

N° d'Ordre 266

50376
1971
168

50376
1971
168

MEMOIRE PRESENTE

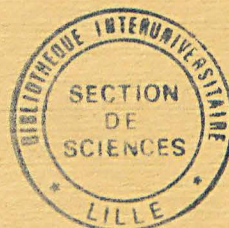
A L'UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE I

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

OPTION : BIOCHIMIE

par

Francis DELMOTTE



PREPARATION, PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET IDENTIFICATION
DES ETHERS METHYLIQUES DE LA GLUCOSAMINE

Présenté le 2. 7. 1971, devant la Commission d'Examen

Président : M. MONTREUIL

Rapporteur : M. MONSIGNY

Examineur : M. ADRIAN

SCD LILLE 1



D 030 302680 9

N° d'Ordre : 266

50376
1971
168

50376
1971
168

M E M O I R E P R E S E N T E

A L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DE LILLE

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

SPECIALITE: CHIMIE ORGANIQUE

OPTION : BIOCHIMIE

par

Francis DELMOTTE

PREPARATION, PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES, et IDENTIFICATION
DES ETHERS METHYLIQUES de la GLUCOSAMINE.



Présenté le 2.7.1971, devant la Commission d'Examen

Président : M. MONTREUIL
Rapporteur : M. MONSIGNY
Examineur : M. ADRIAN

A mes Parents.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur M. MONSIGNY, Maître de Conférences, dans le laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille (Professeur J. MONTREUIL) ; puis au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans (Professeur C. SADRON).

Je tiens à exprimer ma très vive reconnaissance à Monsieur Michel MONSIGNY, pour l'intérêt constant qu'il a porté à mon travail. Il a été pour moi un guide précieux, et les nombreux conseils qu'il m'a prodigués au cours du développement de ces recherches m'ont été d'un grand profit.

Qu'il trouve ici le témoignage de mon Amitié.

*Je tiens aussi à remercier Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL.
Il n'a cessé, tout au long de mon séjour dans son Laboratoire, de me faire
bénéficier de sa grande expérience scientifique et de ses hautes qualités
pédagogiques.*

Qu'il reçoive ici l'expression de ma profonde gratitude.

- P L A N -

	Pages
<u>I N T R O D U C T I O N</u>	1

<u>G E N E R A L I T E S</u>	2

1. <u>LES OSAMINES</u>	3
2. <u>PROCEDES DE METHYLATION</u>	3
I.- <u>HISTORIQUE</u>	3
A.- <u>Procédés de méthylation au sulfate de méthyle</u>	5
B.- <u>Procédés de méthylation à l'iodure de méthyle</u>	5
II.- <u>DISCUSSION</u>	8
III.- <u>CONCLUSION</u>	8
3. <u>METHODES DE PREPARATION DES ETHERS METHYLIQUES DE LA</u>	
<u>GLUCOSAMINE</u>	
I.- <u>METHYL-ACETAMIDO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE</u>	9
A.- <u>Préparation à partir d'halogéno-dérivés</u>	9
B.- <u>Méthylsodation par le méthanol et l'acide chlorhydrique</u>	9
C.- <u>Procédé de ROTH et PIGMAN</u>	12
D.- <u>Procédé de FISCHER</u>	12
II.- <u>TRI-O-METHYL-3,4,6 ACETAMIDO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE</u>	12
A.- <u>Méthylation au sulfate de méthyle</u>	12
B.- <u>Méthylation à l'iodure de méthyle</u>	12
III.- <u>CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-3,6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE</u> 15	
A.- <u>Synthèse directe</u>	15
B.- <u>Préparation à partir de la chitine</u>	17

III.- <u>CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-3,6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE</u>	17
IV.- <u>CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-3,4 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.</u>	17
V.- <u>CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-4,6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE</u> .	19
A.- <u>Synthèse directe.</u>	19
B.- <u>Préparation à partir d'un oside isolé du lait de Femme.</u>	19
VI.- <u>CHLORHYDRATE DU O-METHYL-3 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.</u> . . .	19
A.- <u>Synthèse à partir du méthyl acétamido-2 désoxy-2 α-D-glucopyrannoside</u>	19
B.- <u>Synthèse à partir de l'acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose</u> .	20
VII.- <u>CHLORHYDRATE DU MONO-O-METHYL-6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE</u>	20
VIII.- <u>CHLORHYDRATE DU MONO-O-METHYL-4 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCO-PYRANNOSE</u>	21
4. <u>SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES ETHERS METHYLIQUES</u>	
<u>DE LA GLUCOSAMINE.</u>	21
I.- <u>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</u>	21
II.- <u>CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE</u>	23
III.- <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	23
IV.- <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ECHANGEURS DE CATIONS.</u>	25
V.- <u>CONCLUSIONS.</u>	25

