

SYNTHESE DES SUBSTANCES DE GROUPE SANGUIN—IV†¹

SYNTHESE DU 2-ACETAMIDO-2-DESOXY-4-O-[2-O-(α -L-FUCOPYRANOSYL)- β -D-GALACTOPYRANOSYL]-D-GLUCOPYRANOSE, PORTEUR DE LA SPECIFICITE H

J.-C. JACQUINET et P. SINAY*

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

(Received in France 17 December 1975; Received in the UK for publication 17 February 1976)

Résumé—L'emploi d'éthers benzyliques comme groupements protecteurs temporaires des fonctions hydroxyles a permis la synthèse d'un trisaccharide à spécificité de groupe sanguin H. Le benzyl-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy- α -D-glucopyranoside est d'abord glycosylé à l'aide du 3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-*O*-(*tert*-butoxyéthylidène)- α -D-galactopyranose. Après *O*-désacétylation, le dérivé obtenu est glycosylé par le bromure de 2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyle, selon la méthode de catalyse par les ions bromures. Une hydrogénolyse conduit au 2-acétamido-2-désoxy-4-*O*-[2-*O*-(α -L-fucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose.

Abstract—The synthesis of a H blood group specific trisaccharide was performed by using benzyl ethers as temporary blocking groups for hydroxylic functions. Benzyl 2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside was glycosylated by 3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-*O*-(*tert*-butoxyethylidene)- α -D-galactopyranose; after *O*-deacetylation, glycosylation by 2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl bromide, and hydrogenolysis, 2-acetamido-2-deoxy-4-*O*-[2-*O*-(α -L-fucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose is obtained.

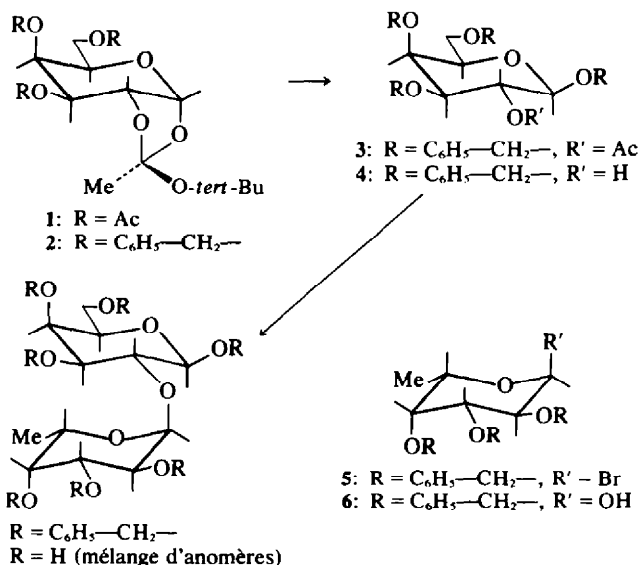
En 1964, Rege *et al.*² isolèrent, après dégradation alcaline d'une substance H de groupe sanguin humain, 12 mg d'un trisaccharide qui est considéré comme le déterminant antigénique (type 2) de l'activité H. La structure probable résulta d'une étude chimique-hydrolyse acide totale ou contrôlée, dégradation alcaline, oxydation au périodate de sodium.

Le but de cet article est de décrire la synthèse de ce trisaccharide, à l'échelon du gramme. En plus de son objectif initial-comparaison avec la substance naturelle-, cette entreprise présente un intérêt immunologique

évident.³ Elle souligne par ailleurs, après les travaux très récents de Lemieux et Driguez^{4,5} et de David et Veyrières,⁶ que les progrès réalisés en synthèse osidique permettent d'envisager la synthèse de la structure mégalosaccharidique composée par Kabat⁷ pour la partie glucidique des substances de groupe sanguin.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'intermédiaire clé de la synthèse est l'orthoester benzylé 2. Sa réaction avec un alcool doit en effet donner un glycoside 1,2-*trans* dont l'hydroxyle en C-2 peut être



†Partie III, Réf. 11; Partie II, Réf. 23; Partie I, Réf. 18. Ce travail a bénéficié de l'aide de subventions du Centre National de la Recherche Scientifique, de la Caisse Régionale d'Assurance Maladie du Centre et de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Contrat ASCO No. 74 7 0973).

spécifiquement libéré par *O*-désacétylation, permettant ainsi la glycosylation de cette position. Des éthers benzyliques d'orthoacétates du mannose et du glucose ont d'ailleurs déjà été employés par Franks *et al.*,⁸ puis Borén *et al.*⁹ Le *tert*-butyl orthoacétate a été choisi par suite des

