

Synthèse de l'acide 3-désoxy-L-thréo-2-hexulosonique et son rôle dans la biosynthèse des pectates-lyases

Bruno Fössel¹, Mélanie Stenzel¹, René Baudouy^{1*}, Guy Condemine²,
Janine Robert-Baudouy², Bernard Fenet³

¹ Laboratoire de synthèse organique appliquée, EA 622, Université de Lyon I et CPE Lyon,
43, bld du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne

² Laboratoire de génétique moléculaire des microorganismes, URA 1486, INSA,
20 avenue A-Einstein, 69621 Villeurbanne

³ Centre de RMN, URA D2057, Université de Lyon I et CPE Lyon, France

(reçu le 3 avril 1995, accepté le 29 juin 1995)

Summary – Synthesis of 3-deoxy-L-threo-2-hexulosonic acid and its role in the biosynthesis of pectate lyases. 3-Deoxy-L-threo-2-hexulosonic acid was prepared from L-(+)-diethyl tartrate and dithioacetal of ethyl glyoxylate in eight steps via a cyclic, organic sulfate with a 20% overall yield. This molecule is a gratuitous inducer of the biosynthesis pectate lyases by the phytopathogenic bacteria *Erwinia chrysantemi*.

L-(+)-diethyl tartrate / 1,4-cyclic sulfate / gratuitous inducer / pectate lyase / *Erwinia chrysantemi*

Introduction

Notre objectif est la synthèse d'acides 2-céto-3-désoxy-aldoniques ou 3-désoxy-aldulosoniques énantiomérique-purs dont certains se rencontrent dans les produits de dégradation de la pectine, polygalacturonate de la paroi cellulaire des végétaux, lorsque les plantes sont attaquées par des champignons ou bactéries [1]. Ces molécules sont indispensables pour analyser le mécanisme de défense des plantes contre les bactéries, c'est-à-dire pour faire l'étude :

- d'une part du rôle biologique spécifique de ces substances en tant que substrats d'enzymes pectinolytiques et inducteurs de leur synthèse.

- d'autre part du comportement de la plante vis-à-vis des agents pectinolytiques pathogènes telle que la bactérie *Erwinia chrysantemi*, en présence de ces acides [2].

L'objectif à long terme est de mettre au point un moyen de stimulation de l'autodéfense de la plante contre les bactéries, qui sont responsables de dégâts considérables dans les cultures et le stockage des végétaux.

L'importance biologique des acides 3-désoxy-aldulosoniques est bien connue. Par exemple (fig 1), l'acide 3-désoxy-D-arabino-2-heptulosonique 7-phosphate (DAHP) est un intermédiaire clé dans la biosynthèse des amino-acides aromatiques chez les plantes, par la voie shikimique [3].

L'acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique (KDO) est un constituant essentiel des lipopolysaccharides existant dans les parois cellulaires des bactéries gram-négatives [4].

L'acide N-acétyl neuraminique (NANA), constituant des glycoprotéines, des glycolipides et des oligosaccharides des organismes vivants, joue un grand rôle dans les processus de reconnaissance moléculaire chez les virus, bactéries et cellules des animaux supérieurs [5].

La biosynthèse de ces molécules implique une condensation aldolique stéréospécifique du phospho-énol de l'acide pyruvique sur la face «re» du carbonyle d'un aldose, sous l'action d'une aldolase appropriée [6].

Pour la molécule qui nous intéresse, l'acide 3-désoxy-L-thréo-2-hexulosonique, l'aldose serait le L-glycér-aldéhyde (fig 2).

Synthèse

Les principaux modes d'approche connus des acides 3-désoxy-2-ulosoniques qui utilisent un allongement de squelette relèvent d'une de ces deux catégories :

- la condensation d'un dérivé de l'acide oxalo-acétique [7] ou d'un équivalent de l'acide pyruvique [8], sur un aldose protégé. Cette réaction qui s'accompagne de la création d'un carbone asymétrique, n'est en général que diastérosélective.

- La condensation d'un équivalent de l'acide glyoxylique, sur un dihydroxy-diène [9], sur un aldose protégé [10], ou sur un polyol protégé porteur d'un groupement substituable sur le carbone primaire C₁ [11]. Dans ce

