

SYNTÈSE DU

6-O- β -D-GALACTOFURANOSYL-D-GALACTOPYRANOSE*

JEAN-CLAUDE JACQUINET ET PIERRE SINAY†

Laboratoire de Biochimie Structurale, U.E.R. de Sciences Fondamentales et Appliquées,
45045 Orléans Cedex (France)

(Reçu le 26 octobre 1973; accepté sous forme modifiée le 11 février 1974)

ABSTRACT

6-O- β -D-Galactofuranosyl-D-galactose was obtained in crystalline form by condensation of 3,5,6-tri-O-acetyl-1,2-O-(1-methoxyethylidene)- α -D-galactofuranose with benzyl 2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranoside, followed by O-deacetylation and catalytic hydrogenation. This compound is identical with that isolated from the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* by partial acid hydrolysis.

SOMMAIRE

Le 6-O- β -D-Galactofuranosyl-D-galactose a été obtenu sous forme cristalline par condensation du 3,5,6-tri-O-acétyl-1,2-O-(1-méthoxyéthylidène) α -D-galactofuranose avec le benzyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranoside, suivie d'une O-désacétylation et d'une hydrogénéation catalytique. Ce composé est identique à celui qui est isolé de la paroi cellulaire de *Mycobacterium tuberculosis* après hydrolyse acide partielle.

INTRODUCTION

Parmi les produits de l'hydrolyse acide partielle de l'arabinogalactanne des parois cellulaires et de la cire D de *Mycobacterium tuberculosis* un digalactoside a été isolé dont l'unité non réductrice est sous forme furanoïde². La structure 5-O- α -D-galactofuranosyl-D-galactopyranose, d'abord proposée², a ensuite été modifiée en 6-O- β -D-galactofuranosyl-D-galactopyranose³. La synthèse de ce dernier disaccharide a donc été entreprise dans le but de confirmer définitivement la structure du digalactoside naturel.

*Cet article est dédié au Professeur E. Lederer en l'honneur de son 65^e anniversaire [voir *Biochimie*, 55, (1973), N° 5]. Ce travail a bénéficié de subventions de la Fondation pour la Recherche Médicale Française et du Centre National de la Recherche Scientifique. Une communication préliminaire a été présentée¹.

