

Note

**Synthèse d'un nouveau type de glycoconjugué  
Le thio- $\beta$ -D-glucopyranoside de la L-cystéine\***

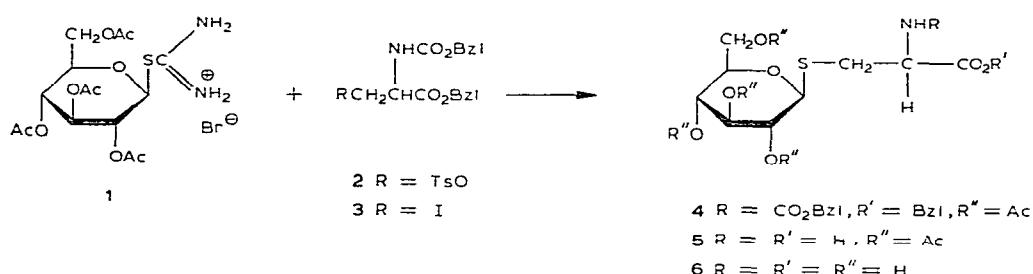
MICHEL L. P. MONSIGNY, DIDIER DELAY ET MARTIN VACLIK

Centre de Biophysique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique,  
et Laboratoire de Chimie Biologique, Université d'Orléans, 45045 Orléans (France)

(Reçu le 27 février 1977; accepté le 4 mars 1977)

La liaison glycanne-protide dans les glycoprotéines a fait l'objet de nombreux travaux<sup>2,3</sup>. En 1971, un nouveau type de liaison glycanne-protide dans les glycoconjugués était décrit par Weiss *et al.*<sup>4,5</sup>. Il s'agit d'une liaison *S*-glycosylique entre le groupement thiol de la cystéine et un résidu de D-galactose d'une part<sup>4</sup>, ou un résidu de D-glucose d'autre part<sup>5</sup>. Ce dernier type de liaison a été mis en évidence dans un glycopeptide de faible masse moléculaire isolé des membranes d'érythrocytes humains.

Dans le but de comparer le composé naturel et le modèle synthétique, nous avons synthétisé le thio- $\beta$ -D-glucopyranoside de la L-cystéine (6). La liaison *S*-glycosylique est obtenue par condensation du dérivé iodé de la L-sérine 3, obtenu à partir du *p*-toluènesulfonate 2, sur le bromure de 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranosylisothiouronium (1) préparé selon la méthode de Černý et Pačák<sup>6</sup>. Cette réaction est préférable à la réaction classique du bromure de glycosyle sur un groupement hydroxyle ou thiol, car dans les conditions décrites ci-dessous, 4 est obtenu avec un bon rendement (72%) et constitue le seul produit de conjugaison. Les composés 1, 2 et 3



\*Ce travail a bénéficié d'une aide de la Délégation Générale de la Recherche Scientifique et Technique (contrat 74.7.05.79) et de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (contrat 75.4.074.3). Une communication préliminaire ainsi qu'un poster ont été présentés<sup>1</sup>.

sont obtenus avec des rendements élevés (65%, 73% et 91% respectivement) et cristallisent facilement. Le groupement isothiouronium de **1** est en position équatoriale sur C-1 du résidu glycopyranosyle en conformation  $^4C_1$ . Le remplacement du groupement isothiouronium par un groupement alkyle se fait en conservant l'anomérie  $\beta$  de **1**, assurant une réaction de condensation très propre. La déprotection des groupements aminés et carboxyliques de **4** par réduction catalytique s'effectue en une seule étape et **5** est isolé par cristallisation. La *O*-désacétylation, obtenue par action du méthoxyde de sodium, est rapide et propre et conduit d'une manière quantitative à **6**. Aucun produit de dégradation n'a pu être mis en évidence, ce qui s'explique par le fait que le groupement carboxylique libre défavorise la  $\beta$ -élimination. Ainsi, le comportement en milieu alcalin de **6** est analogue à celui du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranoside de la sérine qui est stable en milieu alcalin lorsque le groupement carboxylique est libre, comme nous l'avions démontré<sup>7</sup>.