* Correspondance et tirés à part

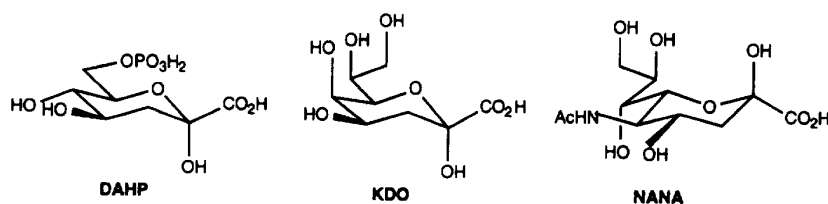


Fig 1

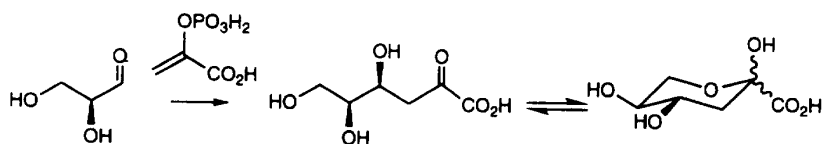


Fig 2

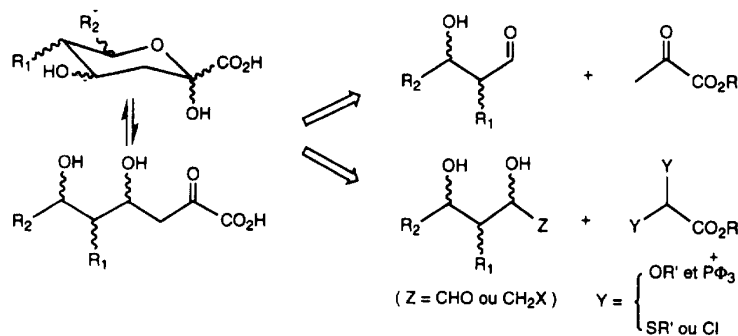


Fig 3

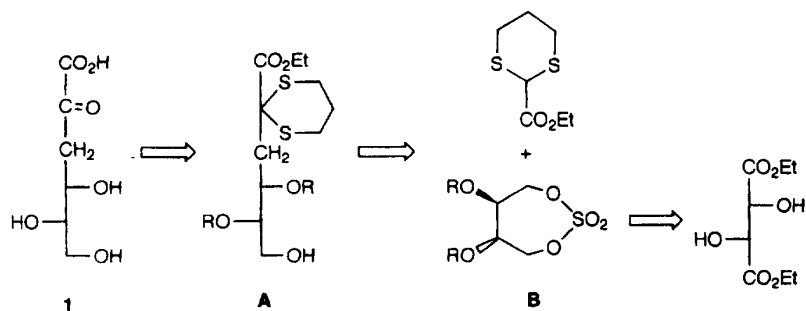


Fig 4

dernier cas seulement, le problème de la diastéréosélectivité ne se pose pas (fig 3).

La synthèse de l'acide 3-désoxy-L-thréo-2-hexulosonique **1** que nous avons réalisée se situe dans la deuxième catégorie puisqu'elle utilise un synthon naturel, le L-(+)-tartrate de diéthyle, pour apporter les deux carbones asymétriques sous la bonne configuration et qu'elle implique le couplage, par substitution nucléophile, de deux fragments respectivement porteurs de deux et quatre atomes de carbone.

Comme dans la synthèse du KDO réalisée par Van Boom [11b], nous mettons à profit la réactivité électrophile des sulfates organiques cycliques [12]. En

effet l'étape clé de notre synthèse sera l'ouverture régio-spécifique du sulfate cyclique B, dérivé du L-(+)-tartrate de diéthyle, par l'anion du 2-éthoxycarbonyl-1,3-dithiane qui réalise l'introduction du groupement α -oxo-carboxyle protégé, dans le squelette de l'alcool A. Il restera à réaliser sélectivement plusieurs modifications fonctionnelles de cette molécule, dans un ordre déterminé (fig 4).

Préparation du sulfate cyclique 4b

La synthèse du diol **3**, dont il est issu, est réalisée à partir du L-(+)-tartrate de diéthyle en deux étapes

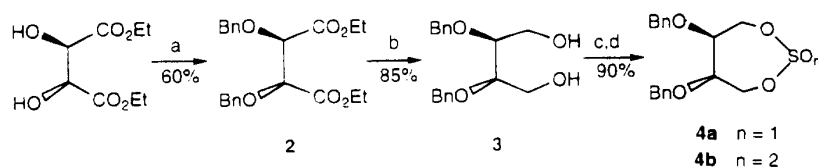


Fig 5. Réactifs : a) Bu₄NI, BnBr. b) LAH. c) SOCl₂, NEt₃. d) NaIO₄, RuCl₃.

