

## Note

### Synthèse des *p*-nitrobenzyl-1-thio- $\beta$ -chitobioside et 1-thio- $\beta$ -chitotrioside et du *p*-nitrophényl- $\beta$ -chitotrioside\*

FRANCIS M. DELMOTTE ET MICHEL L. P. MONSIGNY

Laboratoire de Chimie Biologique et Centre de Biophysique Moléculaire, C.N.R.S.,  
45045 Orléans Cedex (France)

(Reçu le 14 janvier 1974; accepté après modification le 14 mars 1974)

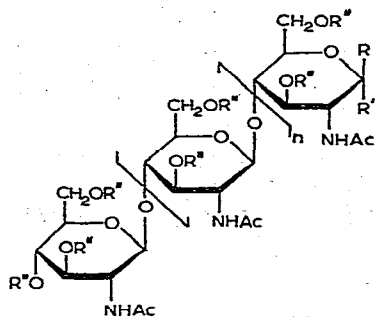
Diverses protéines présentent une affinité spécifique pour le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose, le chitobiose et ses oligomères supérieurs (chitotriose au chito-hexaose). Ces oligomères isolés à partir de la chitine ont déjà été utilisés pour élucider le mécanisme d'action du lysozyme<sup>1-12</sup>, et pour étudier les interactions de ces oligomères avec la lectine du germe de blé<sup>13-15</sup>.

Les dérivés du 2-acétamido-2-désoxy-1-thio- $\beta$ -D-glucose, du 1-thiochitobioside et des oligomères supérieurs peuvent trouver leur application dans la préparation de glycosyl-hydrolases par chromatographie d'affinité. Récemment, la préparation du *p*-nitrobenzyl-2-acétamido-2-désoxy-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside a été décrite<sup>16,17</sup>, et ce composé a été utilisé pour préparer une *N*-acétyl- $\beta$ -D-hexosaminidase<sup>16</sup>. Les 1-thioglycosides des oligomères du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose peuvent permettre de préparer des endohexosaminidases.

Un certain nombre de glycosides du chitobiose et de dérivés du 1-thiochitobiose ont été décrits par différents auteurs<sup>8,12,18-28</sup>. Nous rapportons dans ce mémoire la préparation et les caractéristiques des oligomères peracétylés du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose (1-3), de leurs chlorures de glycosyle (4, 5), de leurs chlorures de thio-uronium (6, 7) et des *p*-nitrobenzyl-1-thio- $\beta$ -chitobiosides (8, 10) et -1-thio- $\beta$ -chitotriosides (9, 11). Nous décrivons également la synthèse et les caractéristiques des *p*-nitrophényl- $\beta$ -chitotriosides (12, 13).

Les conditions d'acétolyse décrites par Barker *et al.*<sup>29</sup> ont été modifiées afin d'augmenter les proportions d'oligomères supérieurs : la température d'acétolyse est abaissée à 37° au lieu de 55°, et le temps de réaction est prolongé à 48 h au lieu de 11 h. L'extrait chloroformique de l'acétolysat est chromatographié sur une colonne de gel de silice dans des conditions voisines de celles décrites par Spinola et Jeanloz<sup>30</sup>. L'élution, réalisée par un gradient discontinu chloroforme-méthanol, permet la séparation des dérivés peracétylés du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose, du chitobiose,

\*Ce travail a bénéficié d'une aide du Centre National de la Recherche Scientifique, A.T.P. Pharmacodynamie et Chimiothérapie, n° 5111.



	n	R	R'	R''
1	0	H	OAc	Ac
2	1	H	OAc	Ac
3	2	H	OAc	Ac
4	0	H	Cl	Ac
5	1	H	Cl	Ac
6	0	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S} \quad + \quad \text{Cl}^- \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH}_2 \end{array}$	H	Ac
7	1	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S} \quad + \quad \text{Cl}^- \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH}_2 \end{array}$	H	Ac
8	0	$\text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2 (p)$	H	Ac
9	1	$\text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2 (p)$	H	Ac
10	0	$\text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2 (p)$	H	H
11	1	$\text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2 (p)$	H	H
12	1	$\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2 (p)$	H	Ac
13	1	$\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2 (p)$	H	H

du chitotriose et du chitotétraose. Ce procédé qui conduit rapidement à la préparation des premiers oligomères peracétylés du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose constitue une méthode intéressante pour synthétiser les glycosides. En particulier, le rendement de la préparation de 5 par acétylation du chitotriose suivie du traitement par le gaz chlorhydrique<sup>19</sup> n'est que de 34 %, alors qu'à partir du dérivé peracétylé ce rendement est de 62 %. L'étape limitante, dans le premier cas<sup>19</sup>, se trouve être la peracétylation.