T R A V A U X P E R S O N N E L S

SYNTHÈSE et PRÉPARATION des ETHERS METHYLIQUES de la GLUCOSAMINE
--

1. <u>MATERIEL ET METHODES.</u>	28
I.- <u>SUBSTRATS DE BASE</u>	28

II.- <u>PREPARATION OU PURIFICATION DES SOLVANTS ET DES MATIERES</u>	
<u>PREMIERES</u>	28
III.- <u>TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES.</u>	30
A.- <u>Chromatographie en couche mince</u>	30
B.- <u>Chromatographie et électro-chromatographie sur papier</u>	31
C.- <u>Chromatographie d'adsorption sur colonne de charbon-célite.</u>	33
D.- <u>Chromatographie d'adsorption sur colonne de silice.</u>	34
E.- <u>Chromatographie à l'auto-analyseur d'amino-acides</u>	34
IV.- <u>TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES</u>	35
A.- <u>Spectroscopie Infra-Rouge</u>	35
B.- <u>Résonance magnétique nucléaire.</u>	42
V.- <u>DETERMINATION DES CONSTANTES PHYSIQUES</u>	45
A.- <u>Point de fusion</u>	45
B.- <u>Pouvoir rotatoire</u>	46
VI.- <u>O-DESACETYLATION PAR LA SOUDE</u>	46
2 . <u>PREPARATIONS.</u>	46
I.- <u>SYNTHESE DU METHYL ACETAMIDO-2 DESOXY-2 β-D-GLUCOPYRANNOSE</u>	46
A.- <u>Principe.</u>	46
B.- <u>Procédés.</u>	48
a) Préparation du tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy 2 β -D-glucopyrannose.	48
b) Préparation du chloro-1 désoxy-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannose	49
c) Préparation du méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	51
d) Préparation du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D- glucopyrannoside	52
II.- <u>SYNTHESE DU BENZYL ACETAMIDO-2 DESOXY-2 β-D-GLUCOPYRANNOSE.</u>	55
A.- <u>Principe.</u>	55
B.- <u>Procédés.</u>	55

a) Synthèse du benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside.	55
b) Préparation du benzyl acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside.	57
III.- <u>SYNTHÈSE DU CHLORHYDRATE DU TRI-O-METHYL-3,4,6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE</u>	58
A.- <u>Préparation à partir de la chitine.</u>	58
B.- <u>Synthèse directe</u>	58
a) Préparation du méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.	58
b) Préparation du chlorhydrate du tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.	60
IV.- <u>PREPARATION DU CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-3,6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE</u>	61
A.- <u>Principe.</u>	61
B.- <u>Procédés.</u>	61
a) Acétolyse de la chitine.	61
1. Procédé de KUHN et EKONG	62
2. Procédé d'OSAWA	63
3. Procédé personnel.	63
b) Méthylation de la chitine.	69
c) Séparation chromatographique de la di-O-méthyl-3,6 N-acétyl glucosamine et de la tri-O-méthyl-3,4,6 N-acétyl glucosamine	70
d) Préparation du chlorhydrate du di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.	73
C.- <u>Conclusion.</u>	76
V.- <u>PREPARATION DU CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-3,4 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.</u>	76
A.- <u>Principe</u>	76
B.- <u>Procédés</u>	76
a) Préparation du méthyl O-méthyl-3 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.	76
b) Préparation du méthyl di-O-méthyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.	80
c) Préparation du méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.	82
d) Préparation du chlorhydrate du di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	84
C.- <u>Conclusions.</u>	84