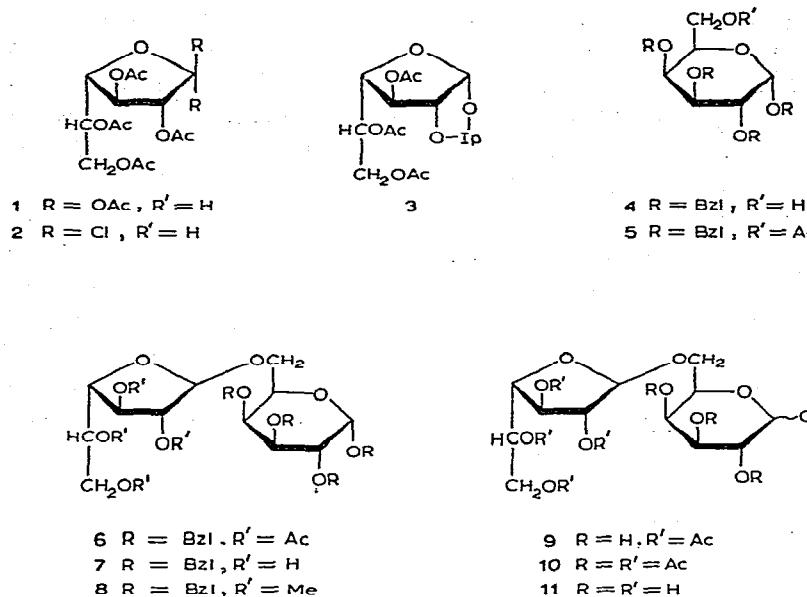
†Auquel doivent être adressées les demandes de renseignements ou de tirés-à-part.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'unité D-galactofuranoïde est assez fréquente dans les polysaccharides de microorganismes³⁻⁵. Par contre les disaccharides contenant le D-galactofuranose comme unité non réductrice et isolés à partir de ces polymères sont rares^{3,4}, par suite de l'hydrolyse très rapide de la liaison galactofuranoside. À notre connaissance, deux seulement de ces composés ont été synthétisés : le 3-O- β -D-galactofuranosyl-D-mannitol⁶ et le méthyl-(3-O- β -D-galactofuranosyl)- α -D-glucopyranoside⁷. Dans les deux cas la méthode de Kochetkov *et al.* a été utilisée⁶. Elle a été également employée ici. Le 3,5,6-tri-O-acétyl-1,2-O-(1-méthoxyéthylidène)- α -D-galactofuranose (3) est préparé selon Kochetkov *et al.*⁶ à partir du chlorure du 2,3,5,6-tétra-O-acétyl- β -D-galactofuranosyle (2). L'élimination des traces de 2,6-diméthylpyridine semble essentielle⁶, cette base pouvant inactiver le catalyseur (bromure mercurique) utilisé dans l'étape suivante. Glaudemans⁷ préconise à cet effet une double chromatographie sur une colonne de gel de silice, l'alumine n'étant pas efficace selon lui. Nous avons constaté que les traces de 2,6-diméthylpyridine sont totalement éliminées par une seule chromatographie sur colonne de gel de silice, au moyen du mélange de solvants benzène-éther (2:1, v/v). Le chlorure 2 a été préparé à l'état cristallin avec un rendement de 85 % selon Korytnyk et Mills⁸ [par action du chlorure d'aluminium, dans le chloroforme, sur le 1,2,3,5,6-penta-O-acétyl- β -D-galactofuranose (1)]. Quant au pentaacétate 1, on l'obtient avec un rendement très satisfaisant (de l'ordre de 70%) à partir du D-galactose, en modifiant le récent procédé de Chittenden⁹ : le diéthyl dithio-acétal du D-galactose¹⁰ est transformé en méthyl- β -D-galactofuranoside selon Pacsu¹¹, mais le produit de la réaction, sans être isolé, est directement acétylé, puis acétolysé. Dans ces conditions, le pentaacétate 1 a été obtenu à l'état cristallin avec un rendement de 86 % à partir du diéthyl dithio-acétal du D-galactose.

Habituellement, le 1,2:3,4-di-O-isopropylidène- α -D-galactopyranose est utilisé pour la synthèse de disaccharides du type α - ou β -X-(1 → 6)-D-galactose. Mais l'hydrolyse acide des groupements isopropylidène s'accompagne souvent d'une rupture partielle de la liaison glycosidique, même dans le cas de structures pyranosidiques¹²; l'emploi de l'acide trifluoroacétique donne les meilleurs résultats¹³, mais les rendements ne sont pas quantitatifs^{13,14}. Ce type de groupement est donc à éviter ici, la liaison galactofuranosidique étant particulièrement fragile en milieu acide. Le benzyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranoside¹⁵ (4) a donc été choisi comme précurseur de la partie réductrice de 11.

La condensation de l'orthoacétate 3 avec le galactopyranoside 4, selon Kochetkov *et al.*⁶, donne, avec un rendement de 51 %, le disaccharide protégé 6 à l'état amorphe. Par désacétylation, le composé 7 est obtenu à l'état cristallin. L'hydrogénéation catalytique de 6 donne le disaccharide réducteur 9 à l'état sirupeux, dont le peracétate 10 présente, en chromatographie sur couche mince de gel de silice, deux taches très voisines (vraisemblablement les pyranoses anomères α et β). Le spectre de masse de 10 est en accord total avec la structure proposée et est identique à celui de l'octaacétate du produit naturel, dont l'analyse a été décrite³. L'hydrogénéation catalytique de 7



donne le 6-O- β -D-galactofuranosyl-D-galactopyranose (11), à l'état cristallin. Le pouvoir rotatoire et la vitesse de migration (chromatographie sur papier) sont très voisins de ceux du disaccharide naturel³.