La préparation des composés 4 et 5 dans les conditions décrites par Osawa<sup>18</sup> (action du gaz chlorhydrique dissous dans l'acide acétique) est effectuée avec un

rendement de l'ordre de 60 %. La recrystallisation des composés 4 et 5 est obtenue après dissolution à reflux dans l'acétone; à ce stade, il est indispensable de travailler dans un milieu rigoureusement anhydre et dépourvu d'acide, afin d'éviter la migration de substituants acyles<sup>7,31,32</sup>.

Dans les conditions précédemment utilisées<sup>16,33</sup>, l'action de la thiourée dans l'acétone à reflux sur les chlorures de per-*O*-acétyl- $\alpha$ -chitobioside et chitotrioside conduit aux anomères  $\beta$  des chlorures de thio-uronium (6 et 7) avec des rendements voisins de 80 %. La condensation du bromure de *p*-nitrobenzyle sur les dérivés thio-uroniums<sup>16</sup> (6 et 7) conduit aux *p*-nitrobenzyl-per-*O*-acétyl-1-thio- $\beta$ -chitobioside (8) et 1-thio- $\beta$ -chitotrioside (9) avec des rendements de 60 %. La désacétylation catalytique des composés 8 et 9 par le méthanolate de sodium est quantitative. La préparation des *p*-nitrobenzyl-1-thio- $\beta$ -chitobioside et 1-thio- $\beta$ -chitotrioside que nous décrivons conduit à des rendements d'environ 50 % à partir des chlorures de glycosyle correspondants. Jusqu'à présent, aucun thio-dérivé du chitotrioside n'a été décrit; seuls sont connus quelques thio-dérivés du chitobioside : le *p*-nitrophényl-1-thio- $\beta$ -chitobioside<sup>12</sup>, le phényl-1-thio- $\beta$ -chitobioside<sup>21</sup> et le *p*-méthylphényl-1-thio- $\beta$ -chitobioside<sup>28</sup>.

Enfin la préparation du *p*-nitrophényl-per-*O*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside (12) par condensation du *p*-nitrophénolate de potassium sur le composé 5, dans les conditions utilisées par Zurabyan *et al.*<sup>34</sup> pour préparer le dérivé du chitobiose, s'effectue avec un rendement de 36 % après recrystallisation dans le méthanol à chaud; Osawa et Nakazawa<sup>19</sup> ont obtenu un rendement de 21 %. La désacétylation catalytique du composé 12 par le méthanolate de sodium conduit quantitativement au composé 13, cristallisé. Le faible rendement obtenu au cours de la condensation s'explique par la formation d'un gel lors de l'addition d'eau à la solution de *N,N*-diméthylformamide; la même méthode appliquée au composé 4 conduit au dérivé *p*-nitrophénylé avec un rendement de 75 %.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Méthodes générales.* — Les points de fusion ont été déterminés à l'aide du microscope à platine chauffante Leitz, et ne sont pas corrigés. Les pouvoirs rotatoires optiques ont été mesurés sur le polarimètre Perkin-Elmer modèle 141. Les spectres infrarouges ont été enregistrés, en utilisant des pastilles de bromure de potassium, sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer modèle 257. Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été réalisés, à température ambiante, sur le spectromètre Bruker à 90 MHz en utilisant l'eau, le chloroforme ou le diméthyl sulfoxyde deutériés. Les signaux du tétraméthylsilane ont été pris comme référence externe ou interne pour la mesure des déplacements chimiques. Toutes les évaporations ont été effectuées sous pression réduite à 35–40° avec un évaporateur rotatif Büchi. Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur Silica-gel G (Merck), la révélation étant effectuée par chauffage des plaques après pulvérisation d'acide sulfurique à 5 %. Les chromatographies sur colonne (6 × 115 cm) ont été réalisées avec de la silice

Merck (170–325 mesh ASTH), des fractions de 22 ml étaient recueillies. La composition du système de solvants, qui dépend des composés à isoler, est prédéterminée par chromatographie sur couche mince.