#### 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 i.r. ont été enregistrés, en utilisant des pastilles de bromure de potassium, sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 257. Les spectres de r.m.n. ont été réalisés, à température ambiante, sur le spectromètre Bruker à 90 MHz en utilisant des solutions dans l'acétone-*d*, le chloroforme-*d*, le diméthyl sulfoxyde-*d*<sub>6</sub> ou l'oxyde de deutérium. Les signaux du tétraméthylsilane ont été pris comme référence interne pour la mesure des déplacements chimiques ( $\delta$ ). L'enregistrement des spectres de r.m.n. a été réalisé par Mme. Heitz (Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans). Les spectres de r.m.n. de **1** et de **4** ont été réalisés sur un spectromètre Cameca (Paris) à 250 MHz par le Dr. J. Desfaye, Cermav, CNRS, Grenoble. Toutes les évaporations ont été effectuées sous pression réduite à 35–40° avec un évaporateur rotatif Büchi. L'homogénéité des composés préparés a été contrôlée de façon routinière par chromatographie sur des plaques de verre (4 × 10 cm) recouvertes de gel de silice-G Merck (épaisseur 0,25 mm) et révélées par chauffage au moyen d'un épiradiateur après pulvérisation soit d'une solution méthanolique à 5% d'acide sulfurique concentré, soit d'une solution éthanolique à 1% de ninhydrine. Les chromatographies sur colonne ont été effectuées au moyen de gel de silice 60 (Merck 70–230 mesh ASTM). Les systèmes solvants utilisés sont les mélanges suivants (v/v): *A*, 1:3 méthanol-acétate d'éthyle; *B*, 1:3 acétate d'éthyle-éther de pétrole; *C*, 1:2 acétate d'éthyle-éther de pétrole; *D*, 2:5 acétate d'éthyle-éther de pétrole; *E*, 2:1 acétate d'éthyle-éther de pétrole; *F*, 5:1:2 butanol-acide acétique-eau; *G*, 1:1:1 dichlorométhane-méthanol-acide acétique. Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Service Central de Microanalyse du Centre National de la Recherche Scientifique (Thiais). Le comportement du thio- $\beta$ -D-glucopyranoside de la L-cystéine dans les conditions de l'analyse des acides aminés a été déterminé à l'aide d'un autoanalyseur Beckman 120 C

*Bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosylisothiouronium (1).* — Le composé a été préparé selon la méthode de Černý *et al.*<sup>8</sup>, p.f 202–204° (éthanol),  $[\alpha]_{589}^{25} - 10,4^\circ$  (*c* 0,96, diméthyl sulfoxyde),  $[\alpha]_{546}^{25} - 12,1^\circ$  (*c* 0,96, diméthyl sulfoxyde); c.c.m.  $R_F$  0,69 (*A*);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3260 et 3040 (NH), 1755 (ester), 1660 (C=N), 1425, 1370, 1220, 1050, 900, 685  $\text{cm}^{-1}$ ; r.m.n. (diméthyl sulfoxyde-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9,34 et 9,18 (2 s, 2  $\times$  2 p,  $\text{NH}_2^+ \text{Br}^-$  et  $\text{NH}_2$ ), 5,82 (1 d, 1 p,  $J_{1,2}$  10 Hz, H-1), 5,32 (1 t, 1 p,  $J_{3,4}$  9,8 Hz, H-3), 5,10 (1 t, 1 p,  $J_{2,3}$  9,8 Hz, H-2), 5,10 (1 t, 1 p,  $J_{4,5}$  9,8 Hz, H-4), 4,31–4,04 (1 m, 3 p, H-5, H-6a, H-6b), 2,06, 2,02, 2,00 et 1,96 (4 s, 4  $\times$  3 p, 4 OAc); litt.: p.f. 192°,  $[\alpha]_{589}^{20} - 8,72^\circ$  (*c* 5, 102, eau) (Réf. 9); p.f. 205°,  $[\alpha]_{589}^{23} - 7,6^\circ$  (*c* 1,443, eau),  $[\alpha]_{589}^{23} - 18,8^\circ$  (*c* 0,957, éthanol) (réf. 10); p.f. 189° (réf. 8).