La nature furanosidique de la partie non réductrice de 11 peut être tenue pour certaine en raison du procédé de synthèse et du spectre de masse de son peracétate 10 (fort pic à m/e 533, correspondant à $M^+ - CH_2OAc - CHOAc$). Les éthers benzyliques de 4 n'ayant aucune tendance à migrer, le caractère (1 → 6) de la liaison est également certain. Une confirmation supplémentaire de ces deux éléments structuraux est obtenue par une méthylation de 7, selon Coggins et Benoiton¹⁶, qui donne quantitativement le composé 8. Une hydrolyse acide douce permet alors d'obtenir, avec un excellent rendement, d'une part le 2,3,5,6-tétra-O-méthyl-D-galactofuranose (identique en chromatographie en phase gazeuse avec un échantillon authentique préparé par hydrolyse acide douce du méthyl-2,3,5,6-tétra-O-méthyl- β -D-galactofuranoside) et d'autre part le composé 4 à l'état cristallin. Enfin, les pouvoirs rotatoires moléculaires de 6 et 7 sont en faveur d'une liaison glycosidique β -D, que l'on peut attendre d'après le procédé de synthèse. Les spectres de r.m.n. des deux dérivés 6 et 8 ne permettent pas le repérage facile du proton anomère interne. Par contre le spectre du composé 11 montre clairement ce proton (δ 5,2), dont la faible constante de couplage ($J_{1,2}$ inférieur à 1 Hz) est en faveur d'une liaison glycosidique β -D.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Conditions générales. — Les points de fusion sont mesurés dans un tube capillaire au moyen d'un appareil Büchi et ne sont pas corrigés. Les pouvoirs rotatoires

sont déterminés au moyen d'un polarimètre Perkin-Elmer modèle 141, les spectres infra-rouge sont enregistrés sur un spectrophotomètre Jouan-Jasco IRA-1, les spectres de résonance magnétique nucléaire sur un appareil Bruker 90 MHz, les spectres de masse sur un appareil AEI MS 9. Les chromatographies en phase gazeuse sont effectuées au moyen d'un appareil Girdel (Modèle 3000), muni d'un détecteur à ionisation de flamme, en utilisant une colonne en pyrex (3 m) de 4 % de OV-17 sur Gas-Chrom Q (80-100 mesh), la température du four étant maintenue à 140°. L'homogénéité des composés préparés est contrôlée par chromatographie sur des plaques de verre recouvertes de gel de silice Merck HF 254 (épaisseur 0,25 mm) et révélées par vaporisation d'une solution alcoolique à 50 % d'acide sulfurique concentré et chauffage au moyen d'un épiradiateur. Les chromatographies sur colonne sont effectuées au moyen de gel de silice Merck (0,063-0,200 mm). Les analyses élémentaires ont été effectuées par Madame Delbove (U.E.R. de Sciences Fondamentales et Appliquées, Orléans) et par le Service Central de Microanalyse du Centre National de la Recherche Scientifique (Thiais).