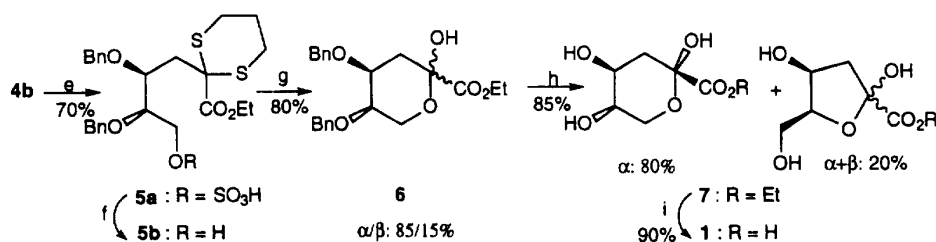


Fig 6. Réactifs : e) 2-éthoxycarbonyl-1,3-dithiane, *n*BuLi/HMPT. f) H₂SO₄/H₂O. g) NCS, AgNO₃. h) H₂/Pd/C. i) Na₂CO₃, Dowex 50W-X8 H⁺.

selon une méthode récente [13]. On prépare d'abord l'éther dibenzyle **2** à 25°C dans le tétrahydrofurane à partir du bromure de benzyle et de l'hydruide de sodium, ensuite on le réduit par l'alumino-hydruide de lithium au reflux de l'éther. Après purification on dispose du diol **3** avec un rendement global de 51%.

Le diol **3** est transformé en sulfate cyclique **4b** en deux étapes, par la méthode Sharpless [14]. Tout d'abord par traitement au chlorure de thionyle, en présence de triéthylamine, on obtient un sulfite cyclique **4a** qui est ensuite oxydé à 20°C en sulfate par le tétraoxyde de ruthénium avec un excellent rendement, 96% (fig 5).

Préparation du dibenzylxy-ester **6**

L'anion du 2-éthoxycarbonyl-1,3-dithiane, préparé à l'aide du *n*-butyllithium, réalise l'ouverture du sulfate cyclique **4b** à la température ambiante et en présence de l'oxyde de tris(diméthylamino) phosphine.

L'ester sulfurique **5a** obtenu est alors hydrolysé *in situ* à 50°C par une quantité stoechiométrique d'eau et d'acide sulfurique, pour former le dithioacétal **5b** avec un rendement de 70%.

La déprotection de la cétone est faite par hydrolyse oxydante de Corey [15] utilisant le *N*-chlorosuccinimide et le nitrate d'argent, et conduit avec un rendement de 80% au dibenzylxyester **6** sous forme hémicétalique pyranosique avec les deux anomères α et β dans le rapport α/β voisin de 85/15. Cette proportion a été déterminée par intégration des signaux RMN à 400 MHz, des protons H₃ situés entre 2 et 2,5 ppm.

En effet dans les molécules de cette famille, telles que le KDO [6b], et les esters de l'acide *N*-acétylneuraminique [16], le proton H_{3e} est généralement moins déblindé dans l'anomère majoritaire qui est celui portant en C₂ un groupement hydroxyle axial. Il s'agit de l'anomère α pour le KDO et de l'anomère β pour le NANA et ses dérivés (fig 6).

Dans notre cas, on observe les déplacements chimiques suivants pour les protons H₃ :

δ en ppm	H _{3a}	H _{3e}
Anomère α (OH axial)	2,04	2,25
Anomère β	2,05	2,47

Préparation de l'hydroxyester **7**

L'hydrogénolyse du dibenzylxy-ester **6** réalisée sur palladium et dans l'acétate d'éthyle, fournit avec un rendement de 85% l'hydroxy-ester **7** qui se présente, en solution dans D₂O, sous formes cycliques hémicétaliques inséparables. Une forme majoritaire pyranosique (80%) est identifiable sans ambiguïté en RMN du ¹H et du ¹³C, les formes minoritaires furanosiques (20%) sont décelables par analogie avec celles de l'acide 3-désoxy-D-érythro-2-hexulose ou KDG [10d]. En effet les protons H₃ et tous les carbones sont nettement plus déblindés dans les formes furanosiques.

• Structure de la forme majoritaire

Sa conformation est du type chaise ²C₅, en raison de la valeur des constantes de couplage *J*_{3a,4} = 11,3 Hz et *J*_{4,5} = 8,5 Hz qui démontre que les protons H_{3a} et H₄ d'une part puis H₄ et H₅ d'autre part sont en position *trans*-diaxiale. La configuration de son centre chiral C₂ a été déterminée par RMN du ¹³C à 75 MHz, en mesurant directement les constantes de couplage à longue distance ³*J*_{C-1}, H_{3e} et ³*J*_{C1}, H_{3a}, après triple découplage sélectif et simultané de l'un des protons H₃ et des protons du groupement éthyle [17]. Les valeurs observées :

$$J_{C1, H_{3a}} = 1,3 \text{ Hz et } J_{C1, H_{3e}} = 1,1 \text{ Hz}$$

qui dépendent de la grandeur de l'angle dièdre (C₁, C₂)/(C₃, H₃), prouvent la disposition *trans*-diéquatoriale des atomes C₁ et H_{3e}, donc la configuration α du carbone C₂, de cette molécule qui appartient à la série L [18] (fig 7).