bons résultats obtenus par Kochetkov *et al.*¹⁰ lors de réaction de glycosylation en sa présence. Le 3,4,6-tri-*O*-acétyl-1,2-*O*-(*tert*-butoxyéthylidène)- α -D-glucopyranose¹¹ est désacétylé en présence d'une quantité catalytique de méthylate de sodium, puis est, sans isolement de l'intermédiaire, benzylé dans le *N,N*-diméthylformamide en présence d'hydrure de sodium. Le composé sirupeux obtenu, après purification sur une colonne d'alumine, est instable et doit être rapidement engagé dans une réaction de glycosylation. Son spectre de RMN est en accord avec la structure proposée. Le singulet du aux protons C-Me apparaît à δ 1.66, dans une région correspondant à un groupement C-alkyl *endo*.¹² Aucune trace de l'autre stéréoisomère n'est visible. Afin de vérifier sa réactivité tout en préparant un dérivé caractéristique, cet orthoester est transformé rapidement (moins d'une heure) et avec un bon rendement (72%) en benzyl-2-*O*-acétyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranoside cristallin 3, par action de l'alcool benzyle dans le chlorobenzène à reflux, en présence de perchlorate de 2,6-diméthylpyridinium. Après *O*-désacétylation, le benzyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranoside 4 est obtenu cristallin. Cet alcool, obtenu avec un rendement de l'ordre de 50% à partir du 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétyl- β -D-galactopyranose,¹³ peut constituer un aglycone intéressant pour la synthèse de disaccharides 1 \rightarrow 2, là où l'emploi de conditions basiques de réaction est nécessaire (Koenigs-Knorr). Afin de vérifier sa réactivité vis à vis du bromure 5 il a été utilisé, en prélude à la synthèse du trisaccharide 17, comme précurseur du disaccharide 8.

Le 2-*O*- α -L-fucopyranosyl-D-galactopyranose 8 a été isolé comme produit d'hydrolyse d'oligosaccharides du lait¹⁴ et de substances de groupe sanguin.¹⁵ Il a d'abord été synthétisé par Levy *et al.*,¹⁵ puis récemment par Lemieux et Driguez.⁵ La première synthèse, qui met en jeu des déblocages successifs, donne un rendement final modeste (de l'ordre de 10%); le second procédé, qui utilise comme aglycone le 1,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-galactopyranose, conduit à un excellent rendement de condensation (83%), le rendement de la déprotection n'étant toutefois pas précisé. Par condensation de l'alcool 4 avec le bromure de 2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyle¹⁶ 5 dans le mélange dichlorométhane-*N,N*-diméthylformamide, en présence de bromure de tétraéthylammonium et de diisopropyléthylamine,¹⁷ le disaccharide perbenzylé 7 est obtenu avec un rendement de 88%. Des tamis moléculaires sont ajoutés pour maintenir le milieu aussi anhydre que possible. Les éthers benzyles n'ayant, dans les conditions de la réaction, aucune tendance à la migration, le caractère 1 \rightarrow 2 de la liaison glycosidique peut être tenu pour certain. La constante de couplage du proton interglycosidique ($J_{1,2}$ 3.5 Hz) est en faveur d'une liaison α . Après hydrogénéolyse, le disaccharide libre 8 est obtenu à l'état pur avec un excellent rendement (87%). Cet exemple souligne l'intérêt que présentent, pour la synthèse osidique, les éthers benzyles, employés à la fois comme groupements protecteurs de l'halogénure et de l'aglycone. Ils permettent l'emploi de conditions basiques de réaction sans redouter une migration ou un départ de groupements qui est toujours à craindre dans le cas des acétates.¹⁷ Enfin, la déprotection totale se fait en une seule étape dans des conditions très douces.

L'emploi du benzyl-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy- α -D-glucopyranoside¹⁸ 9 et de l'orthoester

1 nous a permis de réaliser très récemment une synthèse stéréospécifique et à bon rendement (75%) de la *N*-acétyl-lactosamine;¹¹ la réaction de l'orthoester benzylé 2 avec l'alcool 9 dans les conditions décrites plus haut à propos de la synthèse du composé 3 conduit à un mélange des deux disaccharides 10 et 13. Le benzyl-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-4-*O*-(2-*O*-acétyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-2-désoxy- α -D-glucopyranoside 10 attendu est isolé à l'état cristallin avec un rendement de 52%. Sa structure est confirmée par *O*-désacétylation, donnant le dérivé sirupeux 11, puis hydrogénéolyse, conduisant à la *N*-acétyllactosamine connue. Le benzyl-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-4-*O*-(2-*O*-acétyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2-désoxy- α -D-glucopyranoside 13 sirupeux (12%) est commodément identifié sous la forme de son dérivé *O*-désacétylé 14, cristallin.

La formation de glycosides 1,2-*cis* lors de l'emploi de la méthode à l'orthoester a déjà été observée. C'est ainsi que l'alkoolyse de 3,4,6-tri-*O*-acétyl-1,2-*O*-(alkoxyéthylidène)- α -D-glucopyranoses dans le dichlorométhane en présence d'acide *p*-toluènesulfonique conduit¹⁹ à des glucosides 1,2-*cis*, avec perte concomitante du groupement 2-*O*-acétyl. Ce même phénomène est également décrit²⁰ dans les conditions opératoires employées ici. Un disaccharide 1,2-*cis* a d'ailleurs été préparé²¹ par la méthode à l'orthoester. Par contre, la formation non négligeable de glycosides 1,2-*cis* sans perte du 2-*O*-acétate n'a pas encore, à notre connaissance, été explicitement décrite. Elle peut s'expliquer par la participation de la forme II à la réaction de glycosylation (Schéma 1).

