
- [19] - R.R. JONES & R.G. BERGMAN, *J. Am. Chem. Soc.* (1972), 94, 660-661.
- [20] - R.G. BERGMAN, *Acc. Chem. Res.* (1973), 6, 25-31.
- [21] - A.G. MYERS, P.S. DRAGOVICH & E.Y. KUO, *J. Am. Chem. Soc.* (1992), 114, 9369-9386.
- [22] A. G. MYERS, E. Y. KUO & N.S. FINNEY, *J. Am. Chem. Soc.* (1989), 111, 8057-8059.
- [23] - Y. SAKAI, Z. NISHIWAKI, K. SHISHIDO, M. SHIBUYA & M. KIDO, *Tetrahedron Lett.* (1991), 32, 4363-4366.
- [24] - Y. SAKAI, Y. BANDO, K. SHISHIDO & M. SHIBUYA, *Tetrahedron Lett.* (1992), 33, 957-960.
- [25] - B.M. TROST & D.P. CURRAN, *Tetrahedron Lett.* (1981), 22, 1287-1290.
- [26] - K.C. NICOLAOU, G. SKOKOTAS, P. MALIGRES, G. ZUCCARELLO, E.J. SCHWEIGER, T. TOSHIMA & S. WENDEBORN, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* (1989), 28, 1272-1275.
- [27] - K.C. NICOLAOU, S. WENDEBORN, P. MALIGRES, K. ISSHIKI, Z. ZEIN & G. ELLESTAD, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* (1991), 30, 418-420.
- [28] - M.J. WU, C.F. LIN, J.S. WU & H.T. CHEN, *Tetrahedron Lett.* (1994), 35, 1879-1882.