*p-Toluènesulfonate de l'ester benzylique de la N-benzylloxycarbonyl-L-sérine (2).* — Ce composé a été préparé par la méthode de Bergel et Wade<sup>11</sup>, p.f. 76,5–77,5° (éthanol),  $[\alpha]_{589}^{25} - 6,45^\circ$  (*c* 1,97, *N,N*-diméthylformamide),  $[\alpha]_{546}^{25} - 7,6^\circ$  (*c* 1,97, *N,N*-diméthylformamide);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3340 (NH), 3030 (Ph), 2945 (Me), 1745 (ester), 1690 (Amide I), 1520 (Amide II), 1360 et 1190 (S=O), 1050 (C=O), 745 et 680  $\text{cm}^{-1}$  (Ph); c.c.m.  $R_F$ , 0,35 (*B*) 0,55 (*C*); r.m.n. (acétone-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7,37 (1 d, 2 p,  $J$  8 Hz,  $\text{CH}_3\text{-Ph}$ ), 7,05 (1 s, 2 p,  $\text{CH}_3\text{-Ph}$ ), 6,97 (1 s, 10 p,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 6,54 (1 m, 1 p, NH), 4,77 (1 d, 4 p,  $J$  7 Hz,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 4,32 (1 m, 1 p,  $\text{CH}_2\text{-CH-NH}$ ), 4,10 (1 d, 2 p,  $J$  4 Hz,  $\text{S-CH}_2$ ), 1,82 (1 d, 3 p,  $J$  2 Hz,  $\text{CH}_3\text{-Ph}$ ); litt.<sup>12</sup>: p.f. 75,5–77°,  $[\alpha]_{589}^{24} - 7,41^\circ$  (*c* 2, *N,N*-diméthylformamide).

*Ester benzylique de l'acide 2-(R)-(benzylloxycarbonyl)amino-3-iodopropanoïque (3).* — À une solution de **2** (6,3 g) dans de l'acétone (6 ml), on ajoute goutte à goutte, sous agitation, 20 ml d'une solution acétonique d'iodure de sodium (2,6 g). Le mélange réactionnel est ainsi à une concentration finale de 10% en iodure de sodium. La solution, légèrement jaunâtre, est laissée pendant 70 h à température ambiante. À la fin de la réaction (suivie en c.c.m. de gel de silice jusqu'à disparition de **2**), on élimine par filtration le *p*-toluènesulfonate de sodium qui précipite au fur et à mesure du cours de la réaction. Le filtrat est évaporé à sec et conduit à un composé amorphe blanc-jaunâtre. Le produit brut est dissous dans du chloroforme, les dernières traces de *p*-toluènesulfonate de sodium et l'iodure de sodium en excès sont extraits par un lavage à l'eau. La phase chloroformique est évaporée à siccité pour donner un sirop qui prend rapidement en masse. Le produit est recristallisé dans le méthanol (5,2 g, 91%), p.f. 76–77°,  $[\alpha]_{589}^{25} - 20,2^\circ$  (*c* 2,03, *N,N*-diméthylformamide),  $[\alpha]_{546}^{25} - 24,6^\circ$  (*c* 2,03, *N,N*-diméthylformamide); c.c.m.  $R_F$  0,68 (*D*);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3310 (NH), 3030 (Ph), 1730 (ester), 1685 (Amide I), 1530 (Amide II), 1275, 1135, 1040 (C=O), 740 et 680  $\text{cm}^{-1}$  (Ph). Il apparaît que ce produit est légèrement contaminé par un composé secondaire (environ 2%) de  $R_F$  plus élevé (0,81, *D*), vraisemblablement l'ester benzylique de l'acide 2-(benzylloxycarbonyl)amino-acrylique produit par  $\beta$ -élimination d'acide iodhydrique<sup>13</sup> à partir de **3**. La quantité de ce produit secondaire, très faible au moment de la cristallisation, augmente en fonction du temps. La purification de **3** par chromatographie sur colonne (3  $\times$  40 cm) de gel de silice (*D*) ne permet pas d'éviter cette dégradation. Le produit secondaire se polymérise rapidement en formant une gomme.