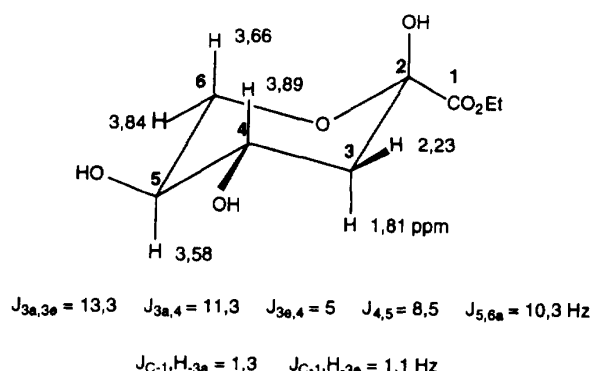


Fig 7. RMN de l'anomère 7 α .

Préparation de l'hydroxy-acide 1

La saponification de l'hydroxy-ester 7 par une solution aqueuse de carbonate disodique, suivie d'une neutralisation à pH = 3 par la résine Dowex 50W-X8(H⁺), conduit à l'acide 1 avec un rendement de 90%.

L'analyse RMN du ¹H et du ¹³C de cet acide en solution dans D₂O, fait apparaître les mêmes formes cycliques hémiacétaliques que celles de son ester éthylique 7, dans des proportions voisines.

Conclusions

Synthèse

Nous proposons la première synthèse chimique de l'acide 3-désoxy-L-thréo-2-hexulosonique 1; simple et efficace elle est réalisée en huit étapes à partir d'un synthon commercial peu onéreux, le L-(+)-tartrate de diéthyle, avec un rendement de 20% via un sulfate organique cyclique porteur d'un axe de symétrie d'ordre deux.

L'étude en RMN, à haut champ et en 2D, montre que l'acide 1 ou son ester éthylique 7 existe en solution dans D₂O à 20°C sous la forme α -pyranosique principalement.

Biochimie

Cette molécule, placée dans le milieu de culture de la bactérie *Erwinia chrysanthemi*, s'est révélée être un inducteur gratuit, c'est-à-dire non métabolisable, de la biosynthèse des enzymes pectinolytiques chez cette bactérie.

– En effet, en se combinant à la protéine répresseur, elle entraîne son détachement de sa zone de fixation sur l'ADN permettant la lecture du code génétique. Elle est donc le signal qui déclenche la synthèse des enzymes.

– L'épimère en C₅ de cet acide, le KDG, métabolite important de la dégradation des polygalacturonates par *Erwinia chrysanthemi*, qui joue le même rôle tout en étant consommé, est un inducteur vrai [19].

– Ces résultats indiquent que la stéréochimie du carbone C₅ dans la molécule inducteur n'intervient pas pour la reconnaissance inducteur-répresseur.

Partie expérimentale

Toutes les réactions sont réalisées sous atmosphère d'azote sec dans de la verrerie préalablement portée à 150°C, avec solvants purifiés par distillation sur desséchant approprié.

– Le *n*-butyllithium est dosé par l'acide diphenylacétique [20].

– Les réactions sont suivies en CCM de silice Merck 60 F254, révélables par une solution d'acide phosphomolybdique à 3% dans l'éthanol à 95°.

– Les phases organiques sont, dans le traitement final, généralement amenées à pH neutre puis séchées sur sulfate de magnésium anhydre, avant évaporation sous vide de la trompe à eau, à température inférieure à 40°C.

– La chromatographie éclair utilise une silice de 35-70 m et comme éluants, l'éther éthylique (EE), l'éther de pétrole (EP), le dichlorométhane (DM), l'acétone ou le méthanol.

– Les pouvoirs rotatoires sont mesurés à 20°C sur un polarimètre Perkin-Elmer 241 (solvant : CHCl₃ pour spectroscopie contenant 0,6% d'éthanol, *c* en g/100 mL), [α]_D obtenus avec précision de 5%.

– Les spectres IR (en film sur pastille de NaCl) sont enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 1720X; la fréquence des vibrations est donnée en cm⁻¹.

– Les spectres RMN du ¹H et du ¹³C (référence TMS, solvant CDCl₃, δ en ppm, *J* en Hz) sont enregistrés sur un spectrographe Bruker AM300.

La multiplicité des atomes de carbone est déterminée par DEPT-135, l'attribution est faite par découplage sélectif ou corrélation hétéronucléaire HSQC gradient en mode phasé.

– Les spectres de masse sur un appareil Nermag R10-10H, par impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

– Les analyses élémentaires, des seuls produits nouveaux, sont réalisées par le service central d'analyses du CNRS à Vernaison.