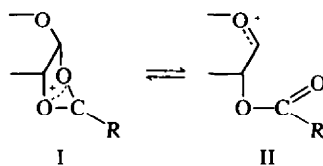
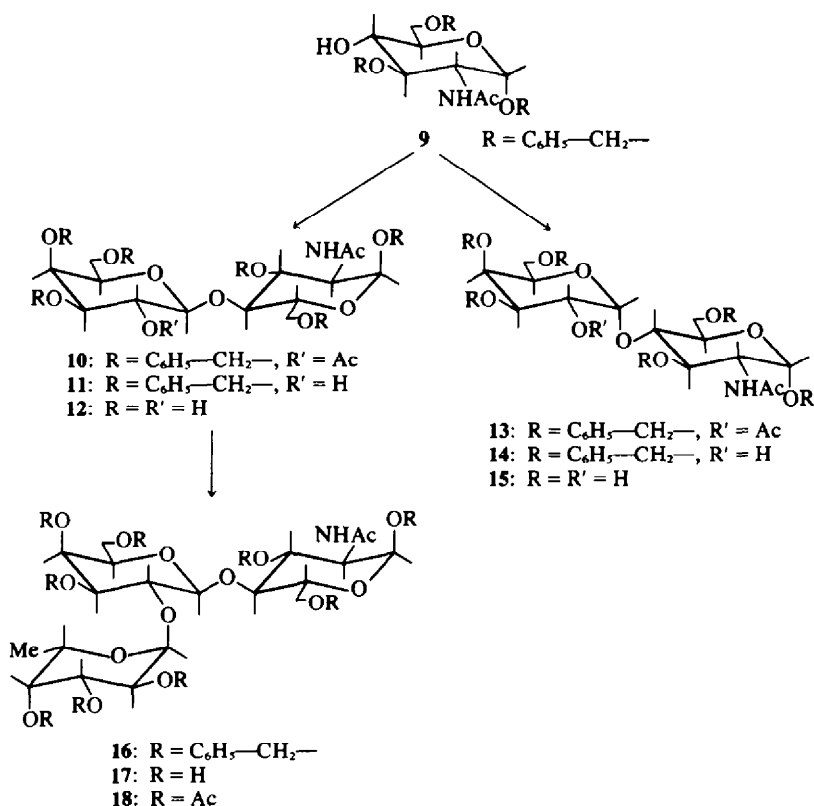


Schéma 1.

Par hydrogénéolyse du disaccharide protégé 14, le 2-acétamido-2-désoxy-4-*O*-(α -D-galactopyranosyl)- α -D-glucopyranose 15 est isolé à l'état cristallin. L'anomérie α du centre réducteur est déduite du sens de la mutarotation.

Après condensation de l'alcool 11 avec le bromure 5, dans les conditions décrites plus haut pour la synthèse du disaccharide 7, le trisaccharide nonbenzylé 16 est isolé à l'état pur avec un rendement de 80%. La constante de couplage du proton anomère du résidu L-fucopyranose (4 Hz) est en faveur d'une anomérie α . L'hydrolyse acide contrôlée (acide acétique-acide chlorhydrique) du trisaccharide 16 conduit, avec un excellent rendement, au 2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranose cristallin 6 et à l'alcool 11, caractérisé par son acétate 10. Après hydrogénéolyse, le trisaccharide du titre est isolé sous forme amorphe avec un bon rendement (75%). Ses caractéristiques sont très voisines de celles rapportées par Rege *et al.*² pour le composé naturel; un peracétate cristallin 18 a été préparé.

Le trisaccharide synthétique 17 est un excellent substrat²² à spécificité H pour des α -*N*-acétylgalactosaminyltransférases sériques A₁ et A₂.



PARTIE EXPERIMENTALE

Méthodes 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 à 20° 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 mesurés par rapport au tétraméthylsilane pris comme référence interne ou externe (s, singulet; d, doublet; q, quadruplet; m, multiplet). Les protons de l'unité D-galactopyranose sont affectés d'un indice prime, ceux de l'unité L-fucopyranose d'un indice seconde. 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 150° à 300°. Le gaz porteur est de l'azote sous une pression de 1.5 bars (à 150°), le débit étant de 20 ml/min. Les temps de rétention (t_R) sont exprimés par rapport à l'hexa-*O*-(triméthylsilyl)-*myo*-inositol pris comme référence. 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 le Service Central de Micro-Analyse du Centre National de la Recherche Scientifique (Thiais).

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-1,2-*O*-(*tert*-butoxyéthylidène)- α -D-galactopyranose 2

Le 3,4,6-tri-*O*-acétyl-1,2-*O*-(*tert*-butoxyéthylidène)- α -D-galactopyranose 1 (1.212 g, 3 mmoles) est désacétylé à l'aide d'une solution molaire de méthylate de sodium dans le méthanol anhydre (1 ml). Après 5 min à la température ambiante, le milieu