*Préparation des per-O-acétyl-chitobioside, -chitotrioside et -chitotétraoside, et de leurs chlorures de glycosyle.* — La chitine brute (« practical grade », Sigma ou Fluka) finement broyée (100 g) est acétolysée dans les conditions de celles précédemment décrites<sup>29,30</sup>. Seules la durée et la température ont été modifiées; après 12 h d'agitation à 20°, la suspension est maintenue à 37° pendant 48 h. Après extraction, la solution chloroformique est concentrée à siccité, et le sirop obtenu est séché sous pression réduite à 40°. Le résidu obtenu est brunâtre (37 g à partir de la chitine Sigma, et 44 g à partir de la chitine Fluka; Barker *et al.*<sup>29</sup> obtenaient 14 g). L'acétolysat est ensuite chromatographié sur une colonne de silice<sup>30</sup>, en utilisant un gradient discontinu chloroforme-méthanol dans les proportions suivantes (v/v) 90:7 (2 l), 90:10 (2 l), 90:10,5 (2 l). Les fractions contenant les dérivés peracétylés ont été identifiées par chromatographie sur couche mince dans le système de solvants chloroforme-méthanol (9:1, v/v). Les dérivés peracétylés ont été cristallisés dans le méthanol<sup>30</sup>.

Les fractions 80–115 contiennent le dérivé peracétylé du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose (3,3 g, 1,7%)  $R_F$  0,62; les fractions 125–160, le composé 1 (5,7 g, 3,5%), p.f. 309°,  $[\alpha]_D^{25} + 53,0^\circ$  ( $c$  0,5, acide acétique);  $R_F$  0,54; litt.: 2,1% (Réf. 29, 34), 5,5% (Réf. 18), 7,8% (Réf. 12), 9,0% (Réf. 30); les fractions 165–190, le composé 2 (2,4 g, 1,6%), p.f. 316°,  $[\alpha]_D^{25} + 33,2^\circ$  ( $c$  0,5, acide acétique) (voir Réf. 29),  $R_F$  0,45; les fractions 200–210, le composé 3 (chitotétraose tétradécaacétate, 0,9 g, 0,6%), p.f. 318° (décomp.),  $[\alpha]_D^{25} + 19,9^\circ$  ( $c$  0,5, acide acétique),  $R_F$  0,37. Les fractions 215–260 contiennent les dérivés peracétylés du chitotétraose ( $R_F$  0,37), du chitopentaose ( $R_F$  0,30) et du chitohexaose ( $R_F$  0,26). Selon l'origine de la chitine les rendements varient dans de larges proportions: ainsi, à partir de la chitine Sigma, les quantités de dérivés peracétylés étaient environ deux fois plus faibles qu'à partir de la chitine Fluka.

Les chlorures de per-O-acétylchitobiosyle (4) et chitotriosyle (5) ont été préparés par la méthode d'Osawa<sup>18</sup>. Le composé 4 a été isolé avec un rendement de 62%, p.f. 205–207° (décomp.),  $[\alpha]_D^{25} + 39,9^\circ$  ( $c$  1, chloroforme) (voir Réf. 30, 34); et le composé 5 avec un rendement de 61%, p.f. 216–217° (décomp.),  $[\alpha]_D^{25} + 17,8^\circ$  ( $c$  1, chloroforme). Au cours de la recristallisation du composé 4 dans l'acétone, nous avons isolé et identifié par ses constantes physiques le chlorhydrate du 4-O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-1,3,6-tri-O-acétyl-2-amino-2-désoxy- $\alpha$ -D-glucopyranose<sup>7,8</sup> (10%), p.f. 208–209°,  $[\alpha]_D^{25} + 61,0^\circ$  ( $c$  0,6, eau);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3100–2700  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ).

