

SYNTHÈSE DU 2-ACÉTAMIDO-2-DÉSOXY-6-*O*-(α -D-GLUCOPYRANOSYL)- α -D-GALACTOPYRANOSE ET DE SON *p*-AMINOPHÉNYL- α -GLYCOSIDE*†

MAURICE PETITOU ET PIERRE SINAY‡

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

(Reçu le 15 octobre 1974; accepté le 29 novembre 1974)

ABSTRACT

Benzyl 2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-deoxy- α -D-galactopyranoside was condensed with 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-nitrobenzoyl- α -D-glucopyranosyl bromide or with 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-methoxybenzoyl- α -D-glucopyranosyl bromide in benzene at 50° in the presence of pyridine, to give benzyl 2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-deoxy-6-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-nitro(or methoxy)benzoyl]- α -D galactopyranoside in excellent yield. The title disaccharide was obtained in crystalline form after deacylation and catalytic hydrogenation. It proved identical with a disaccharide isolated from *Salmonella johannesburg* 5.58 (40) converted by phage φ 1 (40). In order to bind this disaccharide covalently onto various proteins, *p*-aminophenyl 2-acetamido-2-deoxy-6-*O*-(α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranoside has been obtained in an analogous way, starting from *p*-nitrophenyl 2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-deoxy- α -D-galactopyranoside.

SOMMAIRE

La réaction du benzyl-2-acétamido-3,4-di-*O*-acétyl-2-désoxy- α -D-galactopyranoside avec le bromure de 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-nitrobenzoyl- α -D-glucopyranosyle ou le bromure de 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-méthoxybenzoyl- α -D-glucopyranosyle donne, dans le benzène à 50° en présence de pyridine, le benzyl-2-acétamido-3,4-di-*O*-acétyl-2-désoxy-6-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-nitro(ou méthoxy)-benzoyl]- α -D-galactopyranoside avec un excellent rendement. Après désacylation et hydrogénéation catalytique, le disaccharide du titre est obtenu à l'état cristallin. Il est identique à un disaccharide isolé de *Salmonella johannesburg* 5.58 (40) après conversion par le phage φ 1 (40). Afin de pouvoir greffer par liaison covalente ce di-

*Dédicé au Professeur Michael Heidelberger à l'occasion de son 87^{ème} anniversaire.

†Ce travail a bénéficié d'une subvention 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.

saccharide sur diverses protéines, le *p*-aminophénol-2-acétamido-2-désoxy-6-*O*-(α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranoside a été synthétisé d'une façon analogue, en partant du *p*-nitrophénol-2-acétamido-3,4-di-*O*-acétyl-2-désoxy- α -D-galactopyranoside.

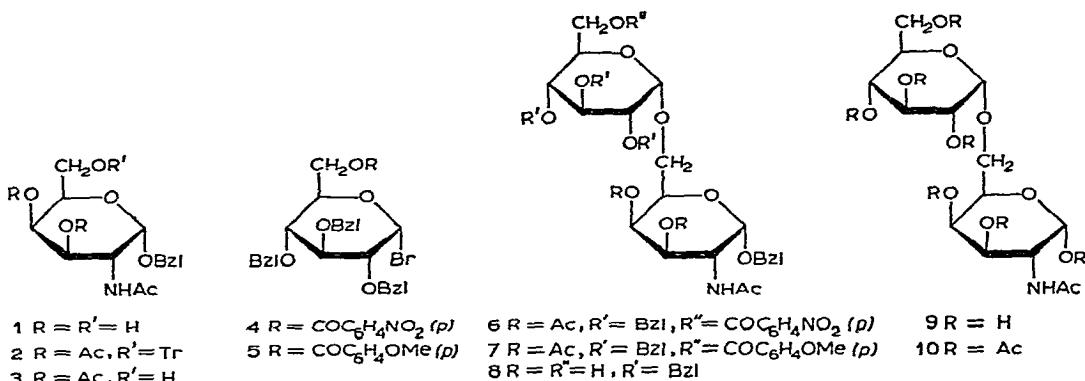
INTRODUCTION

Les déterminants antigéniques des Salmonelles sont des oligosaccharides (antigènes O) situés au niveau de la paroi bactérienne². Il a été démontré récemment³ qu'après infection par le phage φ 1 (40) de la souche 5.58 de *Salmonella johannesburg*, une nouvelle spécificité apparaissait. Elle semble résulter uniquement de l'addition d'un résidu α -D-glucopyranosyle à l'extrémité d'une chaîne latérale et sur un résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose. Le disaccharide 2-acétamido-2-désoxy-6-*O*-(α -D-glucopyranosyl)-D-galactopyranose a pu être isolé et sa structure établie³. Afin de la confirmer, une synthèse chimique non ambiguë de ce disaccharide a été entreprise. Il est à remarquer que sa structure est voisine de celle du disaccharide 6-*O*-(α -D-glucopyranosyl)-D-galactopyranose, qui porte la spécificité des facteurs 1 présents sur d'autres Salmonelles².