VI.- <u>PREPARATION DU CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-4,6 AMINO-2</u> <u>DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE</u>	85
A.- <u>Principe</u>	85
B.- <u>Procédés</u>	85
a) Préparation du méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside	85
b) Préparation du méthyl O-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside	89
c) Préparation du méthyl O-benzoyl-3 acétamido-2 désoxy- 2 D-glucopyrannoside	91
d) Préparation du méthyl O-benzoyl-3 di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside	92
e) Préparation du méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside et de son produit d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique	92
f) Préparation du méthyl O-benzyl-3 O-benzilidène-4,6 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside .	94
g) Préparation du méthyl O-benzyl-3 N-benzyl-2 N-acétyl- 2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside	96
h) Préparation du méthyl O-benzyl-3 di-O-méthyl-4,6 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside .	97
i) Préparation du méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside	98
j) Préparation du chlorhydrate du di-O-méthyl-4,6 amino- 2 désoxy-2 D-glucopyrannose	99
C.- <u>Conclusions</u>	99
VII.- <u>SYNTHESE DU CHLORHYDRATE DU MONO-O-METHYL-3 AMINO-2 DESOXY-</u> <u>2 D-GLUCOPYRANNOSE</u>	100
A.- <u>Principe</u>	100
B.- <u>Procédés</u>	100
a) Préparation de la N-acétyl-glucosamine	100
b) Préparation du O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy- 2 D-glucopyrannose	102
c) Préparation du méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside	103
d) Préparation du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy- 2 D-glucopyrannoside	106
e) Préparation du chlorhydrate du mono-O-méthyl-3 amino- 2 désoxy-2 D-glucopyrannose	108
C.- <u>Conclusions</u>	108

VIII.- <u>SYNTHÈSE DU CHLORHYDRATE DU MONO-O-MÉTHYL-6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE</u>	109
A.- <u>Principe</u>	109
B.- <u>Procédés</u>	109
a) Préparation du méthyl O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	109
b) Préparation du méthyl di-O-benzoyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	112
c) Préparation du méthyl di-O-benzoyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	113
d) Préparation du méthyl O-méthyl-6 di-O-benzoyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	115
e) Préparation du méthyl mono-O-méthyl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside et de son hydrolysate chlorhydrique	116
C.- <u>Conclusions</u>	117

<p style="text-align: center;">ETUDE CRITIQUE DU PROCÉDE DE METHYLATION SELON LA METHODE D'HAKOMORI</p>

1. <u>INTRODUCTION</u>	118
2. <u>PROCEDES</u>	118
I.- <u>METHYLATION DU METHYL O-METHYL-3 ACETAMIDO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSIDE SELON LE PROCÉDE DE JEANLOZ</u>	118
II.- <u>METHYLATION DU METHYL ACETAMIDO-2 DESOXY-2 β-D-GLUCOPYRANNOSIDE PAR LA METHODE D'HAKOMORI</u>	119
III.- <u>METHYLATION DE LA CHITINE SELON LE PROCÉDE DE KUHN</u>	120
IV.- <u>METHYLATION DE LA CHITINE SELON LE PROCÉDE D'HAKOMORI</u>	120

3. <u>ETUDE COMPARATIVE DES DERIVES METHYLES PREPARES.</u>	122
A.- <u>Principe.</u>	122
B.- <u>Méthodes.</u>	122
a) Analyse comparative des produits de méthylation du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopy- rannoside selon le procédé de JEANLOZ et du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside selon le procédé d'HAKOMORI	122
1. Analyse en I.R	122
2. Analyse en R.M.N	125
3. Analyse à l'auto-analyseur d'amino-acides.	125
b) Analyse chromatographique sur échangeurs d'ions des produits d'hydrolyse de la chitine méthylée par le procédé de KUHN, puis par le procédé de KUHN suivi d'HAKOMORI	125
4. <u>CONCLUSIONS.</u>	130

<p>ETUDE CRITIQUE DES METHODES DE SEPARATION DES ETHERS METHYLIQUES DE LA GLUCOSAMINE</p>

I.- <u>METHODES DE SEPARATION.</u>	132
A.- <u>Chromatographie sur colonne d'échangeurs de cations</u>	132
B.- <u>Chromatographie sur papier</u>	136
C.- <u>Conclusion</u>	138
II.- <u>DOSAGE DES ETHERS METHYLIQUES DE LA GLUCOSAMINE A L'AUTO- ANALYSEUR D'AMINO-ACIDES</u>	138
A.- <u>Principe.</u>	138
B.- <u>Mode opératoire</u>	138
C.- <u>Résultats et discussions.</u>	139
D.- <u>Conclusions</u>	142
III.- <u>CONCLUSIONS.</u>	142
CONCLUSIONS GENERALES	143

BIBLIOGRAPHIE	152

I N T R O D U C T I O N

Les glycoprotéines constituent une classe de composés biologiques, dont l'importance est maintenant bien établie. Les glycoprotéines contiennent, à côté des amino-acides, des oses neutres, des osamines et souvent des acides sialiques. Le mode d'enchaînement de ces oses peut être déterminé par diverses méthodes chimiques, enzymatiques et physiques. Parmi ces méthodes, la méthylation totale tient une place de choix.