Acide 3-désoxy-L-thréo-2-hexulosonique 1

Une solution d'ester 7 (260 mg, 1,262 mmol) et de carbonate disodique (200 mg, 3 équiv) dans 7 mL d'eau est agitée 4 h à la température ambiante. Après addition de 3 mL d'eau, on acidifie progressivement jusqu'à pH = 3 avec de la résine humide Dowex 50W-X8(H⁺), puis on agite 15 min. La résine est isolée par filtration et lavée avec 10 mL d'eau. Les filtrats sont rassemblés pour lyophilisation et donnent après séchage sous vide, sur P₂O₅ et KOH, un solide très hygroscopique de 204 mg (Rdt = 90%).

CCM : *R_f* = 0,3 (CHCl₃/CH₃OH : 1/1). [α]_D = - 6,8 (*c* = 2,5 dans H₂O).

IR : 3 400, 2 500, 1 746, 1 148, 1 070.

RMN ¹H : (tableau I).

RMN ¹³C : (tableau II), de l'isomère majoritaire, l' α -pyranosique (80%).

SM : 142 (4); 112 (5); 97 (20); 69 (25); 44 (100); 39 (20); 31 (30); 18 (65).

Anal calc % pour C₈H₁₀O₆ : C 40,4; H 5,6. Tr : C 40,1; H 5,7.

(2R,3R)-2,3-Bis(benzoyloxy)butane-1,4-dioate de diéthyle 2

Préparé selon [13] à partir du L-(+)-tartrate de diéthyle Aldrich ([α]_D = +8,5 pur)(10,3 g, 20 mmol); purifié par chromatographie (100 g de silice, EE/EP : 20/80); masse obtenue 11,6 g (Rdt = 60%).

CCM : *R_f* = 0,36 (EE/EP : 50/50); [α]_D = +120 (*c* = 2,94). IR : 3 030, 1 757, 1 455, 1 369, 1 270, 1 100, 1 028, 740, 699.

Tableau I. RMN du ^1H à 300 MHz.

H^b	$1\beta^c$	$5b^f$	$6\alpha^d$	$6\beta^d$	$7\beta^c$
3a	1,76 (d,d, 11,5-13)		2,05 (d,d, 11-14)	2,07 (d,d, 11-13)	1,81 (d,d, 11,3-13,3)
3e	2,20 (d,d, 5-13)	2,36 (d, 6)	2,47 (d,d, 3,5-14)	2,25 (d,d, 5-13)	2,23 (d,d, 5-13,3)
4	3,4-3,7 m	4,15 (t,d, 6-4,7)		3,95 (d,d,d, 5-8,8-11)	3,89 (d,d,d, 5-8,6-11,3)
5		3,65 m		3,65 (d,d,d, 6-8,8-10,3)	3,58 (d,d,d, 5-8,5-10,3)
6a	3,7-3,9 m	3,75 m		3,77 (t-11)	3,66 (t-10,3)
6e				3,84 (d,d, 6-11)	3,84 (d,d, 5 et 10,3)
7		3,95 (2q,d, 7-9,7)		4,25 (2q,d, 7)	4,26(q, 7)
8		1,17 (t, 7)		1,31 (t, 7)	1,27 (t, 7)
9		4,55 (2d, 10,6)		4,72 (2d, 10,5)	
		4,65 (2d, 11,5)		4,76 (2d, 11,7)	
10		7,3 m		7,34 m	

NB : b) Numérotation des carbones correspondants, c) spectre dans D_2O , d) spectre à 400 MHz, f) Hydrogènes du dithiane : 1,9 m; 2,1 m; 2,72 m; 3,1 (t,d, 11,5-3); 3,3 (t,d, 11,5-3).

Tableau II. RMN du ^{13}C à 75 MHz.

C^a	$1\beta^b$	$5b^c$	$6\alpha^{cd}$	$6\beta^{cd}$	$7\beta^b$
1	174	170,4	168,9	170	171,4
2	96	52,7	94,5	95	95,8
3	38,9	38,7	32	36,2	38,7
4	68,9	74,5	71,8	76,4	68,7
5	70,8	78,5	73,5	77,9	70,6
6	63,5	61,1	59,5	62,2	63,5
7		61,6	61,9	62,6	63,9
8		13,9	14	13,8	13,7
9		72,2 et 72,5	71 et 71,9	72,2 et 73,1	
CHar		127,4 à 128,2	127,3 à 128,5	127,5 à 128,3	
Car		137,7	137,1-137,9	138,4-138,5	
Cs		24,4-27,3-27,6			

NB : a) numérotation de nomenclature; b) solvant D_2O ; c) solvant CDCl_3 ; d) spectre à 100 MHz.

RMN ^1H : δ = 1,18 (t, J = 7, 6H); 3,9-4,3 (2q,d, J = 7 et 10,5, 4H); 4,39 (s, 2H, H_2); 4,45 (d, J = 12, 2H, CH_2Ph); 4,89 (d, J = 12, 2H, CH_2Ph); 7,3 (m, 10 H_{ar}).