*Chlorure de S-[2-acétamido-4-O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranosyl] thiouronium (6).* — Une suspension de thiourée (0,40 g) et du composé 4 (0,75 g) est portée à reflux dans l'acétone anhydre pendant 1 h. Le produit 6 cristallise par refroidissement du mélange réactionnel à 4°. Les cristaux sont filtrés, lavés à l'acétone, puis séchés

(0,46 g, 55 %), p.f. 139–140°,  $[\alpha]_{589}^{26} -28,0^\circ$ ,  $[\alpha]_{546}^{26} -33,0^\circ$  (c 1, méthanol);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3360 et 3200 (NH, C–NH<sub>2</sub>), 3050 (C=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1750 (OAc), 1660 (Amide I), 1545 (Amide II), 1230 (C–O), 700 cm<sup>-1</sup> (C–S); r.m.n. (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  2,27, 2,32, 2,36, 2,42, 2,43, 2,49 et 2,53 (7 s, 7 × 3 p, 2 NHAc et 5 OAc).

*Anal.* Calc. pour C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>15</sub>S : Cl, 4,87; N, 7,69; S, 4,39. Trouvé : Cl, 4,70; N, 7,68; S, 4,30.

*Chlorure de S*-[O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1 → 4)-O-(2-acétamido-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1 → 4)-(2-acétamido-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy-1-thio-β-D-glucopyranosyl)] thiouronium (7). — Une suspension de thiourée (0,4 g) et du composé 5 (0,8 g) dans l'acétone anhydre (40 ml) est portée à reflux pendant 1 h. Le mélange est refroidi à 4°, le résidu 7 est filtré, lavé à l'acétone puis séché sous pression réduite (0,65 g, 75 %), p.f. 254–255°,  $[\alpha]_{589}^{26} -23,1^\circ$ ,  $[\alpha]_{546}^{26} -28,9^\circ$  (c 1, méthanol);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3310 et 3200 (NH, C–NH<sub>2</sub>), 3050 (C=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 2950 (CH), 1750 (OAc), 1660 (Amide I), 1535 (Amide II), 1230 (C–O), 700 cm<sup>-1</sup> (C–S); r.m.n. (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  1,76 (1 s, 2 × 3 p, 2 NHAc), 1,79 (1 s, 3 p, 1 NHAc), 1,90 (1 s, 3 p, 1 OAc), 1,98 (1 s, 2 × 3 p, 2 OAc), 2,01 (1 s, 3 p, 1 OAc), 2,06 (1 s, 2 × 3 p, 2 OAc), 2,08 (1 s, 3 p, 1 OAc), 7,93 (1 m, 2 × 1 p, 2 NH), 8,28 (1 m, 1 p, 1 NH), 9,06 et 9,38 (2 m, 2 × 2 p, NH<sub>2</sub>—C=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>).

*Anal.* Calc. pour C<sub>39</sub>H<sub>58</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>22</sub>S : Cl, 3,50; N, 6,89; S, 3,15. Trouvé : Cl, 3,47; N, 7,21; S, 4,00.