La technique choisie a ensuite été appliquée à la préparation du *p*-aminophénol-2-acétamido-2-désoxy-6-*O*-(α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranoside. Ce composé, fixé sur diverses protéines, forme des glycoprotéines artificielles permettant d'envisager, par injection chez l'animal, la production d'anticorps spécifiques.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La synthèse stéréosélective d'un glycoside à liaison 1,2-*cis* nécessite l'emploi d'un halogénure protégé en C-2 par un groupement non participant⁴. À cet effet, Ishikawa et Fletcher ont souligné⁵ l'intérêt potentiel d'une série de bromures de 2-*O*-benzyl-D-glycopyranosyle, diversement benzylés et *p*-nitrobenzoylés. C'est ainsi que le bromure de 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-nitrobenzoyl- α -D-glycopyranosyle (**4**) a été utilisé par Fréchet et Schuerch⁶ pour la synthèse en phase solide d'oligosaccharides à liaison α -(1 \rightarrow 6). C'est ce même composé **4** que nous avons employé pour la synthèse du 2-acétamido-2-désoxy-6-*O*-(α -D-glycopyranosyl)- α -D-galactopyranose (**9**). Il a été préparé directement à partir du 2,3,4-tri-*O*-benzyl-1,6-di-*O*-*p*-nitrobenzoyl- β -D-glycopyranose⁵, sans isoler le bromure de configuration β , trop instable. Le choix du dérivé à glycosyler s'est porté sur le benzyl-2-acétamido-3,4-di-*O*-acétyl-2-désoxy- α -D-galactopyranoside (**3**), préparé de façon classique à partir du benzyl-2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranoside⁷ (**1**) par tritylation, acétylation puis détritylation. Parmi les nombreuses conditions essayées, c'est la condensation de l'alcool **3** avec 2,5 équivalents du bromure **4**, dans le benzène anhydre à 50° en présence de pyridine comme accepteur d'acide, qui a conduit aux meilleurs résultats. La réaction est lente (une dizaine de jours) mais très propre et presque quantitative (88,5% après purification). Après désacylation du produit de condensation **6**, le benzyl-2-acétamido-



2-désoxy-6-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranoside (8) est obtenu à l'état cristallin avec un excellent rendement. Fréchet et Schuerch⁸ ayant montré que le bromure de 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-méthoxybenzoyl- α -D-glucopyranosyle (5) pouvait conduire exclusivement à un glycoside β par méthanolysé, il nous a semblé intéressant de condenser ce bromure 5 avec l'alcool 3, dans les mêmes conditions que celles décrites plus haut. Le disaccharide protégé 7 à liaison α est isolé avec un rendement de 87 % après purification; par désacylation, le composé cristallin 8 est obtenu. Il semble donc, ainsi que l'ont d'ailleurs constaté récemment Fréchet et Schuerch⁶, que ce contrôle stérique par un substituant en C-6, observé seulement en présence d'un large excès de méthanol, ne soit pas applicable de façon générale à la synthèse d'oligosaccharides. Après hydrogénéation catalytique du disaccharide 8, le composé du titre est obtenu à l'état cristallin. Le sens de la mutarotation suggère une configuration α au niveau du centre réducteur, ce qui est confirmé par r.m.n.

Une hydrolyse à l'acide chlorhydrique du disaccharide 9 montre la présence de D-glucose et de chlorhydrate de 2-amino-2-désoxy-D-galactose. Ceci est également confirmé par méthanolysé et examen par chromatographie en phase gazeuse. Le disaccharide 8 consomme un équivalent de periodate de sodium en 3 h environ, ce qui confirme la nature (1 \rightarrow 6) de la liaison glycosidique. D'ailleurs, l'alcool 3 ne subit aucune transformation après traitement de dix jours à 50° dans un mélange benzène-pyridine. La configuration α de la liaison glycosidique, probable d'après le procédé de synthèse, est confirmée de plusieurs façons. D'abord le spectre de r.m.n. du disaccharide réducteur 9 présente, vers les champs faibles (δ 4,85), un doublet ($J_{1,2}$ 3,7 Hz) attribué au proton interglycosidique; de plus le disaccharide 9 est sélectivement hydrolysé en D-glucose et 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose par une α -D-glucosidase*. Enfin, les pouvoirs rotatoires moléculaires des dérivés 9 et 10 sont en bon accord avec les valeurs calculées pour les dérivés possédant la configuration α , d'après les règles d'isorotation de Hudson (Tableau I). Ce calcul n'est pas significatif dans

*Cette manipulation a été effectuée par le Dr. Girard à l'Institut Pasteur de Paris (France).

le cas du dérivé **8**, les pouvoirs rotatoires moléculaires des méthyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α - et - β -D-glucopyranosides étant très voisins.