Les problèmes rencontrés pour l'application de cette dernière méthode sont essentiellement, d'une part l'obtention d'une méthylation totale, et d'autre part l'identification et le dosage des dérivés méthylés.

Le premier problème peut être résolu par l'application des méthodes classiques de méthylation utilisées indépendamment ou successivement.

Le second problème exige l'identification des dérivés méthylés obtenus. Pour cela, il est nécessaire de préparer les divers dérivés méthylés de chaque ose présent dans le glycanne. Notre travail s'inscrit dans ce cadre. Nous nous sommes attachés à préparer des quantités pondérables de dérivés méthylés de la glucosamine.

Cette osamine se rencontre, en effet, dans la plupart des glycoprotéines connues, et particulièrement dans les glycoprotéines d'origines animales, telles que l'ovomucoïde, l'ovalbumine, la transferrine, etc...

Nous rapporterons dans un premier temps la préparation de dérivés de substitution de la glucosamine, qui conduisent après méthylation aux différents éthers méthyliques.

Dans un second temps, nous donnerons les résultats de méthylation obtenus par la méthode de KUHN et par la méthode d'HAKOMORI ; et nous montrerons par l'étude en Résonance Magnétique Nucléaire et en spectroscopie Infra-Rouge que la méthode d'HAKOMORI provoque une N-méthylation.

Enfin, nous décrirons les méthodes d'identification (par chromatographie) et de dosage des dérivés méthylés qui sont utilisées pour les études de structure des glycannes.

I N T R O D U C T I O N

Les glycoprotéines constituent une classe de composés biologiques, dont l'importance est maintenant bien établie. Les glycoprotéines contiennent, à côté des amino-acides, des oses neutres, des osamines et souvent des acides sialiques. Le mode d'enchaînement de ces oses peut être déterminé par diverses méthodes chimiques, enzymatiques et physiques. Parmi ces méthodes, la méthylation totale tient une place de choix.

Les problèmes rencontrés pour l'application de cette dernière méthode sont essentiellement, d'une part l'obtention d'une méthylation totale, et d'autre part l'identification et le dosage des dérivés méthylés.

Le premier problème peut être résolu par l'application des méthodes classiques de méthylation utilisées indépendamment ou successivement.

Le second problème exige l'identification des dérivés méthylés obtenus. Pour cela, il est nécessaire de préparer les divers dérivés méthylés de chaque ose présent dans le glycanne. Notre travail s'inscrit dans ce cadre. Nous nous sommes attachés à préparer des quantités pondérables de dérivés méthylés de la glucosamine.

Cette osamine se rencontre, en effet, dans la plupart des glycoprotéines connues, et particulièrement dans les glycoprotéines d'origines animales, telles que l'ovomucoïde, l'ovalbumine, la transferrine, etc...

Nous rapporterons dans un premier temps la préparation de dérivés de substitution de la glucosamine, qui conduisent après méthylation aux différents éthers méthyliques.

Dans un second temps, nous donnerons les résultats de méthylation obtenus par la méthode de KUHN et par la méthode d'HAKOMORI ; et nous montrerons par l'étude en Résonance Magnétique Nucléaire et en spectroscopie Infra-Rouge que la méthode d'HAKOMORI provoque une N-méthylation.

Enfin, nous décrirons les méthodes d'identification (par chromatographie) et de dosage des dérivés méthylés qui sont utilisées pour les études de structure des glycannes.

GENERALITES

Nous préciserons dans ce chapitre :

- la nature des osamines intervenant dans les glycoprotéines.
- les différents procédés de méthylation utilisés pour déterminer la structure de la fraction glycannique des glycoprotéines.
- les méthodes de préparation des éthers méthyliques de la glucosamine.
- les méthodes de séparation et d'identification des éthers méthyliques de la glucosamine.