*Ester benzylique de l'acide 2-(R)-(benzyloxycarbonyl)amino-3-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranosyl)propanoïque (4).* — Une solution de dithionite de sodium (1,74 g) et de carbonate de potassium (1,38 g) dans 40 ml d'eau est additionnée, goutte à goutte et sous agitation, à une solution de **1** (4,87 g) dans du diméthyl sulfoxyde (40 ml). La solution trouble obtenue est alors versée goutte à goutte et sous agitation dans une solution de **4** (4,4 g) dans du diméthyl sulfoxyde (60 ml). Le cours de la réaction est suivi en c.c.m. de gel de silice (*D*). Après 45 min de réaction à température ambiante (disparition de **3**), le mélange réactionnel est versé dans 500 ml d'eau préalablement refroidie à 4°. La solution trouble obtenue est alors extraite par du chloroforme (3 × 1 l). Les phases chloroformiques sont rassemblées puis lavées successivement avec une solution aqueuse d'acide sulfurique (5%), une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium (10%) et enfin avec de l'eau. La phase chloroformique résultante est séchée (sulfate de sodium) puis concentrée à siccité à l'évaporateur rotatif. Le sirop obtenu (5,4 g, 80%) est chromatographié sur colonne de silice (Silice 60 Merck) dans le système-solvant *E*. Le composé **4** est obtenu sous forme d'un sirop incolore (4,85 g, 72%),  $[\alpha]_{589}^{25} -37,4^\circ$  (*c* 2,03, chloroforme),  $[\alpha]_{546}^{25} -45,8^\circ$  (*c* 2,03, chloroforme): c.c.m.:  $R_F$  0,14 (*D*), 0,79 (*E*), 0,80 (*F*);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3340 (NH), 1755 (ester), 1510 (Amide II), 1370, 1220, 1035, 905, 725 et 680  $\text{cm}^{-1}$  (Ph); r.m.n. (chloroforme-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7,35 (1 m, 10 p, *Ph*-CH<sub>2</sub>), 5,96 (1 d,  $J_{\text{NH,CH}}$  7,5 Hz, NH), 5,16 (1 m, 4 p, AB de *CH*<sub>2</sub>-Ph), 5,05 (1 t, 1 p, *J* 9 Hz, H-3 ou H-4), 4,98 (1 d, 1 p,  $J_{2,3}$  9 Hz, H-2), 4,66 (1 m, 1 p, *CH*<sub>2</sub>-*CH*-NH), 4,44 (1 d, 1 p,  $J_{1,2}$  10 Hz, H-1), 4,16 et 4,07 (2 q, 2 p,  $J_{a,\text{CH}}$  5 Hz,  $J_{b,\text{CH}}$  2 Hz,  $J_{a,b}$  12,5 Hz, S-*CH*<sub>2</sub>-CH), 3,57 (1 o, 1 p, H-5), 3,24 (1 q, 1 p,  $J_{5,6a}$  4 Hz,  $J_{a,b}$  14 Hz, H-6a), 3,05 (1 q, 1 p,  $J_{5,6b}$  6 Hz, H-6b), 2,04-1,94 (3 s, 12 p, 4 OAc).

*Anal.* Calc. pour C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>13</sub>S: C, 56,88; H, 5,53; N, 2,07; O, 30,78; S, 4,74. Trouvé: C, 56,41; H, 5,54; N, 2,17; O, 29,53; S, 4,87.

*Acide 2-(R)-amino-3-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-3-thio-propanoïque (5).* — Le composé **4** (1,11 g, 1,6 mmol) est dissous dans 20 ml de méthanol-eau (19:1, v/v). À la solution on ajoute 1 équiv. d'acide chlorhydrique (1,6 mmol) et 1,1 g de sulfate de baryum palladié (10%). Le mélange est agité pendant 4 h à 20° et sous une pression d'hydrogène de 1,1 kg/cm<sup>2</sup>. Le catalyseur est éliminé par filtration et lavé par le méthanol. Le filtrat, évaporé à siccité, est repris par le méthanol. La cristallisation est obtenue par addition de dichlorométhane (0,6 g, 80%), p.f. 168-169°,  $[\alpha]_{589}^{25} -36,4^\circ$  (*c* 1,10, méthanol),  $[\alpha]_{546}^{25} -60,6^\circ$  (*c* 1,10, méthanol); c.c.m.:  $R_F$  0,35 (*F*), 0,81 (*G*);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3400 (large, NH), 1750 (ester), 1250, 1225  $\text{cm}^{-1}$ ; r.m.n. (diméthyl sulfoxyde-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8,48 (1 m, 2 p, NH<sub>2</sub>), 3,35 (1 q,  $J_{5,6a}$  4 Hz,  $J_{a,b}$  15 Hz, H-6a), 3,05, (1 q,  $J_{5,6b}$  6 Hz, H-6b), 2,04-1,96 (3 s, 12 p, 4 OAC); (méthanol-*d*<sub>4</sub>): 5,51-4,81 (3 p, H-3, H-4, H-2), 4,43-4,2 (3 p, S-CH<sub>2</sub>, H-5), 4,13-3,89 (2 p,  $J_{1,2}$  9 Hz, CH<sub>2</sub>-CH-NH<sub>2</sub>, H-1), 3,55 (1 q, 1 p,  $J_{5,6a}$  4 Hz,  $J_{a,b}$  16 Hz, H-6a), 3,08 (1 q, 1 p,  $J_{5,6b}$  7,5 Hz, H-6b), 2,10, 2,07, 2,04, 2,00 (4 s, 12 p, 4 OAC).