TABLEAU I

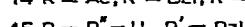
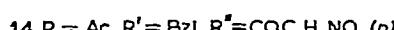
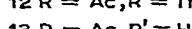
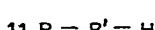
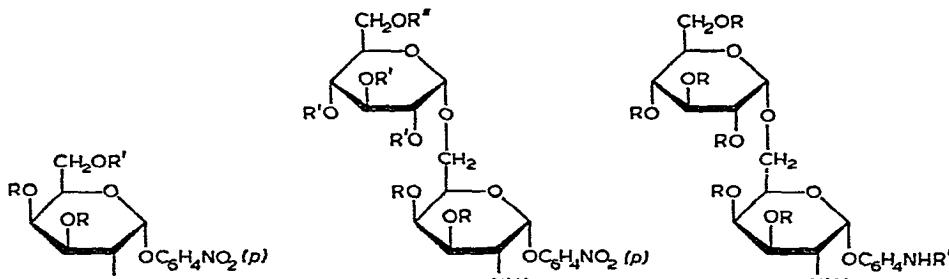
POUVOIRS ROTATOIRES MOLAIRES DES COMPOSÉS **9**, **10** ET **16**, COMPARÉS À LA SOMME DES POUVOIRS ROTATOIRES MOLAIRES DE LEURS CONSTITUANTS

Composé	[M] _D (degrés) $\times 10^{-2}$
Méthyl- α -D-glucopyranoside ^a (Réf. 10) + 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose ^b (Réf. 11)	+ 497
Méthyl- β -D-glucopyranoside ^a (Réf. 10) + 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose	+ 124
Composé ^b 9	+ 553
Méthyl-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -acétyl- α -D-glucopyranoside ^c (Réf. 10) + 2-acétamido-1,3,4,6-tétra- <i>O</i> -acétyl-2-désoxy- α -D-galactopyranose ^c (Réf. 12)	+ 868
Méthyl-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -acétyl- β -D-glucopyranoside ^c (Réf. 10) + 2-acétamido-1,3,4,6-tétra- <i>O</i> -acétyl-2-désoxy- α -D-galactopyranose	+ 314
Composé ^c 10	+ 912
Méthyl- α -D-glucopyranoside + <i>p</i> -aminophényl-2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranoside ^d (Réf. 9)	+ 1162
Méthyl- β -D-glucopyranoside + <i>p</i> -aminophényl-2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranoside	+ 789
Composé ^c 16	+ 1057

^aPouvoir rotatoire mesuré dans l'eau; ^bdans l'eau à l'équilibre; ^cdans le chloroforme; ^ddans un mélange eau-méthanol (4:1, v/v); ^edans le méthanol.

Le disaccharide **9** est, après réduction au borohydrure de sodium, parfaitement homogène en chromatographie en phase gazeuse. Il est enfin transformé, par per-acétylation, en dérivé cristallin **10**, dont la configuration à l'extrémité réductrice est α (r.m.n.).

Le disaccharide isolé de *Salmonella johannesburg* 5.58 (40) après conversion par le phage φ 1 (40) présente la même migration lors de chromatographies sur papier



dans deux systèmes de solvants. De plus, l'inhibition de la précipitation des anticorps anti-1_b par le polysaccharide de *Salmonella senftenberg* (1,3,19) est exactement la même en employant soit le disaccharide synthétique, soit le disaccharide naturel*.