*p*-Nitrobenzyl-2-acétamido-4-O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy-1-thio-β-D-glucopyranoside (*p*-nitrobenzyl-per-O-acétyl-1-thio-β-chitobioside) (8). — Une solution de dithionite de sodium (0,11 g) et de carbonate de potassium (0,08 g) dans l'eau (5 ml) est ajoutée goutte à goutte à une suspension du composé 6 (0,35 g) et du bromure de *p*-nitrobenzyle (0,20 g) dans l'acétone (5 ml). Après 1 h d'agitation, le précipité formé est filtré, lavé à l'acide sulfurique dilué (5 %) puis à l'eau (0,23 g, 60 %). Le résidu est repris par du méthanol bouillant (60 ml), et cette solution filtrée à chaud abandonne par refroidissement des micro-aiguilles blanches (8); le produit est homogène en c.c.m. dans le système de solvants chloroforme-méthanol (9:1, v/v) : *R*<sub>F</sub> 0,59; p.f. 294–295°,  $[\alpha]_{589}^{26} -58,4^\circ$ ,  $[\alpha]_{546}^{26} -70,4^\circ$  (c 0,56, *N,N*-diméthylformamide);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3335 (NH), 3070 (CH, Ph), 2930 et 2870 (CH), 1745 (OAc), 1660 (Amide I), 1605 et 1595 (C=C, Ph), 1530 (Amide II et NO<sub>2</sub>), 1349 (NO<sub>2</sub>), 1230 (C–O), 905 (β-glycoside<sup>18,29</sup>), 860 (C–NO<sub>2</sub>), 800 (CH, Ph) et 710 cm<sup>-1</sup> (C–S); r.m.n. (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  1,76 et 1,78 (2 s, 2 × 3 p, 2 NHAc), 1,90, 1,97, 2,00, 2,06 et 2,08 (5 s, 5 × 3 p, 5 OAc), 7,97 (1 d, 2 p, *J* 9 Hz, Ph), 8,28 (1 d, 2 p, *J* 9 Hz, Ph).

*Anal.* Calc. pour C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>17</sub>S : C, 50,45; H, 5,48; N, 5,35; S, 4,08. Trouvé : C, 50,22; H, 5,58; N, 5,37; S, 4,15.

*p*-Nitrobenzyl-O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1 → 4)-O-(2-acétamido-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1 → 4)-2-acétamido-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy-1-thio-β-D-glucopyranoside (*p*-nitrobenzyl-per-O-acétyl-1-thio-β-chitotrioside) (9). — Dans les conditions décrites ci-dessus, on obtient le composé 9 (0,3 g, 60 %) par condensation du composé 7 (0,5 g) avec le bromure de

*p*-nitrobenzyle. Le composé **9** est recristallisé dans le méthanol (150 ml); il est homogène en c.c.m. dans le système de solvants chloroforme-méthanol (9:1, v/v) :  $R_F$  0,51; p.f. 313°,  $[\alpha]_{589}^{25} -41,1^\circ$ ,  $[\alpha]_{546}^{25} -50,0^\circ$  (c 0,9, *N,N*-diméthylformamide;  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3330 (NH), 3070 (CH, Ph), 2940 et 2870 (CH), 1745 (OAc), 1660 (Amide I), 1605 et 1595 (C=C, Ph), 1530 (Amide I et NO<sub>2</sub>), 1349 (NO<sub>2</sub>), 1230 (C-O), 905 ( $\beta$ -glycoside)<sup>18,29</sup>, 860 (C-NO<sub>2</sub>), 800 (CH, Ph) et 710 cm<sup>-1</sup> (C-S); r.m.n. (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  1,79 (1 s, 3  $\times$  3 p, 3 NHAc), 1,94 (1 s, 2  $\times$  3 p, 2 OAc), 2,00 (1 s, 2  $\times$  3 p, 2 OAc), 2,04, 2,10 et 2,11 (3 s, 3  $\times$  3 p, 3 OAc), 7,56 (1 d, 2 p, *J* 9 Hz, Ph), 7,91 (massif, 3 p, 3 NH), 8,18 (1 d, 2 p, *J* 9 Hz, Ph).

*Anal.* Calc. pour C<sub>45</sub>H<sub>60</sub>N<sub>4</sub>O<sub>24</sub>S : C, 50,37; H, 5,60; N, 5,22; O, 35,82; S, 2,99. Trouvé : C, 49,93; H, 5,57; N, 5,29; O, 35,64; S, 3,08.