réactionnel est évaporé à sec, le résidu étant séché par des additions de toluène suivies d'évaporations. Le résidu est dissous dans du *N,N*-diméthylformamide (20 ml) et de l'hydruure de sodium (1.74 g d'une suspension à 50% dans de l'huile) est ajouté. Après cessation du dégagement d'hydrogène, du bromure de benzyle (4.43 ml) est ajouté goutte à goutte. Après 2 h à la température ambiante, l'excès de bromure est détruit par addition d'une solution méthanolique molaire de méthylate de sodium (10 ml) et agitation pendant une nuit. Le mélange réactionnel est ensuite évaporé à sec, le résidu repris dans de l'eau (100 ml) et extrait avec de l'éther (80 ml). La phase étherée est lavée avec une solution diluée d'hydrogénocarbonate de sodium, avec de l'eau, séchée (sulfate de sodium) et évaporée. Le sirop obtenu est chromatographié sur alumine (15 g). L'élué avec un mélange hexane-éther (3:1) contenant 0.25% de triéthylamine donne 2 (1.64 g, 100%) sous forme d'un sirop incolore qu'il n'a pas été possible de cristalliser, $[\alpha]_D^{23} + 23^\circ$ (c 2, CHCl₃); IR (film): ν_{max} 3100, 3060, 1500, 730 et 690 cm⁻¹; PMR (CDCl₃): δ 7.38 et 7.32 (15H, Ph), 5.73 (1H, d, H'-1, J_{1,2}} 4.5 Hz), 1.66 (3H, s, endo C-méthyl), 1.33 (9H, s, exo *O*-*tert*-butyl).

Malgré plusieurs tentatives une analyse élémentaire satisfaisante n'a pu être obtenue, par suite d'une décomposition rapide de cette substance. Elle est caractérisée par le dérivé 3.

Benzyl-2-*O*-acétyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranoside 3

Une solution de l'orthoester 2 (1.29 g, 2.4 mmoles) et d'alcool benzylique (1.62 g) dans du chlorobenzène (10 ml) est agitée à 140° sous atmosphère d'azote sec. Une solution 0.2 M de perchlorate de 2,6-diméthylpyridinium dans le 1,2-dichlorométhane (1.25 ml) est ajoutée goutte à goutte, le volume étant ensuite réduit à 5 ml par distillation de chlorobenzène. Cette distillation est poursuivie pendant toute la durée de la réaction (1 h), le volume étant maintenu constant (5 ml) par addition de chlorobenzène anhydre. Cette opération a pour but de maintenir le milieu réactionnel aussi anhydre que possible. Après retour à la température ambiante, ce dernier est dilué avec du chloroforme (50 ml) et lavé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, avec de l'eau,

séché (sulfate de magnésium) et évaporé. **3** cristallise dans de l'éther (992 mg, 72%), $[\alpha]_D - 36^\circ$ (c 1, CHCl₃); IR (Nujol): ν_{\max} 1740, 725 et 690 cm⁻¹; PMR (CDCl₃): δ 7.33 et 7.31 (20H, Ph), 5.48 (1H, dd, H'-2, J = 9 Hz et J = 8 Hz), 2.00 (3H, s, OAc). Calc. pour C₃₆H₃₈O₇: C, 74.20; H, 6.57; Tr. C, 74.13; H, 6.70%.

Benzyl - 3,4,6 - tri - O - benzyl - β - D - galactopyranoside 4

Le composé **3** (780 mg) est désacétylé (méthylate de sodium dans le méthanol); après le traitement habituel, **4** (636 mg, 88%) cristallise dans un mélange éther-hexane, F 60-61°; $[\alpha]_D - 38^\circ$ (c 1, CHCl₃); IR (Nujol): ν_{\max} 3330, 725 et 690 cm⁻¹; PMR (CDCl₃): δ 7.35 et 7.33 (20H, Ph), 2.40 (1H, s avec épaule, affiné par irradiation à 6.08, OH). Calc. pour C₃₂H₃₈O₆: C, 75.53; H, 6.71; Tr. C, 75.56; H, 6.60%.

Benzyl - 3,4,6 - tri - O - benzyl - 2 - O - (2,3,4 - tri - O - benzyl - α - L - fucopyranosyl) - β - D - galactopyranoside 7

Le bromure de 2,3,4 - tri - O - benzyl - α - L - fucopyranosyle **5** (1.5 g, 3 mmoles), préparé à partir de 1.9 g de 2,3,4 - tri - O - benzyl - 1 - O - p - nitrobenzoyl - α , β - L - fucopyranose est, aussitôt après son obtention, dissous dans du dichlorométhane anhydre (8 ml) contenant du bromure de tétraéthylammonium (945 mg, 4.5 mmoles). Cette solution est agitée, à l'abri de l'humidité et de la lumière et sous une atmosphère d'azote sec, en présence de tamis moléculaire 4 Å (200 mg). Au bout de 30 min, une solution de benzyl - 3,4,6 - tri - O - benzyl - β - D - galactopyranoside **4** (541 mg, 1 mmole) et de diisopropyléthylamine (500 mg, 3.1 mmoles) dans du N,N-diméthylformamide anhydre (2 ml) est ajoutée et l'agitation est maintenue pendant 12 h dans les mêmes conditions. L'excès de bromure **5** est alors détruit par addition de méthanol anhydre (3 ml) et agitation dans les mêmes conditions pendant 1 h. Après dilution avec du chloroforme (100 ml), la phase solide est éliminée par filtration. Le filtrat est lavé avec une solution aqueuse molaire d'acide chlorhydrique glacé, avec une solution diluée d'hydrogencarbonate de sodium, avec de l'eau, séché (chlorure de calcium) et évaporé sous vide (80° sous 1 mm de Hg). Le résidu obtenu (1.985 g) est chromatographié sur gel de silice (80 g). L'élué avec un mélange chloroforme-hexane (9:1) donne une fraction principale (1.33 g) qui est chromatographiée sur gel de silice (60 g). L'élué avec du dichlorométhane donne le disaccharide **7** à l'état pur (847 mg, 88% par rapport au composé **4**) qu'il n'a pas été possible de cristalliser, $[\alpha]_D - 65^\circ$ (c 2.4, CHCl₃); IR (Film): ν_{\max} 3300, 3260, 3000, 1500, 730 et 690 cm⁻¹; PMR (CDCl₃): δ 7.4 à 7.1 (35H, m, Ph), 5.67 (1H, d, H'-1, J_{1,2} 3.5 Hz), 0.82 (1H, d, J_{M,H-5} 6.7 Hz, C-méthyl). Calc. pour C₆₁H₆₄O₁₀, H₂O: C, 75.11; H, 6.82; O, 18.05; Tr. C, 75.08; H, 6.66; O, 18.10%.