Afin de pouvoir fixer de façon covalente le disaccharide 9 sur diverses protéines et former ainsi un antigène artificiel, le *p*-nitrophénol- α -glycoside 15 a été synthétisé. Le *p*-nitrophénol-2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranoside⁹ (11) est transformé en *p*-nitrophénol-2-acétamido-3,4-di-*O*-acétyl-2-désoxy- α -D-galactopyranoside (13) par tritylation, acétylation puis détritylation. Le glycoside 13, non cristallin, donne le *p*-nitrophénol-2-acétamido-3,4-di-*O*-acétyl-2-désoxy-6-*O*-triphénylméthyl- α -D-galactopyranoside par tritylation, ce qui indique qu'une migration d'un résidu acétyle n'a pas eu lieu lors de la détritylation. Par condensation avec le bromure 4, dans des conditions identiques à celles décrites plus haut, 13 conduit, au bout de six jours de réaction, au disaccharide protégé 14 avec un rendement de 72 %. Après désacylation, le disaccharide 15 est obtenu à l'état cristallin. Une hydrogénéation catalytique dans le méthanol en présence d'acide chlorhydrique et de palladium sur charbon à 10% donne le chlorhydrate de l'amine aromatique 16, qui n'est pas stable et doit de préférence être diazotée immédiatement en vue d'une copulation avec les résidus acides aminés appropriés d'une protéine. C'est donc le précurseur 15, parfaitement stable et cristallin, qui est conservé et hydrogéné au dernier moment en vue d'une expérience de fixation. Le chlorhydrate 16 est caractérisé par son peracétate 17, composé cristallin obtenu avec un rendement de 83 %. Les pouvoirs rotatoires moléculaires des dérivés 16 et 17 sont en bon accord avec les valeurs calculées d'après les règles d'isorotation de Hudson pour un disaccharide à liaison interglycosidique de configuration α (Tableau I).

PARTIE EXPÉIMENTALE

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 optiques 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 à l'aide du spectromètre Perkin-Elmer R-32 (90 MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués par rapport au pic du tétraméthylsilane (s = singulett, d = doublet). Les chromatographies en phase gazeuse sont effectuées au moyen d'un chromatographe Girdel (Modèle 3000) muni d'un détecteur à ionisation de flamme, en utilisant une colonne en verre Pyrex de 3,40 m contenant 4% de OV-17 sur Gas-Chrom Q (80-100 mesh), avec un programme de 10° par min de 200° à 300°. Les chromatographies descendantes sur papier sont effectuées à l'aide de papier Whatman No. 1. 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

*Cette manipulation a été effectuée par le Dr. Girard à l'Institut Pasteur de Paris (France).

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 le Service Central de Micro-analyse du Centre National de la Recherche Scientifique (Thiais).

Benzyl-2-acétamido-3,4-di-O-acétyl-2-désoxy-6-O-triphényleméthyl- α -D-galactopyranoside (2). — Le benzyl-2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranoside⁷ (1, 2,1 g) est dissous dans de la pyridine anhydre (15 ml). Du chlorure de triphényleméthyle (1,9 g) est ajouté, une seconde addition (0,5 g) étant effectuée au bout de 38 h et une troisième (0,5 g) au bout de 75 h, le milieu étant maintenu à température ambiante. Quatre jours après la première addition, de l'anhydride acétique (5 ml) est ajouté. Après avoir laissé l'acétylation s'effectuer pendant 48 h à température ambiante, l'ensemble est versé dans un mélange eau–glace (500 ml). Le précipité obtenu est essoré puis dissous dans du chloroforme (100 ml). La phase chloroformique obtenue est lavée avec une solution aqueuse à 5% (p/v) d'hydrogénosulfate de potassium, avec de l'eau, séchée et évaporée. Le résidu est chromatographié sur une colonne de gel de silice (70 g) (chloroforme–méthanol, 40:1, v/v), et donne le produit 2 qui est cristallisé dans un mélange éthanol–éther–hexane (3,7 g, 84%), p.f. 175°, $[\alpha]_D^{20} + 54,5^\circ$ (*c* 1,59, chloroforme); spectre i.r.: $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3250 (NH), 1740 (OAc), 1640 (Amide I), 1560 (Amide II), 750 et 700 cm^{-1} (Ph).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{NO}_8$: C, 71,57; H, 6,16; N, 2,20. Trouvé : C, 71,38; H, 6,17; N, 2,10.

Benzyl-2-acétamido-3,4-di-O-acétyl-2-désoxy- α -D-galactopyranoside (3). — Le composé 2 (3,9 g) est dissous dans de l'acide acétique glacial (20 ml); après refroidissement à 15°, une solution à 40% de gaz bromhydrique dans de l'acide acétique glacial (1,7 ml) est ajoutée. Après une vigoureuse agitation pendant 1,5 min, le mélange est filtré sur verre fritté, le filtrat étant directement recueilli dans une essoreuse contenant de l'eau glacée (70 ml). La phase aqueuse obtenue est extraite au chloroforme; les extraits chloroformiques sont lavés avec de l'eau, séchés et évaporés. Une cristallisation du résidu dans un mélange acétone–éther donne 3 (2,1 g, 87,5%), p.f. 112°, $[\alpha]_D^{20} + 153^\circ$ (*c* 0,93, chloroforme); spectre i.r.: $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3200 (OH, NH), 1750 (OAc), 1630 (Amide I), 1570 (Amide II), 750 et 700 cm^{-1} (Ph).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_8$: C, 57,71; H, 6,37; N, 3,54. Trouvé : C, 57,45; H, 6,37; N, 3,81.