1. LES OSAMINES.

Les osamines constituant les glycoprotéines sont essentiellement la D-glucosamine (amino-2 désoxy-2 D-glucose) (Fig. 1, p. 4), et la D-galactosamine (amino-2 désoxy 2 D-galactose). La D-mannosamine (amino-2 désoxy-2 D-mannose) entre dans la constitution des acides sialiques. La D-talosamine, la D- et la L-fucosamine, la D-gulosamine, la D-fructosamine, la D-quinovosamine, et l'acide muramique ont été isolés de divers glycoprotides.

Dans les osides libres et conjugués, les osamines existent sous la forme de dérivés N-acylés, généralement N-acétylés.

Les N-acétyl osamines possèdent une importance particulière dans la structure des glycoprotéines, car elles interviennent dans la liaison glycanne-protide dans un grand nombre de glycoprotéines.

2. PROCÉDÉS DE MÉTHYLATION.

I.- HISTORIQUE.

Les premiers procédés de méthylation des glucides ont été décrits par PURDIE et IRVINE (1) en 1903 et par HAWORTH (2) en 1915. Ces deux méthodes originales ont subi, ultérieurement, de très nombre ses modifications car leur application a révélé très vite leurs imperfections.

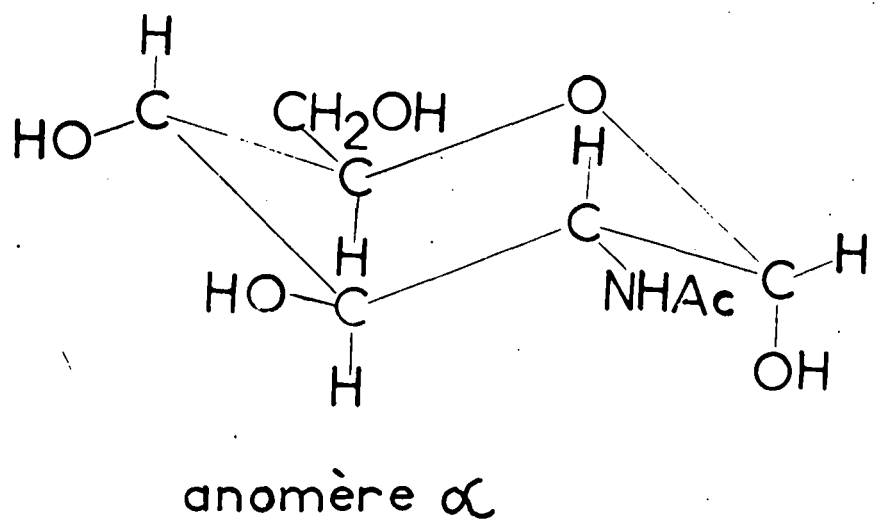
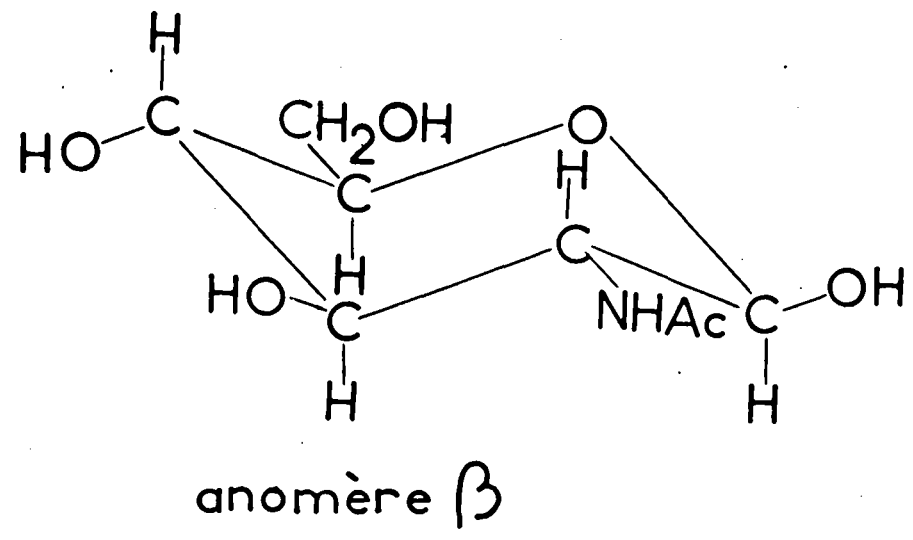
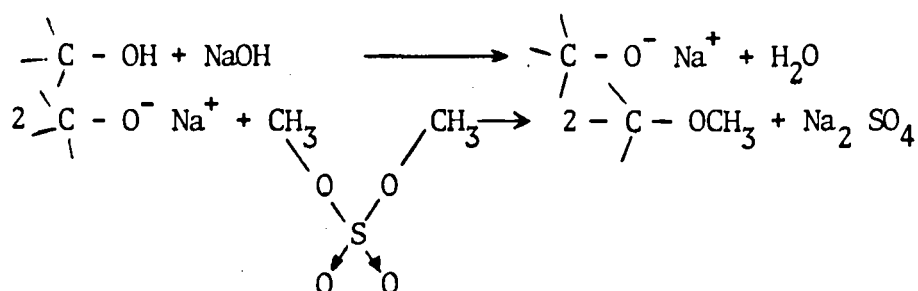