*p*-Nitrobenzyl-2-acétamido-4-O-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-2-désoxy-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*-nitrobenzyl 1-thio- $\beta$ -chitobioside) (**10**). — À une suspension du composé **8** (0,95 g) dans le méthanol anhydre (49 ml) on ajoute du méthanolate de sodium 0,5M (1 ml). La réaction, maintenue 4 h sous agitation à 4°, est arrêtée par addition d'une trace d'acide acétique glacial. Le résidu obtenu par évaporation à sec du mélange réactionnel, est recristallisé dans l'éthanol aqueux pour donner le composé **10** (0,45 g, 65%), p.f. 290° (décomp.),  $[\alpha]_{589}^{26} -86,3^\circ$ ,  $[\alpha]_{546}^{26} -105,3^\circ$  (c 0,5, *N,N'*-diméthylformamide);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3400 (OH), 3300 (NH), 3070 (CH, Ph), 2930 et 2860 (CH), 1650 (Amide I), 1600 (C=C, Ph), 1560 (Amide II), 1520 (NO<sub>2</sub>), 1350 (NO<sub>2</sub>), 890 ( $\beta$ -glycoside)<sup>18,29</sup>, 860 (C-NO<sub>2</sub>), 800 (CH, Ph) et 710 cm<sup>-1</sup> (C-S); r.m.n. (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  1,74 et 1,82 (2 s, 2  $\times$  3 p, 2 NHAc), 7,51 (1 d, 2 p, *J* 9 Hz, Ph), 7,78 (massif, 2 p, 2 NH), 7,89 (1 d, 2 p, *J* 9 Hz, Ph).

*Anal.* Calc. pour C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>S : C, 47,83; H, 5,72; N, 7,28; S, 5,55. Trouvé : C, 47,65; H, 5,60; N, 7,16; S, 5,43.

*p*-Nitrobenzyl-O-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-2-désoxy-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*-nitrobenzyl-1-thio- $\beta$ -chitotrioside) (**11**). — Dans les conditions décrites ci-dessus, la désacétylation du composé **9** (0,12 g) par le méthanolate de sodium libère le composé **11** (0,083 g, 96%); p.f. 280° (décomp.),  $[\alpha]_{589}^{25} -61,4^\circ$ ,  $[\alpha]_{546}^{25} -76,8^\circ$  (c 0,5, diméthyl sulfoxyde);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3400 (OH), 3300 (NH), 3080 (CH, Ph), 2930 et 2870 (CH), 1660 (Amide I) 1600 (C=C, Ph), 1550 (Amide II), 1520 (NO<sub>2</sub>), 1350 (NO<sub>2</sub>), 890 ( $\beta$ -glycoside)<sup>18,29</sup>, 860 (C-NO<sub>2</sub>), 800 (CH, Ph) et 710 cm<sup>-1</sup> (C-S); r.m.n. (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  1,76 (1 s, 3 p, 1 NHAc), 1,82 (1 s, 2  $\times$  3 p, 2 NHAc), 7,56 (1 d, 2 p, *J* 9 Hz, Ph), 7,78 (massif, 3  $\times$  1 p, 3 NH), 8,16 (1 d, 2 p, *J* 9 Hz, Ph).

*Anal.* Calc. pour C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>17</sub>S $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O : C, 45,70; H, 6,14; N, 6,87; S, 3,93. Trouvé : C, 45,68; H, 6,16; N, 6,93; S, 3,98.

*p*-Nitrophényl-O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2-acétamido-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*-nitrophényl-per-O-acétyl- $\beta$ -chitotrioside)<sup>19</sup> (**12**). — Un mélange de **5** (0,5 g) et de *p*-nitrophénolate de potassium (0,5 g) dissous dans la *N,N'*-diméthylformamide (5 ml) est maintenu sous agitation à l'abri de la lumière pendant 16 h à température ambiante; ce mélange est ensuite