1,2,3,5,6-Penta-O-acétyl-β-D-galactofuranose (1). — Le diéthyl dithio-acétal du D-galactose¹⁰ (20 g) est vigoureusement agité durant 3 h dans du méthanol anhydre (300 ml) en présence de chlorure mercurique (50 g), d'oxyde jaune de mercure (50 g) et de sulfate de calcium anhydre (20 g). Après refroidissement à 0°, les solides sont essorés et de la pyridine (18 ml) est ajoutée au filtrat. Au bout de 3 h à 0°, le précipité formé est essoré; le filtrat est évaporé à sec, le résidu est dissous dans du méthanol (100 ml) et la solution maintenue de nouveau à 0° pendant 3 h. Après essorage du précipité, le filtrat est évaporé à sec, le résidu séché sous vide poussé et acétylé à température ambiante par un excès d'anhydride acétique dans la pyridine. Au bout de 12 h, du méthanol (50 ml) est ajouté et les solvants sont évaporés à sec. Le résidu obtenu est dissous dans du chloroforme (500 ml), et la solution est ensuite lavée successivement avec des solutions à 10 % d'hydrogénocarbonate de sodium et d'hydrogénosulfate de potassium, puis à l'eau et, enfin, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le résidu (20 g) est dissous à 0° dans un mélange d'acide acétique (350 ml), d'anhydride acétique (100 ml) et d'acide sulfurique concentré (15 ml). Après 1 h à 0°, l'ensemble est maintenu à température ambiante pendant 20 h, puis versé dans une solution aqueuse glacée d'acétate de sodium. Le mélange est alors extrait au chloroforme et les extraits chloroformiques sont lavés successivement avec une solution à 10 % d'hydrogénocarbonate de sodium, puis à l'eau et, enfin, séchés sur sulfate de sodium et évaporés. Le résidu, cristallisé dans de l'éther, donne 1 (23,5 g, 86 %), p.f. 99-100°, $[\alpha]_D^{20} -42,8^\circ$ (c, 1, dichlorométhane); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{Nuol}} 1750$ (OAc); spectre de r.m.n. (chloroforme-*d*) : δ 6,20 (s, 1 H, proton anomère, $J_{1,2}$ 0), 2,15 et 2,07 (2 s, 15 H, Ac), le reste du spectre (6 H) n'a pas été analysé; litt.⁹ : p.f. 96-97°, $[\alpha]_D^{22} -41,5^\circ$ (dichlorométhane); spectre de r.m.n.⁷.

3,5,6-Tri-O-acétyl-1,2-O-(1-méthoxyéthylidène)-α-D-galactofuranose (3). — Le chlorure de 2,3,5,6-tétra-O-acétyl-β-D-galactofuranosyle⁸ (2, 4,0 g) est traité comme décrit par Kochetkov *et al.*⁶. Le résidu obtenu est totalement débarrassé de la 2,6-diméthylpyridine au moyen d'une chromatographie sur colonne de gel de silice

(120 g) à l'aide du mélange de solvants benzène-éther (2:1, v/v); le composé 3 (3,70 g, 91 %) est ainsi obtenu sous forme d'un sirop, $[\alpha]_D^{20} + 25,5^\circ$ (*c* 1, dichlorométhane); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ 1750 (OAc); litt.⁶ : $[\alpha]_D + 24^\circ$ (chloroforme).

Benzyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-(2,3,5,6-tétra-O-acétyl- β -D-galactofuranosyl)- α -D-galactopyranoside (6). — L'orthoester 3 (724 mg) et le benzyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranoside¹⁵ [4, 1,08 g, p.f. 97-99°, $[\alpha]_D^{20} + 51^\circ$ (*c* 0,7, chloroforme)] sont dissous dans du nitrométhane anhydre (15 ml) en présence de bromure mercurique (50 mg). Au bout de 3 h à la température ambiante, de l'orthoester (110 mg) et du bromure mercurique (10 mg) sont rajoutés. Une nouvelle addition des mêmes quantités est effectuée au bout de 5 h et 6,5 h après cette dernière addition, l'ensemble est chauffé à 100° pendant 1,5 h, puis refroidi à la température ambiante. De la pyridine (0,3 ml) est ajoutée au mélange, qui est dilué avec du chloroforme (150 ml); la phase organique est lavée d'abord par une solution à 10 % de chlorure de sodium, puis par de l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Un examen du résidu (2,3 g) sur couche mince de gel de silice (chloroforme-acétone, 47:3, v/v) montre la présence d'orthoester 3, de benzyl-galactoside 4 et du produit attendu; les R_F de ces deux derniers composés étant très voisins, le résidu est acétylé (anhydride acétique-pyridine) et le produit chromatographié sur une colonne de gel de silice (120 g) [chloroforme-acétone (24:1, v/v)]. Le premier produit élué est le benzyl-6-O-acétyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranoside (5, 315 mg), suivi du produit de condensation 6 (885 mg, 51 %), huileux, $[\alpha]_D^{20} + 11,2^\circ$ (*c* 1, chloroforme); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ 3060 (Ph), 1750 (OAc), 1500, 730 et 690 cm^{-1} (Ph).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{48}\text{H}_{54}\text{O}_{15}$: C, 66,19; H, 6,25; O, 27,56. Trouvé : C, 66,38; H, 6,15; O, 27,34.