Benzyl-2-acétamido-3,4-di-O-acétyl-2-désoxy-6-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-p-nitrobenzoyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranoside (6). — Le 2,3,4-tri-O-benzyl-1,6-di-O-p-nitrobenzoyl- β -D-glucopyranose⁵ (2 g) est dissous dans une solution saturée de gaz bromhydrique dans le dichlorométhane (60 ml). Au bout de 10 min, l'acide *p*-nitrobenzoïque formé est essoré; le filtrat est, après addition de dichlorométhane (60 ml), lavé avec une solution aqueuse à 5% (p/v) d'hydrogénocarbonate de sodium, avec de l'eau, séché (sulfate de magnésium) et évaporé. Le résidu est le bromure de 2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-p-nitrobenzoyl- α -D-glucopyranosyle (4) (1,65 g, 93%), $[\alpha]_D^{20} + 138^\circ$ (*c* 4, dichlorométhane); litt.⁵ : $[\alpha]_D^{20} + 126,5^\circ$ (*c* 2,63, dichlorométhane, après anomérisation du bromure de configuration β). Il est immédiatement

dissous dans du benzène anhydre (50 ml) contenant de la pyridine (0,15 ml). Après addition de **3**, le mélange est maintenu pendant 11 jours à 50°, puis, après retour à la température ambiante, il est dilué avec du benzène (50 ml), lavé au moyen d'une solution aqueuse à 5% (p/v) d'hydrogénocarbonate de sodium, puis avec de l'eau; la phase organique est séchée et évaporée. Le résidu, chromatographié sur une colonne de gel de silice (25 g) (éther-benzène, 2,5:1, v/v), donne le disaccharide **6** non cristallin à l'état pur (865 mg, 88,5%), $[\alpha]_D^{20} + 103^\circ$ (*c* 0,8, chloroforme); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3280 (NH), 1730 (OAc, *O*-*p*-nitrobenzoyle), 1665 (Amide I), 1525 (Amide II), 740 et 700 cm^{-1} (Ph).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{53}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{16}$: C, 65,16; H, 5,78; N, 2,87. Trouvé : C, 65,09; H, 5,79; N, 2,76.

Benzyl-2-acétamido-3,4-di-O-acétyl-2-désoxy-6-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-p-méthoxybenzoyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranoside (**7**). — Le 2,3,4-tri-*O*-benzyl-1,6-di-*O*-*p*-méthoxybenzoyl- β -D-glucopyranose⁸ (1 g), traité exactement de la même manière que l'analogue *p*-nitrobenzoylé, donne le bromure de 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-méthoxybenzoyl- α -D-glucopyranosyle (**5**), (0,78 g, 87%), $[\alpha]_D^{20} + 130^\circ$ (*c* 7,8, dichlorométhane); litt.⁸ : $[\alpha]_D^{23} + 123^\circ$ (*c* 1-2, chloroforme). Le bromure **5** est aussitôt dissous dans du benzène anhydre (25 ml) contenant de la pyridine (75 μ l). Après addition de **3** (200 mg), le mélange est maintenu pendant dix jours à 50°, puis traité de la même façon que pour l'obtention du disaccharide **6**. Le résidu obtenu (0,8 g), chromatographié sur une colonne de gel de silice (10 g) (éther-benzène, 2,5:1, v/v), donne le disaccharide **7** à l'état pur (430 mg, 87%), $[\alpha]_D^{20} + 104^\circ$ (*c* 0,62, chloroforme); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3340 (NH), 1760, 1720 (*O*-*p*-nitrobenzoyle, OAc), 1680 (Amide I), 1520 (Amide II), 740 et 690 cm^{-1} (Ph).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{54}\text{H}_{59}\text{NO}_{15}$: C, 67,40; H, 6,18; N, 1,45. Trouvé : C, 67,29; H, 6,18; N, 1,70.