(2S,3S)-2,3-Bis(benzyloxy)butane-1,4-diol **3**

Préparé selon [21] à partir du diester **2** (6,2 g, 16 mmol), l'hydrolyse étant réalisée à 0°C immédiatement après le reflux; purifié par chromatographie (100 g de silice, EE/EP : 50/50 puis EE : 100%); masse obtenue 4,11 g (Rdt : 85%)

CCM : R_f = 0,2 (EE 100%); $[\alpha]_D$ = +23,6 (c = 0,85).

PF : 42-45 $^\circ\text{C}$; Lit = 40 $^\circ\text{C}$ [21].

IR : 3 400, 3 030, 1 455, 1 055, 738, 699.

RMN ^1H : δ = 3,68 (s, H_2 , H_3); 3,73 (m, H_1 , H_4); 4,64 (s, CH_2Ph); 7,3 (s, 10H).

(5S,6S)-5,6-Bis(benzyloxy)-tetrahydro-1,3,2-dioxathiépane **4b**

Le mode opératoire est inspiré de [22]. Une solution de chlorure de thionyle (1,44 mL, 19,5 mmol) dans 13 mL de DM est ajoutée lentement, à la seringue, à une solution de diol **3** (3,92 g, 13 mmol) et de triéthylamine (7,4 mL, 52 mmol) dans 50 mL de DM à -10°C sous azote. Après 15 min d'agitation à cette température, on dilue avec 100 mL de DM et on lave avec de l'eau permutée (37 mL), puis de l'eau salée saturée (37 mL). Séchage et évaporation de la phase organique à 40°C fournissent une huile marron qui est filtrée sur un peu de silice avec l'éluant : DM/acétone (97/3).

Après évaporation des solvants à 40°C , le sulfite brun-orangé obtenu **4a** est dissous dans 37 mL de DM, 37 mL d'acétonitrile et 10 mL d'eau. On lui ajoute, à 0°C , une solution de periodate de sodium (5,56 g, 26 mmol) et de trichlorure de ruthénium (30 mg, 0,13 mmol) dans 44 mL d'eau. Après 3 h d'agitation à la température ambiante, on dilue avec 110 mL de DM. Le mélange est filtré, la phase aqueuse décantée et réextraite avec le même solvant. Après les traitements habituels, la purification par chromatographie (160 g de silice, DM/acétone : 99,5/0,5) d'un brut brun-noir, fournit 4,54 g de **4b** (Rdt = 96%).

CCM : R_f = 0,5 (DM/acétone : 98/2); $[\alpha]_D$ = + 94 (c = 1,05).

IR : 3 030, 1 455, 1 392, 1 201, 1 114, 990, 912, 883, 774, 742, 700.

RMN ^1H : δ = 3,66 (d,d, $J_1 = J_2$ = 2,5, H_2 , H_3); 4,31 (d,d,d, $J_1 = J_2$ = 2,5, J_3 = 13, H_1 , H_4); 4,6 (m, H_1 , H_4 et CH_2Ph); 7,3 (m, 10 H_{ar}).

SM : 273 (8); 167 (9); 107 (10); 91 (100); 77 (6); 65 (17); 39(8).

Anal calc % $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{S}$: C 59,3; H 5,5; S 8,8. Tr : C 59,9; H 5,7; S 8,5.

2-(1,3-Propanediyl)dithioacétal de 4,5-di-O-benzyl-3-désorxy-L-thréo-2-hexulosonate d'éthyle **5b**

Une solution de 2-éthoxycarbonyl-1,3-dithiane commercial (1,24 mL, 7,8 mmol) dans 16 mL de THF et 4,8 mL d'HMPT est traitée, à -70°C sous azote, par une solution de *n*-butyllithium 2,33 M dans l'hexane (3,45 mL, 7,8 mmol).

Après 2 h d'agitation à 40°C, on ajoute goutte à goutte une solution du sulfate **4b** (2,18 g, 6 mmol) dans 6 mL de THF. On agite 20 h à la température ambiante, puis hydrolyse par l'acide sulfurique à 98% (330 µL, 6 mmol) et l'eau (110 µL, 6 mmol). Après 2 h de chauffage à 50°C, on dilue avec de l'acétate d'éthyle (40 mL), puis avec de l'eau (20 mL). Après les traitements habituels, la purification par chromatographie (100 g de silice, EE/EP : 50/50) fournit 2 g de **5b** (Rdt = 70%).

CCM : $R_f = 0,38$ (EE/EP : 60/40).

$[\alpha]_D = -28,3$ ($c = 1,51$).

IR : 3 470, 3 030, 1 723, 1 455, 1 211, 1 092, 737, 699.