précipité dans l'eau glacée (60 ml). Le gel formé est filtré, lavé abondamment à l'eau, puis repris par du méthanol chaud (60 ml). Cette solution méthanolique, filtrée à chaud, abandonne par refroidissement des micro-aiguilles blanches (0,2 g, 36 %), le produit est homogène en c.c.m. dans le système de solvants chloroforme-méthanol (9:1, v/v) :  $R_F$  0,49; p.f. 278–279°,  $[\alpha]_{589}^{25} -12,7^\circ$ ,  $[\alpha]_{546}^{25} -15,3^\circ$  ( $c$  1, *N,N*-diméthylformamide); litt.<sup>16</sup> : p.f. 274–276° (décomp.),  $[\alpha]_{589}^{26} -36,1^\circ$  ( $c$  0,36, pyridine);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3310 (NH), 3070 (CH, Ph), 2950 (CH), 1750 (OAc), 1665 (Amide I), 1595 (C=C, Ph), 1530 (Amide II et NO<sub>2</sub>), 1350 (NO<sub>2</sub>), 1230 (C–O), 900 ( $\beta$ -glycoside)<sup>18,29</sup>, 865 (C–NO<sub>2</sub>), 855 et 755 cm<sup>-1</sup> (CH, Ph); r.m.n. (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  1,78 (1 s, 3  $\times$  3 p, 3 NHAc), 1,96 (1 s, 2  $\times$  3 p, 2 OAc), 2,02 (1 s, 2  $\times$  3 p, 2 OAc), 2,03 (1 s, 3 p, 1 OAc), 2,11 (1 s, 2  $\times$  3 p, 2 OAc), 7,18 (1 d, 2 p,  $J$  9 Hz, Ph), 7,99 (massif, 3  $\times$  1 p, 3 NH), 8,22 (1 d, 2 p,  $J$  9 Hz, Ph).

*Anal.* Calc. pour C<sub>44</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>O<sub>25</sub> : C, 50,67; H, 5,57; N, 5,37. Trouvé : C, 50,86; H, 5,72; N, 5,34.

*p*-Nitrophényl-O-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*-nitrophényl- $\beta$ -chitotrioside)<sup>19,35</sup> (13). — À une suspension du composé 12 (0,5 g) dans le méthanol anhydre (196 ml), on ajoute une solution de méthanolate de sodium 0,5M (4 ml). La réaction est maintenue pendant 4 h sous agitation douce à 4°. La solution devient limpide au bout de 30 min, et une précipitation s'amorce après 1 h. On arrête la réaction par addition d'une goutte d'acide acétique glacial. Le mélange neutralisé est laissé au repos pendant une nuit à 4°. Le précipité blanc est filtré, lavé au méthanol froid, puis séché sous pression réduite (0,353 g, 98 %); p.f. 239–240°,  $[\alpha]_{589}^{25} -28,3^\circ$ ,  $[\alpha]_{546}^{25} -34,0^\circ$  ( $c$  0,5, eau); litt.<sup>16</sup> : p.f. 232–236° (décomp.), après recristallisation p.f. 238–240° (décomp.),  $[\alpha]_{589}^{26} -24,0^\circ$  ( $c$  0,25, eau); litt.<sup>35</sup> : p.f. 238–241° (décomp.),  $[\alpha]_{589}^{25} -24,0^\circ$  ( $c$  0,40, eau);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3280 (OH, NH), 3080 (CH, Ph), 2920 et 2860 (CH), 1660 (Amide I), 1610 et 1590 (C=C, Ph), 1550 (Amide II), 1520 (NO<sub>2</sub>), 1250 (C–O), 900 ( $\beta$ -glycoside)<sup>18,29</sup>, 865 (C–NO<sub>2</sub>), 850 et 750 cm<sup>-1</sup> (CH, Ph); r.m.n. (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  1,81 (1 s, 3  $\times$  3 p, 3 NHAc), 7,11 (1 d, 2 p,  $J$  9 Hz, Ph), 7,78 (massif, 3  $\times$  1 p, 3 NH), 8,12 (1 d, 2 p,  $J$  9 Hz, Ph).

*Anal.* Calc. pour C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>18</sub>·3H<sub>2</sub>O : C, 44,89; H, 6,23; N, 6,98. Trouvé : C, 44,69; H, 6,22; N, 6,90.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions M<sup>me</sup> Annie Heitz et M<sup>lle</sup> Marie Solanet pour leur aide technique.

#### RÉFÉRENCES

- 1 F. W. DAHLQUIST, L. JAO ET M. A. RAFTERY, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 56 (1966) 26–30.
- 2 J. A. RUPLEY, L. BUTLER, M. GERRING, F. J. HARTDEGEN ET R. PECORARO, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 57 (1967) 1088–1095.
- 3 D. M. CHIPMAN, V. GRISARO ET N. SHARON, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 4388–4394.
- 4 S. S. LEHRER ET G. D. FASMAN, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 4644–4651.