Le composé 5 (315 mg) est désacétylé (méthanol-triéthylamine); le résidu, cristallisé dans le mélange éther-hexane, donne 4 (250 mg) identique au produit de départ.

Benzyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O- β -D-galactofuranosyl- α -D-galactopyranoside (7). — Le composé 6 (200 mg) est désacétylé à l'aide d'une solution de triéthylamine (0,2 ml) dans le méthanol (10 ml). Après une nuit à la température ambiante, les solvants sont évaporés; la cristallisation du résidu dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther donne 7 (148 mg, 92 %), p.f. 98-99°, $[\alpha]_D^{20} + 38^\circ$ (*c* 0,5, méthanol); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3600, 3360 (OH), 1500, 730 et 690 cm^{-1} (Ph). Ce produit est chromatographiquement pur et des cristallisations répétées ne modifient ni le point de fusion, ni l'analyse élémentaire.

Anal. Calc. pour $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{O}_{11} \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$: C, 67,49; H, 6,66; O, 25,99. Trouvé : C, 67,28; H, 6,55; O, 25,86.

Benzyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-(2,3,5,6-tétra-O-méthyl- β -D-galactofuranosyl)- α -D-galactopyranoside (8) et son hydrolyse acide. — Le composé 7 (30 mg) est dissous dans un mélange tétrahydrofurane-*N,N*-diméthylformamide (10:1, v/v, 5 ml) puis sont ajoutés, dans l'ordre, de l'iode de méthyle (1 ml) et de l'hydrure de sodium (250 mg d'une dispersion à 50 % dans de l'huile). L'ensemble est vigoureusement agité, à l'abri de la lumière, pendant 20 h à 80°. Après refroidissement et évapora-

tion à sec, le résidu solide est extrait au chloroforme, les extraits étant lavés d'abord par une solution à 10% de thiosulfate de sodium, puis par de l'eau et évaporés. Le résidu, purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice (2 g) à l'aide du mélange chloroforme-acétone (24:1, v/v), donne 8 (32 mg, 96%) sous la forme d'un sirop incolore; spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ 3080, 3040, 1600, 1495, 720 et 680 cm^{-1} (Ph).

Ce composé (20 mg) est chauffé pendant 10 h à 100° dans un mélange de *p*-dioxanne (1,5 ml) et d'acide chlorhydrique 0,1M (1 ml). Après refroidissement, la solution est neutralisée à l'aide de résine Dowex 1 (X-2, OH⁻), filtrée et évaporée. Le résidu (19 mg) est chromatographié sur une colonne de gel de silice (1,5 g) (chloroforme-acétone, 24:1, v/v). Le premier produit élué est le benzyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranoside (4, 13 mg, 92%), qui, cristallisé dans l'éther-hexane, donne des cristaux (11 mg, 78%) identiques à 4; le second produit élué est le 2,3,5,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactofuranose (5 mg, 81%), composé sirupeux. Après triméthylsilylation, un pic unique est obtenu en chromatographie en phase gazeuse (t_R 1,25 par rapport au méthyl-2,3,5,6-tétra-*O*-méthyl- β -D-galactofuranoside). La comparaison avec un témoin authentique montre que les deux échantillons sont identiques.

1,2,3,4-Tétra-O-acétyl-6-O-(2,3,5,6-tétra-O-acétyl- β -D-galactofuranosyl)- α , β -D-galactopyranose (10). — Le composé 6 (290 mg) est hydrogéné dans le méthanol (15 ml) en présence de palladium sur charbon à 10% (150 mg). Au bout de 24 h, le catalyseur est essoré et le filtrat évaporé. Une partie (80 mg) du résidu sirupeux (9, 135 mg, 83%) est acétylée à la température ambiante à l'aide d'anhydride acétique dans la pyridine. Au bout de 15 h, le milieu réactionnel est évaporé à sec; le résidu (120 mg) présente deux taches très voisines sur couche mince de gel de silice (chloroforme-acétone, 9:1, v/v).

Le spectre de masse de ce composé est en accord avec la structure proposée. Il est identique au spectre, publié, du peracétate du digalactoside naturel³.