RMN ^1H : tableau I.

RMN ^{13}C : tableau II.

SM : 476 (2M⁺); 346 (5); 325 (5); 272 (11); 91 (100); 77 (13); 65 (11); 59 (15); 51 (31); 45 (36); 41 (70); 31 (25); 29 (36); 28 (51); 27 (40).

Anal calc % pour C₂₅H₃₂O₅S₂ : C 63,0; H 6,7; S 13,4. Tr : C 63,6; H 6,7; S 13,0.

4,5-Di-O-benzyl-3-désoxy-L-thréo-2-hexulose-6 d'éthyle **6**

Le mode opératoire est inspiré de [15]. A une solution de *N*-chlorosuccinimide (1 237 mg, 9,08 mmol) et de nitrate d'argent (1 736 mg, 10,21 mmol) dans un mélange acétonitrile-eau (45 mL, 80/20), on ajoute goutte à goutte une solution d'alcool **5b** (1 080 mg, 2,27 mmol) dans 11 mL d'acétonitrile. Un précipité blanc se forme immédiatement. Après 10 min d'agitation à la température ambiante, on ajoute successivement à une min d'intervalle, une solution de sulfite disodique saturée (4 mL), une solution de bicarbonate de sodium saturée (8 mL), une solution de chlorure de sodium saturée (4 mL). Une min après la dernière addition on dilue le milieu réactionnel avec 45 mL de tétrachlorométhane, agite et filtre. Après décantation et extraction de la phase aqueuse, qui doit rester basique, avec le même solvant on sèche et concentre la phase organique dont la purification par chromatographie (25 g de silice, DM/acétone : 99/1) donne 700 mg de **6** (Rdt : 80%).

CCM : $R_f = 0,35$ (DM/acétone : 98/2).

$[\alpha]_D = -3,7$ ($c = 1,5$).

IR : 3 450, 3 060, 1 746, 1 273, 1 217, 1 142, 1 098, 742, 699.

RMN ^1H (400 MHz) : tableau I.

RMN ^{13}C (100 MHz, tableau II), des 2 anomères pyranosiques α et β , tels que $\alpha/\beta = 85/15$.

SM : 171 (5); 107 (6); 91 (50); 79 (8); 77 (6); 65 (10); 51 (8); 43 (10); 39 (8); 29 (20); 18 (100).

Anal calc % pour C₂₂H₂₆O₆ : C 68,4; H 6,7. Tr : C 67,8; H 6,6.

3-Désoxy-L-thréo-2-hexulose-6 d'éthyle **7**

Le dibenzyl-ester **6** (660 mg, 1,71 mmol) en solution dans l'acétate d'éthyle (20 mL) est hydrogéné en présence de Pd/C à 10% (300 mg), sous une pression de 5 cm de mercure. Au bout de 2 h le mélange est filtré, le catalyseur lavé au méthanol. Après évaporation des filtrats, le résidu est purifié par chromatographie (10 g de silice, DM/CH₃OH : 12/1) et fournit 300 mg de **7** (Rdt = 85%).

CCM : $R_f = 0,4$ (DM/CH₃OH : 10/1).

$[\alpha]_D = -7$ ($c = 1$).

IR : 3 400, 1 742, 1 274, 1 142, 1 068.

RMN ^1H (D₂O, tableau I).

RMN ^{13}C (D₂O, tableau II) de l'isomère majoritaire, l' α -pyranosique (80%). Pour mesurer les $^3J_{C_1, H_3}$ on réalise, pendant l'acquisition du spectre ^{13}C de la molécule, un triple découplage basse puissance ($\gamma B_1/2M = 30$ Hz) simultané et sélectif sur les positions : 1,27 ppm (H₈); 1,81 ppm (H_{3a}); et 4,26 ppm (H₇). Seule la constante de couplage $^3J_{C_1, H_{3e}} = 1,1$ Hz subsiste sur le signal de C₁. La même opération est réalisée avec H_{3e} (2,23 ppm) et donne : $^3J_{C_1, H_{3a}} = 1,3$ Hz.

SM : 175 (5); 157 (12); 145 (21); 133 (81); 117 (22); 115 (16); 97 (62); 89 (34); 73 (41); 71 (87); 61 (11); 57 (41); 55 (31); 43 (43); 18 (100).

Anal calc % C₈H₁₄O₆ : C 46,6; H 6,8. Tr : C 46,3; H 6,9.

Biochimie

La souche d'*Erwinia chrysanthemi* A410 (*kdgT^C*) [23] a été utilisée pour tester les propriétés des composés **1** et **7**. Les bactéries ont été cultivées à 30°C dans le milieu minimum M63.