Benzyl-2-acétamido-2-désoxy-6-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranoside (**8**). — Le disaccharide **6** (450 mg) est dissous dans du méthanol (20 ml) et une solution méthanolique M de méthylate de sodium (0,5 ml) est ajoutée. Après 16 h à 4°, le produit qui a cristallisé est essoré (258 mg), le filtrat étant déminéralisé (résine Dowex 50, H^+) et évaporé. Une chromatographie du résidu sur une colonne de gel de silice (5 g) (chloroforme-méthanol 10:1, v/v) permet d'obtenir une quantité supplémentaire du dérivé **8**, qui est jointe au produit précédent après une cristallisation dans le méthanol (318 mg au total, 92,5%), p.f. 208-209°, $[\alpha]_D^{20} + 90,5^\circ$ (*c* 1,27, chloroforme); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3510, 3300 (OH), 3200 (NH), 1650 (Amide I), 1550 (Amide II), 730 et 695 cm^{-1} (Ph). Un produit identique est obtenu par *O*-désacylation du disaccharide **7**.

Anal. Calc. pour $\text{C}_{42}\text{H}_{49}\text{NO}_{11}$: C, 67,83; H, 6,64; N, 1,88. Trouvé : C, 67,90; H, 6,66; N, 1,83.

2-Acétamido-2-désoxy-6-O-(α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranose (**9**). — Le disaccharide **8** (550 mg) est dissous dans du méthanol (50 ml) et hydrogéné en présence de palladium sur charbon à 10% (100 mg). Au bout de quatre jours, le catalyseur est essoré et le méthanol est évaporé. Le résidu (265 mg, 93,5%), cristallisé

dans le méthanol, donne le disaccharide réducteur **9** (147 mg, 52 %), p.f. 185° (déc.), $[\alpha]_D^{20} + 145^\circ \rightarrow +138^\circ$ (1 h, c 0,63, eau-éthanol, 4:1, v/v); spectre i.r.: $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3300 (OH, NH), 1635 (Amide I), 1550 cm^{-1} (Amide II); spectre de r.m.n. (oxyde de deutérium): δ 1,95 (3 H, s, Ac), 4,85 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1 interglycosidique), 5,15 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1 du 2-amino-2-désoxy- α -D-galactose), les deux centres anomériques ont donc une configuration α . Le spectre de r.m.n. (oxyde de deutérium) du 2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranose donne: δ 5,15 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1). Ce composé est homogène* en chromatographie sur papier: solvant A (1-butanol-pyridine-eau, 9:5:4, v/v), R_{Glc} 0,48; solvant B (1-butanol-acide acétique-eau, 4:1:1, v/v), R_{Glc} 0,40. Produit naturel³: solvant A: R_{Glc} 0,48; solvant B: R_{Glc} 0,40. Après réduction au borohydrure de sodium et per(triméthylsilylation), le produit est homogène en chromatographie en phase gazeuse; t_R par rapport au saccharose per(triméthylsilylé) : 1,46.

2-Acétamido-1,3,4-tri-O-acétyl-2-désoxy-6-O-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-gluco-pyranosyl)- α -D-galactopyranose (10). — Le disaccharide réducteur **9** (30 mg) est acétylé à température ambiante par de l'anhydride acétique (0,7 ml) dans la pyridine (2 ml). Au bout de 36 h, le mélange réactionnel est évaporé; le résidu, cristallisé dans l'éthanol, donne le dérivé peracétylé **10** (30 mg, 57 %), p.f. 114-115°, $[\alpha]_D^{20} + 133^\circ$ (c 0,54, chloroforme); spectre i.r.: $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 1750 (OAc), 1640 (Amide I), 1545 cm^{-1} (Amide II); spectre de r.m.n.: (chloroforme-*d*): δ 1,98-2,20 (24 H, m, 8 Ac), 6,16 (1 H, d, $J_{1,2}$ 4 Hz, H-1 du 2-amino-2-désoxy- α -D-galactose).

Anal. Calc. pour $C_{28}H_{39}NO_{18} \cdot 0,5H_2O$: C, 48,99; H, 5,87; N, 2,04. Trouvé: C, 49,00; H, 5,87; N, 2,17.