2 - O - (α - L - Fucopyranosyl) - α , β - D - galactose 8

Le composé **7** (550 mg) est hydrogénélysé pendant 72 h à la température ambiante dans de l'acide acétique glacial (10 ml), en présence de palladium sur charbon à 10% (500 mg). Le catalyseur est essoré et le filtrat évaporé. On obtient **8** sous forme d'une poudre amorphe qu'il n'a pas été possible de cristalliser (162 mg, 87%), $[\alpha]_D - 56^\circ$ (c 1.2, H₂O); litt.^{14,15,25} $[\alpha]_D^{25} - 56.5^\circ$ (c 1, H₂O), $[\alpha]_D^{25} - 56.7^\circ$ (c 1.2, H₂O), $[\alpha]_D^{20} - 53.1^\circ$ (c 1.2, H₂O); PMR (D₂O): δ 5.60 (d, H'-1 α , J_{1,2} 3.6 Hz), 5.40 (d, H'-1 β , J_{1,2} 3.2 Hz), 5.30 (d, H'-1 α , J_{1,2} 3.2 Hz), 1.45 (d, C-méthyl, J_{M,H-5} 6.2 Hz), 1.43 (d, C-méthyl, J_{M,H-5} 6.2 Hz). Calc. pour C₁₂H₂₂O₁₀: C, 44.17; H, 6.80; Tr. C, 44.07; H, 7.08%.

Après réduction au borohydride de sodium et per(triméthylsilylation),²⁴ le produit est parfaitement homogène en chromatographie en phase gazeuse, t_R 1.54. Il est d'autre part homogène en chromatographie sur papier Whatman No. 1, dans le mélange de solvants acétate d'éthyle-pyridine-eau (10:4:3), R_{mactose} 1.58; litt.^{2,5,15} 1.55; 1.56; 1.58.

Benzyl - 2 - acétamido - 3,6 - di - O - benzyl - 2 - désoxy - 4 - O - (2 - O - acétyl - 3,4,6 - tri - O - benzyl - β - D - galactopyranosyl) - α - D - glucopyranoside 10

Le benzyl - 2 - acétamido - 3,6 - di - O - benzyl - 2 - désoxy - α - D - glucopyranoside **9** (1.23 g, 2.5 mmoles) et l'orthoester **2** (2.2 g, 4 mmoles) sont dissous dans du chlorobenzène anhydre et fraîchement distillé (15 ml), qui est ensuite porté à 130°, à l'abri de

l'humidité et sous atmosphère d'azote sec. Après avoir lentement distillé une partie du chlorobenzène (environ 3 ml), une solution 0.2 M de perchlorate de 2,6-diméthylpyridinium dans le 1,2-dichlorométhane (2 ml) est ajoutée sous forte agitation. La lente distillation du chlorobenzène est maintenue pendant toute la durée de la réaction (2 h à 130°), le volume réactionnel étant maintenu constant (15 ml) par additions du chlorobenzène anhydre. Après refroidissement, la solution est diluée avec du chloroforme (100 ml), lavée avec une solution d'hydrogencarbonate de sodium, avec de l'eau, séchée (chlorure de calcium) et évaporée. Le sirop obtenu est chromatographié sur gel de silice (220 g). L'élué avec un mélange de chlorure de méthylène-acétone (9:1) permet d'obtenir un mélange des deux disaccharides **10** et **13** puis le produit de départ **9** (246 mg, 20%), F 144-145°.

Le mélange des deux composés **10** et **13** donne le disaccharide **10** à l'état pur après cristallisation dans l'éther (1.245 g, 52%), F 130-131°; $[\alpha]_D + 67.5^\circ$ (c 1, CHCl₃); IR (Nujol): ν_{\max} 3380 (NH), 1750 (C=O, ester), 1650 (amide I), 1545 (amide II), 730 et 690 cm⁻¹ (Ph); PMR (CDCl₃): δ 7.35, 7.25 (30H, Ph), 5.40 (2H, d et q, NH et H'-2, J_{1,2} 7.5 Hz, J_{2,3} 8 Hz), 5.04 (1H, d, H-1, J_{1,2} 3.5 Hz), 1.96 (3H, s, OAc), 1.81 (3H, s, NHAc). Calc. pour C₅₈H₆₃NO₁₂: C, 72.09; H, 6.58; N, 1.45; O, 19.88; Tr. C, 72.03; H, 6.64; N, 1.67; O, 19.98%.