- 5 R. S. MULVEY, R. J. GAULTIERI ET S. BEYCHOK, *Biochemistry*, 12 (1973) 2683-2690.
- 6 V. TEICHBERG ET M. SHINITZKY, *J. Mol. Biol.*, 74 (1973) 519-531.
- 7 E. W. THOMAS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29 (1967) 628-634.
- 8 F. W. DAHLQUIST ET M. A. RAFTERY, *Biochemistry*, 8 (1969) 713-725.
- 9 M. A. RAFTERY, F. W. DAHLQUIST, S. P. PARSONS ET R. G. WOLCOTT, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 62 (1969) 44-51.
- 10 B. D. SYKES ET C. PARRAVANO, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 3900-3904.
- 11 J. MOULT, Y. ESHDAT ET N. SHARON, *J. Mol. Biol.*, 75 (1973) 1-4.
- 12 R. OTSON, C. REYES-ZAMORA, J. Y. TANG ET C. S. TSAI, *Can. J. Biochem.*, 51 (1973) 1-6.
- 13 M. M. BURGER ET A. R. GOLDBERG, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 57 (1967) 359-366.
- 14 A. K. ALLEN, A. NEUBERGER ET N. SHARON, *Biochem. J.*, 131 (1973) 155-162.
- 15 J. P. PRIVAT, F. DELMOTTE, G. MIALONIER, P. BOUCHARD ET M. MONSIGNY, *Eur. J. Biochem.*, sous presse.
- 16 M. E. RAFESTIN, A. OBRENOVITCH, A. OBLIN ET M. MONSIGNY, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.*, 40 (1974) 62-66.
- 17 K. L. MATTA, E. A. JOHNSON, R. N. GIOTRA ET J. J. BARLOW, *Carbohydr. Res.*, 30 (1973) 414-417.
- 18 T. OSAWA, *Carbohydr. Res.*, 1 (1966) 435-443.
- 19 T. OSAWA ET Y. NAKAZAWA, *Biochim. Biophys. Acta*, 130 (1966) 56-63.
- 20 G. LOWE, *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 167 (1967) 431-434.
- 21 G. LOWE, G. SHEPPARD, M. L. SINNOTT ET A. WILLIAMS, *Biochem. J.*, 104 (1967) 893-899.
- 22 G. LOWE ET G. SHEPPARD, *Chem. Commun.*, 9 (1968) 529-530.
- 23 U. ZEHAVID ET R. W. JEANLOZ, *Carbohydr. Res.*, 6 (1968) 129-137.
- 24 T. RAND-MEIR, F. W. DAHLQUIST ET M. A. RAFTERY, *Biochemistry*, 10 (1969) 4206-4214.
- 25 E. W. THOMAS, J. F. MCKELVY ET N. SHARON, *Nature*, 222 (1969) 485-486.
- 26 C. S. TSAI, J. Y. TANG ET S. C. SUBBARAO, *Biochem. J.*, 114 (1969) 529-534.
- 27 C. S. TSAI ET K. MATSUMOTO, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39 (1970) 864-869.
- 28 C. S. TSAI, C. REYES-ZAMORA ET R. OTSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 250 (1971) 172-181.
- 29 S. A. BARKER, A. B. FOSTER, M. STACEY ET J. M. WEBBER, *J. Chem. Soc.*, (1958) 2218-2227.
- 30 M. SPINOLA ET R. W. JEANLOZ, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 4158-4162.
- 31 Y. INOUE, K. ONODERA, S. KITAOKA ET M. OCHIAI, *J. Amer. Chem. Soc.*, 79 (1957) 4218-4222.
- 32 D. H. LEABACK ET P. G. WALKER, *J. Chem. Soc.*, (1957) 4754-4760.
- 33 D. HORTON ET M. L. WOLFROM, *J. Org. Chem.*, 27 (1962) 1794-1800.
- 34 S. E. ZURABYAN, T. P. VOLOSUK ET A. YA. KHORLIN, *Izv. Akad. Nauk SSSR., Ser. Khim.*, (1968) 1612-1614.
- 35 A. YA. KHORLIN, E. A. SHASHKOVA ET S. E. ZURABYAN, *Carbohydr. Res.*, 21 (1972) 269-273.