Figure 1

Représentation graphique des anomères pyraniques de la N-acétyl glucosamine (acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyranose).

A.- Procédés de méthylation au sulfate de méthyle.

Ces procédés dérivent de la méthode originale d'HAWORTH (3). Les glucides sont méthylés à chaud par le sulfate de méthyle en présence de soude. La réaction est la suivante :



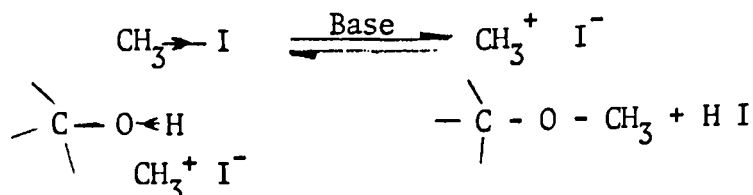
B.- Procédés de méthylation à l'iodure de méthyle.

Diverses méthodes ont été préconisées, qui utilisent l'iodure de méthyle comme agent de méthylation. Elles peuvent être classées en deux catégories : celle qui utilise le méthyl sulfinyl carbanion (HAKOMORI (4)) et celles qui utilisent les hydroxydes de métaux. Dans cette dernière catégorie, plusieurs variantes ont été proposées, elles diffèrent par la nature du cation ou par la nature du solvant. Les principes de ces diverses méthodes sont rassemblés dans le Tableau I (p. 6).

1/ Méthodes utilisant les hydroxydes de métaux :

Les réactions de méthylation par l'iodure de méthyle se font dans un solvant en présence d'un catalyseur. Les étapes de la réaction sont les suivantes :

si l'on considère un mécanisme ionique :

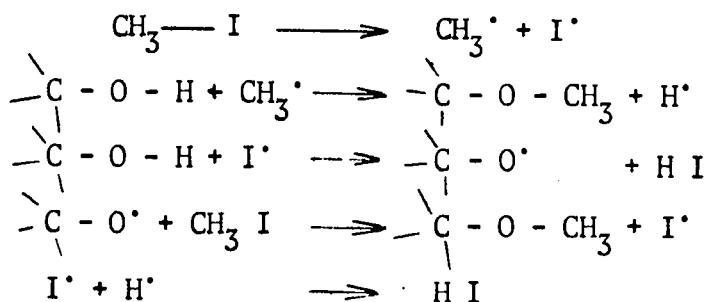


ou les suivantes si l'on considère un mécanisme radicalaire :

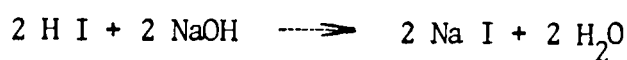
TABLEAU I

Procédés de méthylation à l'iodure de méthyle.