Benzyl - 2 - acétamido - 3,6 - di - O - benzyl - 2 - désoxy - 4 - O - (3,4,6 - tri - O - benzyl - α - D - galactopyranosyl) - α - D - glucopyranoside 14

Les eaux-mères de la cristallisation du composé **10** contiennent le composé **13**, très légèrement contaminé (chromatographie sur couche mince de gel de silice dans éther-hexane 1:1, v/v) par le composé **10**. Après évaporation du solvant, il n'a pas été possible de cristalliser le résidu, dont les spectres IR et RMN (CDCl₃) sont identiques à ceux de l'échantillon analytique (voir ci-dessous).

Afin de purifier totalement l'anomère α , les eaux-mères de la cristallisation du composé **10** sont alors désacétylées (méthylate de sodium dans le méthanol); après le traitement habituel, **14** (292 mg, 12%) cristallise dans le méthanol, F 170°; $[\alpha]_D + 89^\circ$ (c 1.1, CHCl₃); IR (Nujol): ν_{\max} 3440 (OH), 3360 (NH), 1650 (Amide I), 735 et 690 cm⁻¹ (Ph); PMR (CDCl₃): δ 5.45 (2H, 2d, NH et H'-1, J_{1,2} 4 Hz et J_{NH,H-2} 9 Hz), 4.90 (1H, d, H-1, J_{1,2} 3.5 Hz), 2.75 (1H, d, OH, J 9 Hz), 1.80 (3H, s, NHAc). Calc. pour C₅₈H₆₃NO₁₁: C, 72.78; H, 6.65; N, 1.51; Tr. C, 72.80; H, 6.65; N, 1.48%.

Benzyl - 2 - acétamido - 3,6 - di - O - benzyl - 2 - désoxy - 4 - O - (2 - O - acétyl - 3,4,6 - tri - O - benzyl - α - D - galactopyranosyl) - α - D - glucopyranoside 13

Afin d'obtenir un échantillon analytique de **13**, le composé **14** (70 mg) est acétylé à la température ambiante pendant 24 h (anhydride acétique-pyridine). Le traitement habituel donne le composé **13** à l'état pur (73 mg, 100%) sous forme d'un verre incristallisable, $[\alpha]_D + 117^\circ$ (c 0.7, CHCl₃); IR (Nujol): ν_{\max} 3360 (NH), 1750 (C=O, ester), 1650 (amide I), 1540 (amide II), 720 et 690 cm⁻¹ (Ph); PMR (CDCl₃): δ 7.32 (30H, Ph), 5.42 (1H, d, H'-1, J_{1,2} 4 Hz), 5.27 (1H, d, NH, J_{NH,H-2} 9 Hz), 4.93 (1H, d, H-1, J_{1,2} 4 Hz), 1.99 (3H, s, OAc), 1.71 (3H, s, NHAc). Calc. pour C₅₈H₆₃NO₁₂: C, 72.08; H, 6.57; N, 1.45; Tr. C, 72.28; H, 6.49; N, 1.53%.

Benzyl - 2 - acétamido - 3,6 - di - O - benzyl - 2 - désoxy - 4 - O - (3,4,6 - tri - O - benzyl - β - D - galactopyranosyl) - α - D - glucopyranoside 11

Le composé **10** (830 mg) est désacétylé (méthylate de sodium dans le méthanol); après le traitement habituel, **11** (755 mg, 95%) est obtenu sous forme d'un produit pur amorphe, $[\alpha]_D + 71.5^\circ$ (c 2, CHCl₃); IR (Film): ν_{\max} 3460 (OH), 3340 (NH), 1655 (amide I), 1550 (amide II), 730 et 690 cm⁻¹ (Ph); PMR (CDCl₃): δ 7.38-7.28 (30H, m, Ph), 5.35 (1H, d, NH, J_{NH,H-2} 9 Hz), 4.94 (1H, d, H-1, J_{1,2} 4 Hz), 2.97 (1H, s, élargi, OH), 1.79 (3H, s, NHAc). Calc. pour C₅₈H₆₃NO₁₁: C, 72.78; H, 6.65; N, 1.51; Tr. C, 72.91; H, 6.70; N, 1.40%. Après hydrogénation catalytique dans de l'acide acétique glacial (Pd/C, 10%), ce composé est transformé en N-acétyl-lactosamine **12** (84%), F 170-171°, $[\alpha]_D + 48.5^\circ \rightarrow +28^\circ$ (c 0.5, eau); litt.^{11,25} F 170-171°, $[\alpha]_D^{25} + 50^\circ \rightarrow +28.5^\circ$; F 168-170°, $[\alpha]_D^{25} + 51.5^\circ \rightarrow +28.5^\circ$. Après réduction au borohydride de sodium et per(triméthylsilylation), ce produit cristallisé, ainsi que le résidu

des eaux-mères, sont homogènes en chromatographie en phase gazeuse, t_R 1.95.

2 - Acétamido - 2 - désoxy - 4 - O - (α - D - galactopyranosyl) - α - D - glucopyranose **15**

Le composé **14** (120 mg) est hydrogénéolysé pendant 48 h à la température ambiante dans de l'acide acétique glacial (5 ml) en présence de Pd/C à 10%. Le catalyseur est alors essoré et le filtrat évaporé. Le résidu cristallise dans un mélange isopropanol-méthanol pour donner **15** (45 mg, 90%), F 196-198°; $[\alpha]_D^{+151}$ (2 min) \rightarrow +132° (5 h) (c 0.4, eau-méthanol, 9:1). Calc. pour $C_{11}H_{22}NO_{11}$: C, 43.86; H, 6.57; N, 3.65; O, 45.91; Tr. C, 43.81; H, 6.67; N, 3.39; O, 46.03%. Après réduction au borohydrure de sodium et per(triméthylsilylation), ce produit est homogène en chromatographie en phase gazeuse, t_R 2.00.