p-Nitrophényl-2-acétamido-3,4-di-O-acétyl-2-désoxy-6-O-triphénylméthyl- α -D-galactopyranoside (12). — Le *p*-nitrophényl-2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranoside⁹ (**11**, 500 mg) est dissous dans de la pyridine anhydre (4 ml) et le chlorure de triphénylméthyle (0,45 g) est ajouté. Une seconde addition (0,22 g) est effectuée au bout de 24 h, le milieu réactionnel étant maintenu à température ambiante. Deux jours après cette seconde addition la température est portée à 60° pendant 18 h. Après retour à la température ambiante, de l'anhydride acétique (1 ml) est ajouté. Après avoir laissé l'acétylation s'effectuer pendant 12 h, l'ensemble est versé dans de l'eau glacée (250 ml). Le précipité formé est essoré, séché, puis chromatographié sur une colonne de gel de silice (40 g, éther-acétate d'éthyle, 23:1, v/v), donnant le composé **12** à l'état pur (960 mg, 98 %); une partie de ce produit est cristallisée dans le mélange méthanol-eau, p.f. 192-192,5°, $[\alpha]_D^{20} + 136^\circ$ (c 1,30, chloroforme); spectre i.r.: $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3350 (NH), 1760 (OAc), 1660 (Amide I), 1520 (Amide II), 1350 (NO₂), 750 et 700 cm^{-1} (Ph).

Anal. Calc. pour $C_{37}H_{36}N_2O_{10}$: C, 66,46; H, 5,43; N, 4,19. Trouvé: C, 66,49; H, 5,55; N, 3,89.

p-Nitrophényl-2-acétamido-3,4-di-O-acétyl-2-désoxy- α -D-galactopyranoside (13). — Le composé **12** (4,4 g) est dissous dans de l'acide acétique glacial (23 ml) et une

*Expérience effectuée par le Dr. Girard à l'Institut Pasteur.

solution saturée de gaz bromhydrique dans de l'acide acétique glacial (1,9 ml) est ajoutée. Après une vigoureuse agitation pendant 75 sec, le mélange est filtré sur verre fritté, le filtrat étant directement recueilli dans une essoreuse contenant de l'eau glacée (80 ml). La phase aqueuse obtenue est extraite au chloroforme; les extraits chloroformiques, lavés avec de l'eau, séchés et évaporés, donnent **13** à l'état brut (2,55 g, 91%). En vue de l'obtention de données analytiques, une partie de ce dérivé **13** (130 mg) est purifiée par chromatographie sur une colonne de gel de silice (10 g) (chloroforme-méthanol, 20:1, v/v); on obtient un verre qu'il n'a pas été possible de cristalliser, $[\alpha]_D^{20} + 229^\circ$ (*c* 1,15, chloroforme); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3400 (OH), 3350 (NH), 1760 (OAc), 1665 (Amide I), 1550 (Amide II), 1350 (NO₂), 750 cm⁻¹ (Ph).

Anal. Calc. pour C₁₈H₂₂N₂O₁₀ : C, 50,70; H, 5,20; N, 6,57. Trouvé : C, 49,96; H, 5,12; N, 6,34.

Ce composé redonne le dérivé triphénylméthylé cristallin **12** par réaction avec le chlorure de triphénylméthyle dans la pyridine.

p-Nitrophényl-2-acétamido-3,4-di-O-acétyl-2-désoxy-6-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-p-nitrobenzoyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranoside (14). — Le composé **13** (1,2 g) et de la pyridine (0,45 ml) sont ajoutés à une solution benzénique (125 ml) du bromure **4** (5,2 g), préparé selon la méthode décrite plus haut. Le mélange est maintenu pendant six jours à 50°, puis, après retour à la température ambiante, il est dilué avec du benzène (75 ml), lavé au moyen d'une solution aqueuse à 5% (p/v) d'hydrogénocarbonate de sodium, puis avec de l'eau; la phase organique est séchée et évaporée. Le résidu (6,6 g), chromatographié sur une colonne de gel de silice (60 g, éther-benzène, 5:2, v/v), donne le disaccharide **14** non cristallin à l'état pur (2,05 g, 72%), $[\alpha]_D^{20} + 96^\circ$ (*c* 1,48, chloroforme); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 1750, 1730 (O-p-nitrobenzoyle, OAc), 1670 (Amide I), 1520 (Amide II), 1340 (NO₂), 740 et 710 cm⁻¹ (Ph).

Anal. Calc. pour C₅₂H₅₃N₃O₁₈ : C, 61,98; H, 5,30; N, 4,17. Trouvé : C, 61,51; H, 5,30; N, 3,81.

p-Nitrophényl-2-acétamido-2-désoxy-6-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranoside (15). — Le disaccharide **14** (1,88 g) est dissous dans du méthanol (50 ml) et une solution méthanolique M de méthylate de sodium (1,6 ml) est ajoutée. Après 16 h à température ambiante, la solution est déminéralisée (résine Dowex 50, H⁺) puis évaporée; le résidu est cristallisé dans le méthanol. Les eaux-mères sont évaporées, le résidu étant chromatographié sur une colonne de gel de silice (10 g, chloroforme-méthanol, 10:1, v/v). On obtient ainsi la totalité du disaccharide **15** (1,12 g, 78%), p.f. 190-191°, $[\alpha]_D^{20} + 106^\circ$ (*c* 0,83, chloroforme); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3580, 3420, 3270 (OH, NH), 1650 (Amide I), 1555 (Amide II), 1360 (NO₂), 750 et 690 cm⁻¹ (Ph).