Par *O*-désacétylation (méthanol-triéthylamine), le composé 11 est obtenu.

6-O- β -D-Galactofuranosyl-D-galactopyranose (11). — Le composé 7 (100 mg) est hydrogéné catalytiquement comme décrit précédemment. Au bout de cinq jours, le catalyseur est essoré et le filtrat évaporé. Une cristallisation du résidu dans l'éthanol donne 11 (40 mg, 82%), p.f. 170-174° (déc.), $[\alpha]_D^{20} -25^\circ$ (*c* 0,35, eau, pas de mutarotation).

Anal. Calc. pour C₁₂H₂₂O₁₁ : C, 42,10; H, 6,48; O, 51,42. Trouvé : C, 42,05; H, 6,45; O, 51,53.

Le spectre de r.m.n. (oxyde de deutérium) montre le proton interglycosidique (δ 5,2, $J_{1,2}$ très petit, configuration β), ainsi que le proton de l'extrémité réductrice pyranoïde (δ 5,45, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, configuration α). Ce dernier signal ne se modifie pratiquement pas au cours du temps.

Le composé 11 est homogène en chromatographie descendante sur papier Whatman N° 1 (1-butanol-pyridine-eau, 6:4:3, v/v), R_{Gal} 0,78 et R_{Lactose} 1,23 (révélation au phtalate d'aniline); litt.³ : produit amorphe, $[\alpha]_D -26 \pm 2^\circ$ (*c* 0,5 eau); R_{Gal} 0,77 et R_{Lactose} 1,19 (même mélange de solvants).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Docteur R. Gigg pour un don généreux de benzyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranoside, le Docteur B. C. Das pour l'enregistrement du spectre de masse du peracétate du digalactoside et Monsieur C. Merser pour l'enregistrement des spectres de résonance magnétique nucléaire.

RÉFÉRENCES

- 1 J.-C. JACQUINET ET P. SINAÝ, *Réunion Sect. Locale Orléans, Soc. Chim. Fr.*, Décembre 1973.
- 2 E. VILKAS, J. MARKOVITS, C. AMAR ET E. LEDERER, *C. R. Acad. Sci. Paris*, C, 273 (1971) 845.
- 3 E. VILKAS, C. AMAR, J. MARKOVITS, J. F. G. VLEIGENTHART ET J. P. KAMERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 297 (1973) 423.
- 4 P. A. J. GORIN ET J. F. T. SPENCER, *Can. J. Chem.*, 37 (1959) 499.
- 5 D. J. MANNERS, I. R. PENNIE ET J. F. RYLEY, *Carbohydr. Res.*, 29 (1973) 63.
- 6 N. K. KOCHETKOV, A. Y. KHORLIN ET A. F. BOCHKOV, *Tetrahedron*, 23 (1967) 693.
- 7 C. P. J. GLAUDEMANS, *Carbohydr. Res.*, 10 (1969) 213.
- 8 W. KORYTNÝK ET J. A. MILLS, *J. Chem. Soc.*, C, (1959) 636.
- 9 G. F. J. CHITTENDEN, *Carbohydr. Res.*, 25 (1972) 35.
- 10 J. W. GREEN ET E. PACSU, *J. Amer. Chem. Soc.*, 59 (1937) 1205.
- 11 E. PACSU, *Methods Carbohydr. Chem.*, 2 (1963) 358.
- 12 A. J. ACHER ET D. SHAPIRO, *J. Org. Chem.*, 34 (1969) 2652.
- 13 A. J. ACHER, Y. RABINSON, E. S. RACHAMAN ET D. SHAPIRO, *J. Org. Chem.*, 35 (1970) 2436.
- 14 J.-C. JACQUINET, S. E. ZURABYAN ET A. Ya. KHORLIN, *Carbohydr. Res.*, 32 (1974) 137.
- 15 P. A. GENT ET R. GIGG, *J. Chem. Soc.*, Perkin I, sous presse.
- 16 J. R. COGGINS ET L. BENOITON, *Can. J. Chem.*, 49 (1971) 1968.