2 - Acétamido - 3,6 - di - O - benzyl - 4 - O - [2 - O - (2,3,4 - tri - O - benzyl - α - L - fucopyranosyl) - 3,4,6 - tri - O - benzyl - β - D - galactopyranosyl] - 2 - désoxy - α - D - glucopyranoside **16**

Le bromure de 2,3,4-tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosyle **5** (1.25 g, 2.5 mmoles) est, aussitôt après obtention, dissous dans du 1,2-dichloroéthane anhydre (8 ml). Cette solution est immédiatement ajoutée, à l'abri de la lumière et de l'humidité, à une solution du composé **11** (1.1 g, 1.2 mmoles), de bromure de tétraéthylammonium (1.26 g, 6 mmoles) et de diisopropyléthylamine (300 mg, 2.25 mmoles) dans du N,N-diméthylformamide anhydre (2 ml). La solution obtenue est agitée pendant 24 h en présence de tamis moléculaire 4 Å (500 mg). L'excès de bromure **5** est ensuite détruit par addition de méthanol anhydre (10 ml) et agitation pendant 4 h. Après dilution avec du chloroforme (100 ml), la phase solide est éliminée par filtration. Le filtrat est lavé avec une solution aqueuse diluée d'hydrogénocarbonate de sodium, avec de l'eau, séché (sulfate de sodium) et évaporé sous vide. Le résidu obtenu (2.15 g) est chromatographié sur gel de silice (220 g). L'élution avec un mélange chloroforme-éther (7:3) donne le trisaccharide **16** à l'état pur (1.273 g, 80%) sous forme amorphe. $[\alpha]_D^{+8.5}$ (c 1, CHCl₃); IR (Nujol): ν_{max} 3340 (NH), 1650 (amide I), 1540 (amide II), 740 et 690 cm⁻¹ (Ph); PMR (CDCl₃): δ 7.30-7.20 (45H, Massif, Ph), 5.71 (1H, d, H¹-, J_{1,2} 4 Hz), 5.35 (1H, d, NH, J_{NH,H-2} 9 Hz), 5.01 (1H, d, H-1, J_{1,2} 4 Hz), 1.88 (3H, s, NHAc), 1.13 (3H, d, C-méthyl, J 7 Hz). Le reste du spectre n'a pas été analysé. Calc. pour $C_{38}H_{58}NO_{24}$: C, 74.34; H, 6.69; N, 1.04; Tr. C, 74.35; N, 6.64; O, 1.15%.

Les fractions de queue de la colonne sont évaporées et acétylées (anhydride acétique-pyridine). Le traitement habituel permet d'obtenir le composé cristallin **10** (95 mg, 8.5%).

Un échantillon de **16** (54 mg, 0.04 mmole) est hydrolysé à 100° pendant 1.5 h dans un mélange d'acide acétique à 80% (1 ml) et d'acide chlorhydrique normal (0.3 ml). Après refroidissement, le milieu réactionnel est extrait au chloroforme (20 ml). Les extraits chloroformiques sont lavés avec une solution aqueuse diluée d'hydrogénocarbonate de sodium, avec de l'eau, séchés (sulfate de magnésium) et évaporés. Le résidu est chromatographié sur gel de silice (5 g). L'élution avec un mélange chloroforme-acétone (19:1) donne d'abord le 2,3,4 - tri - O - benzyl - α - L - fucopyranose **6** (15 mg, 83%), cristallisé dans un mélange éther-hexane, F102-103°, puis le composé **11** (30 mg, 80%), identifié après acétylation (anhydride acétique-pyridine), sous la forme de l'acétate **10** (27 mg), F 129-130°.

2 - Acétamido - 2 - désoxy - 4 - O - [2 - O - (α - D - fucopyranosyl) - β - D - galactopyranosyl] - D - glucopyranose **17**

Le composé **16** (1.8 g) est hydrogénéolysé pendant 24 h à la température ambiante dans de l'acide acétique glacial (50 ml) en présence de palladium sur charbon à 10% (2 g). Le catalyseur est essoré et le filtrat évaporé. Le résidu (707 mg) est dissous dans de l'eau (10 ml) et purifié sur une colonne charbon-célite 535 (30 g d'un mélange 1:1 en poids; dimension de la colonne: 150 x 22 mm). Les fractions éluées à l'éthanol à 7.5% (500 ml) et à l'éthanol à 10% (2 l) sont jointes et évaporées. On obtient ainsi le trisaccharide **17** sous forme amorphe (535 mg, 75.5%), $[\alpha]_D^{+46.5}$ (c 0.5, H₂O); litt.² - 45°; PMR (D₂O): δ 5.40 (1H, d, H¹-, J_{1,2} 3.2 Hz), 5.30 (1H, d, H-1, J_{1,2} 3 Hz), 4.65 (1H, d, H¹-, J_{1,2} 8 Hz),

2.25 (3H, s, NHAc), 1.45 (3H, d, C-méthyl, J 7 Hz). Calc. pour $C_{20}H_{35}O_{15}$: C, 43.16; H, 6.88; N, 2.52; O, 47.43; Tr. C, 43.10; H, 6.97; N, 2.76; O, 47.63%.