Anal. Calc. pour C₄₁H₄₆N₂O₁₃ : C, 63,57; H, 5,99; N, 3,63. Trouvé : C, 63,56; H, 5,98; N, 3,73.

p-Acétamidophényl-2-acétamido-3,4-di-O-acétyl-2-désoxy-6-O-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-galactopyranoside (17). — Le disaccharide **15** (100 mg) est dissous dans du méthanol (30 ml) auquel on ajoute une solution aqueuse 0,05M d'acide chlorhydrique (2,8 ml). Après hydrogénéation pendant 14 h en présence de

palladium sur charbon à 10% (30 mg), le catalyseur est essoré et le filtrat évaporé. Le résidu, chromatographié sur une colonne de gel de silice (7 g) (méthanol-chloroforme, 1:1, v/v), donne le chlorhydrate **16** (41 mg, 62%), qu'il n'a pas été possible de cristalliser, $[\alpha]_D^{20} + 200^\circ$ (*c* 0,96, méthanol); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3380 (OH), 1640 (Amide I), 1550 (Amide II) et 720 cm^{-1} (Ph). C'est ce dérivé, peu stable, qui est immédiatement diazoté et couplé à des protéines¹³.

Pour caractérisation, le chlorhydrate, **16** (63 mg) est acétylé à température ambiante au moyen d'anhydride acétique (0,4 ml) dans de la pyridine (3 ml). Au bout de 24 h, le milieu réactionnel est évaporé et une chromatographie du résidu sur une colonne de gel de silice (11 g) (chloroforme-méthanol, 13:1, v/v) donne le dérivé peracétylé **17** (68 mg, 83%), cristallisé dans un mélange 2-butanone-éther-éther de pétrole, p.f. 229-229,5°, $[\alpha]_D^{20} + 192^\circ$ (*c* 0,42, chloroforme); spectre i.r. : $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3400, 3320 (NH), 1760 (OAc), 1695, 1650 (Amide I), 1550 (Amide II), 720 cm^{-1} (Ph).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{18}$: C, 53,11; H, 5,77; N, 3,64. Trouvé : C, 52,94; H, 5,74; N, 3,43.

REMERCIEMENT

Les auteurs remercient Monsieur C. Merser pour l'enregistrement des spectres de r.m.n.

RÉFÉRENCES

- 1 M. PETITOU ET P. SINAÝ, *Actual. Chim.*, 2 (1973) 75.
- 2 O. LÜDERITZ, A.-M. STAUB ET O. WESTPHAL, *Bacteriol. Rev.*, 30 (1966) 192-255.
- 3 R. GIRARD ET A.-M. STAUB, *Carbohydr. Res.*, 24 (1972) 457-473.
- 4 Voir, par exemple, G. WULFF ET G. RÖHLE, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 13 (1974) 157-170.
- 5 T. ISHIKAWA ET H. G. FLETCHER, JR., *J. Org. Chem.*, 34 (1969) 563-571.
- 6 J.-M. FRÉCHET ET C. SCHUERCH, *Carbohydr. Res.*, 22 (1972) 399-412.
- 7 P. H. GROSS, F. DU BOIS ET R. W. JEANLOZ, *Carbohydr. Res.*, 4 (1967) 244-248.
- 8 J.-M. FRÉCHET ET C. SCHUERCH, *J. Amer. Chem. Soc.*, 94 (1972) 604-609.
- 9 M. PETITOU ET P. SINAÝ, *Carbohydr. Res.*, sous presse.
- 10 J. STANĚK, M. ČERNÝ, J. KOCOUREK ET J. PACÁK, *The Monosaccharides*, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1963, p. 276.
- 11 S. ROSEMAN ET J. LUDOWIEG, *J. Amer. Chem. Soc.*, 76 (1954) 301-302.
- 12 A. B. FOSTER ET M. STACEY, *Advan. Carbohydr. Chem.*, 7 (1952) 288.
- 13 M. PETITOU, Thèse de 3^e Cycle, Université d'Orléans, France, 1974, p. 70.