L'activité pectate-lyase a été dosée selon [24] : 0,95 mL de mélange réactionnel (Tris-HCl 50 mM, pH = 8,5); polygalacturonate 0,125%, CaCl₂ 1 mM) est préchauffé à 37°C, la réaction est démarrée par l'addition de 50 µL de surnageant de culture.

L'activité pectate-lyase est estimée par mesure de la densité optique à 230 nm, l'unité est la quantité d'enzyme qui catalyse la formation de 1 µmol de produits insaturés par minute. L'activité spécifique est exprimée en unités par mg de poids sec bactérien (U/mg).

Résultats

Additif au milieu de culture	1	7	GL	GL + 1	GL + 7
Croissance					
d' <i>E. Chrysanthemi</i>	0	0	+	+	+
Activité spécifique	0	0	0,02	16	19

Les composés **1** et **7** ajoutés, à la concentration de 0,1%, à un milieu contenant du glycérol (GL) à la concentration de 0,2% comme source de carbone, augmentent la synthèse des pectate-lyases d'un facteur 1000.

Remerciements

Les auteurs remercient la Région Rhône-Alpes pour son aide financière.

B Fössel (Université de Würzburg) et M Stenzel (Université de Clausthal-Zellerfeld) remercient la Communauté Européenne pour l'attribution d'une bourse Erasmus.

Ce travail a fait l'objet d'une communication préliminaire présentée aux Journées Lavoisier de la SFC en septembre 1994 à Villeurbanne.

Références

- 1 Albersheim P, Darwill A, *Pour la Science* (1985), 18
- 2 Nasser W, Reverchon S, Condemine G, Robert-Baudouy J, *J Mol Bio* (1994) 236, 427
- 3 Ganem B, *Tetrahedron* (1978) 34, 3354
- 4 Unger F, *Adv Carbohydr Chem Biochem* (1981) 38, 323
- 5 De Ninno MP, *Synthesis* (1991) 583
- 6 Schauer R, *Adv Carbohydr Chem Biochem* (1982) 40, 131
- 7 a) Hershberger C, Binkley SB, *J Biol Chem* (1968) 243, 1578
b) Portsmouth D, *Carbohydr Res* (1968) 8, 193

- 8 a) Augé C, Delest V, *Tetrahedron Asymmetry* (1993) 4, 1165
b) Dondoni A, Marra A, Merino P, *J Am Chem Soc* (1994) 116, 3324
- 9 Lubineau A, Augé J, Lubin N, *Tetrahedron* (1993) 49, 4639
- 10 a) Fritz H, Baschang G, *Helv Chim Acta* (1969) 52, 300
b) Ramage R, Macleod AM, Rose GW, *Tetrahedron* (1991) 47, 5625
c) Krülle T, Schmidt RR, Brade H, Holst O, *Carbohydr Res* (1994) 254, 141
d) Plantier-Royon R, Anker D, Robert-Baudouy J, *J Carbohydr Chem* (1991) 10, 239
e) Courtrot P, Grison C, Tabyaoui M, *Tetrahedron Lett* (1993) 34, 5089
- 11 a) Imoto M, Kusumoto S, Shiba T, *Tetrahedron Lett* (1987) 28, 6235
b) Van der Klein PAM, Boons GJPH, Veeneman GH, Van der Marel GA, Van Boom JH, *Tetrahedron Lett* (1989) 30, 5477
- 12 Lohary BB, *Synthesis* (1992) 1035
- 13 Nemoto H, Takamatsu S, Yamamoto Y, *J Org Chem* (1991) 56, 1321
- 14 Gao Y, Sharpless KB, *J Am Chem Soc* (1988) 110, 7538
- 15 Corey EJ, Erickson BW, *J Org Chem* (1971) 36, 3553
- 16 a) Baumberger F, Vassela A, *Helv Chim Acta* (1986) 69, 1205
b) Haverkamp J, Van Hableek H, Dorland L, Vliegenthart JFG, Pfeil R, Schauer R, *Eur J Biochem* (1982) 122, 305
- 17 Garner CC, Herrmann KM, *Carbohydr Res* (1984) 132, 317
- 18 Shallenberger RS, In : *Advanced Sugar Chemistry*, Ed Avi, Westport, 1982, p 12
- 19 Plantier-Royon R, Cardona F, Anker D, Condemine G, Nasser W, Robert-Baudouy J, *J Carbohydr Chem* (1991) 10, 787
- 20 Kofron WC, Baclawski LM, *J Org Chem* (1976) 41, 1879
- 21 Cunningham AF, Kündig EP, *J Org Chem* (1988) 53, 1823
- 22 Kim BM, Sharpless KB, *Tetrahedron Lett* (1989) 30, 655
- 23 Condemine G, Robert-Baudouy J, *J Bacteriol* (1987) 169, 1972
- 24 Morau F, Nasuno S, Starr M, *Arch Biochem Biophys* (1968) 123, 293