Après réduction au borohydrure de sodium et per(triméthylsilylation), le produit est homogène en chromatographie en phase gazeuse, t_R 2.90. Il est d'autre part homogène en chromatographie sur papier Whatman No. 1 dans le mélange de solvants acétate d'éthyle-pyridine-eau (10:4:3), $R_{f,actose}$ 1.00; litt² 1.11.

2 - Acétamido - 1,3,6 - tri - O - acétyl - 4 - O - [2 - O - (2,3,4 - tri - O - acétyl - α - L - fucopyranosyl) - 3,4,6 - tri - O - acétyl - β - D - galactopyranosyl] - 2 - désoxy - α - D - glucopyranose **18**

Le composé **17** (85 mg) est chauffé pendant 1 h à 100° dans de l'anhydride acétique (3 ml) contenant de l'acétate de sodium anhydre (160 mg). Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé dans une solution diluée et glacée d'hydrogénocarbonate de sodium (100 ml) et l'ensemble est agité pendant 3 h à 0°. La solution est ensuite extraite au chloroforme (30 ml). Les extraits chloroformiques sont lavés avec une solution diluée d'hydrogénocarbonate de sodium, avec de l'eau, séchés (sulfate de magnésium) et évaporés. L'acétate **18** cristallise dans le tétrachlorure de carbone (105 mg, 72%), F 126°; $[\alpha]_D^{+17}$ (c 1, CHCl₃); IR (Nujol): ν_{max} 3350 (NH), 1750 (C=O, ester), 1670 (amide I), 1530 (amide II) cm⁻¹; PMR (CDCl₃): δ 6.19 (1H, d, H-1, J_{1,2} 4 Hz), 5.76 (1H, d, NH, J_{NH,H-2} 10 Hz), 2.20-1.96 (30H, m, Ac), 1.21 (3H, d, C-méthyl, J 7 Hz). Calc. pour $C_{38}H_{58}NO_{24}$: 0.14 CCl₄: C, 49.20; H, 5.69; N, 1.50; Cl, 2.29; Tr. C, 49.07; H, 5.89; N, 1.45; Cl, 2.02. Cette analyse est obtenue après un séchage de 3 jours à 80° sous 0.1 mm Hg.

REFERENCES

- Présenté lors de la réunion du Chemical Society Carbohydrate Group (Queen Elizabeth College), London (16 Septembre 1975).
- V. P. Rege, T. J. Painter, W. M. Watkins et W. T. J. Morgan, *Nature* **203**, 360 (1964).
- D. V. Zopf et V. Ginsburg, *Arch. Biochem. Biophys.* **167**, 345 (1975).
- R. U. Lemieux et H. Driguez, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4063 (1975).
- R. U. Lemieux et H. Driguez, *Ibid.* **97**, 4069 (1975).
- S. David et A. Vequieres, *Carbohydr. Res.* **40**, 23 (1975).
- E. A. Kabat, dans *Blood and Tissue Antigens* (Ed. par D. Aminoff), p. 187. Academic Press, New York (1970).
- N. E. Franks et R. Montgomery, *Carbohydr. Res.* **5**, 286 (1968).
- H. B. Borén, G. Ekborg, K. Eklind, P. J. Garegg, A. Pilotti et C.-G. Swahn, *Acta Chem. Scand.* **27**, 2639 (1973).
- N. K. Kochetkov, A. F. Bochkov, T. E. Sokolovskaya et A. J. Snytkova, *Carbohydr. Res.* **16**, 17 (1971).
- J.-C. Jacquinet et P. Sinaÿ, *Ibid.* **46**, 138 (1976).
- A. S. Perlin, *Can. J. Chem.* **41**, 399 (1963); R. U. Lemieux et A. R. Morgan, *Ibid.* **43**, 2199 (1965).
- F. J. Bates et Associés, *Polarimetry, Saccharimetry and the Sugars*, National Bureau of Standards, Circular C440, 488 (1942).
- R. Kuhn, H. H. Baer et A. Gauhe, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **611**, 242 (1958).
- A. Levy, H. M. Flowers et N. Sharon, *Carbohydr. Res.* **4**, 305 (1967).
- M. Dejter-Juszynski et H. M. Flowers, *Carbohydr. Res.* **18**, 219 (1971).
- R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick et K. James, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4056 (1975).
- J.-C. Jacquinet et P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **38**, 305 (1974).
- R. U. Lemieux, *Chem. Can.* **16**, 14 (1964).
- A. F. Bochkov, V. I. Betanely et N. K. Kochetkov, *Izv. Akad. Nauk. SSSR. Ser. Khim.* **6**, 1379 (1974); A. F. Bochkov, V. I. Betanely et N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **30**, 418 (1973).
- G. Alfredsson, H. B. Borén et P. J. Garegg, *Acta Chem. Scand.* **26**, 2531 (1972).
- J.-P. Cartron, communication personnelle.
- J.-C. Jacquinet et P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **42**, 251 (1975).
- C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita et W. W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2497 (1963).
- R. Kuhn et W. Kirschenhor, *Chem. Ber.* **87**, 1547 (1954).