*Acide 2-(R)-amino-3-S-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-3-thio-propanoïque (thio- $\beta$ -D-glucopyranoside de la L-cystéine) (6).* — À une solution de **5** (0,2 g) dans le méthanol (5 ml), on ajoute 1 ml d'une solution méthanolique de méthoxyde de sodium 0,4M.

La solution est agitée à 4° pendant 48 h, neutralisée par addition de 0,15 ml de Dowex-50 (H<sup>+</sup>), filtrée, puis évaporée. Le résidu est dissous dans le minimum de méthanol et cristallisé par addition de dichlorométhane (110 mg, 87%), p.f. 220° (déc.),  $[\alpha]_{546}^{25} -40^\circ$  (c 0,5 eau); c.c.m.  $R_F$  0,08 (*F*), 0,20 (*G*);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3400 (large, NH, OH); r.m.n. ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  4,67 (1 d, 1 p,  $J_{1,2}$  9 Hz, H-1), 4,00 (1 m, H-5), 3,84 (1 m,  $\text{CH}_2\text{-CH-NH}$ ), 3,56 (1 m, S- $\text{CH}_2$ ), 3,45 (1 t, H-2), 3,44 (1 q,  $J_{5,6a}$  4 Hz,  $J_{a,b}$  16 Hz, H-6a), 3,12 (1 q, 1 p,  $J_{5,6b}$  8 Hz, H-6b).

Le composé **6** est élué de la colonne d'échangeur d'ions de l'autoanalyseur d'amino acides avec un temps de rétention de 36 min. L'acide aspartique, lalanine et la cystéine sont élusés dans les mêmes conditions avec les temps de rétention respectifs de 56, 116 et 133 min.

## RÉFÉRENCES

- 1 D. DELAY ET M. MONSIGNY, *Assemblée Annu. Soc. Chim. Fr.*, Caen, Mai 1975 [*Actual. Chim.*, (1975) n° 5, 45]; *Symp. Int. Glycoconjugates*, 3rd., Brighton, Juillet 1975.
- 2 Voir A. NEUBERGER, A. GOTTSCHALK ET R. D. MARSHALL, dans A. GOTTSCHALK (Ed.), *Glycoproteins*, 2nd edn., Elsevier, Amsterdam, 1972, pp. 273-295.
- 3 Voir M. MONSIGNY, D. DELAY ET F. DELMOTTE, *Symbioses*, 4 (1972) 39-72.
- 4 C. J. LOTE ET J. B. WEISS, *Biochem. J.*, 123 (1971) 25P; *FEBS Lett.*, 16 (1971) 81-95.
- 5 J. B. WEISS, C. J. LOTE ET H. BOBINSKI, *Nature (London) New Biol.*, 234 (1971) 25-26.
- 6 M. ČERNÝ ET J. PACÁK, *Chem. Listy*, 52 (1958) 2090-2093; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 24 (1959) 2566-2569.
- 7 J. MONTREUIL, M. MONSIGNY ET M. T. BUCHET, *C.R. Acad. Sci.*, 264 (1967) 2068-2071; M. MONSIGNY, M. T. BUCHET ET J. MONTREUIL, [*Chromatographie Symposium IV*, Bruxelles (1966)], *Soc. Belg. Sci. Pharm.*, (1968) 361-371.
- 8 M. ČERNÝ, J. VRKOČ ET J. STANĚK, *Chem. Listy*, 52 (1958) 311-315; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 24 (1959) 64-69.
- 9 W. SCHNEIDER ET K. EISFELD, *Ber.*, 61 (1928) 1260-1263.
- 10 W. A. BONNER ET J. E. KAHN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 2241-2245.
- 11 F. BERGEL ET R. WADE, *J. Chem. Soc.*, (1959) 941-947.
- 12 D. THEODOROUPOULOS, I. L. SCHWARTZ ET R. WALTER, *Biochemistry*, 6 (1967) 3927-3932.
- 13 D. N. SCHLUTER, G. MAMANTOV ET J. R. VERCCELLOTTI, *Carbohydr. Res.*, 38 (1974) 333-338.