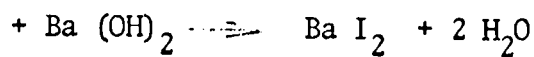
REACTIFS	CATALYSEUR	SOLVANT	AUTEURS
OSE + IODURE de METHYLE	Ag ₂ O	méthanol	PURDIE et IRVINE (5)
	Ag ₂ O	diméthylformamide	KUHN, BAER et GAUHE (6)
	Ag ₂ O	diméthylsulfoxyde	SRISVASTAVA, HARSCHÉ et SINGH (7)
	Ba (OH) ₂ et Ba O	diméthylformamide	KUHN et TRISCHMAN (8)
	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 \\ \quad \downarrow \\ \quad \text{O} \end{array}$		diméthylsulfoxyde



puis,



ou



ou



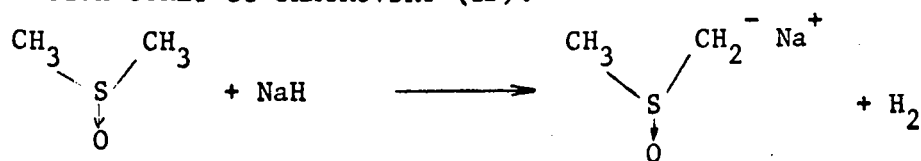
2/ Méthode de HAKOMORI : (10)

HAKOMORI utilise dans le solvant un agent fortement nucléophile : le méthyl sulfinyl carbanion $\text{CH}_3 - \text{SO} - \text{CH}_2^-$. La présence de ce carbanion dans le mélange réactionnel facilite l'ionisation des fonctions alcooliques, d'où une attaque plus rapide par l'iodure de méthyle.

La méthylation s'effectue à température ambiante en trois étapes :

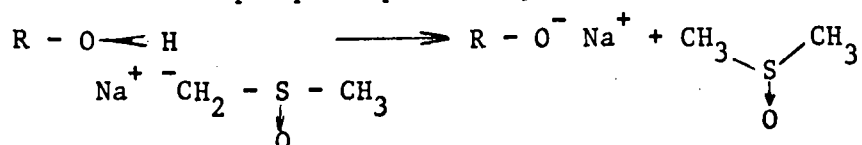
a) Formation du méthyl sulfinyl carbanion :

Elle s'effectue par l'action de l'hydrure de sodium sur le diméthylsulfoxyde selon COREY et CHAYKOVSKY (11).



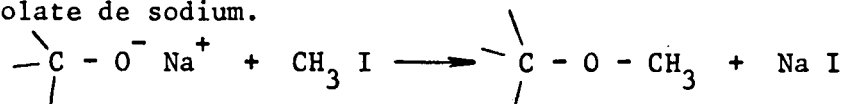
b) Formation de l'alcoolate :

L'attaque nucléophile du méthyl sulfinyl carbanion sur le groupement - OH de la fonction alcoolique provoque la rupture de la liaison $\text{O} \leftarrow \text{H}$



c) Ethérification :

L'éthérification s'effectue par l'action de l'iodure de méthyle sur l'alcoolate de sodium.



II.- DISCUSSION.

En faisant varier judicieusement les facteurs tels que la température, le solvant, l'agent réactionnel, les techniques de méthylation se sont progressivement améliorées. Mais la méthylation totale est difficile à obtenir. En outre, la température élevée et l'utilisation de la soude entraînent une dégradation appréciable de l'osamine.

Les méthodes de KUHN *et al.* (12), et SRIVASTAVA *et al.* (13), constituent un progrès remarquable vers la perméthylation des oses et des osamines. Cette efficacité est due à l'utilisation d'un solvant très polaire à haut pouvoir de dissolution à l'égard des N-acétyl hexosamines et des osides.

La méthode de HAKOMORI (14) conduit à des oses perméthylés à condition toutefois de bloquer au préalable la fonction réductrice. Elle présente l'avantage d'être extrêmement rapide et nécessite peu de réactifs. L'efficacité extraordinaire de cette méthode est due à la formation d'un alcoolate de sodium par l'action du méthyl sulfinyl carbanion. L'éthérification devient facile, car l'alcoolate formé réagit rapidement avec les donneurs de carbonium tels que les dérivés halogénés ou les sulfates organiques.

III.- CONCLUSION.

Il existe donc, à l'heure actuelle, un grand nombre de méthodes de méthylation. Pour la synthèse des éthers méthyliques de la glucosamine, nous avons effectué notre choix en tenant compte de l'aptitude de la méthode à réaliser la perméthylation et de son action sur les substituants portés par la molécule d'osamine.

3. METHODES DE PREPARATION DES ETHERS METHYLIQUES DE LA GLUCOSAMINE.

Les éthers méthyliques de la glucosamine peuvent être préparés, soit à partir d'osides naturels de structure connue, soit à partir d'osides synthétiques.

Nous avons effectué, dans un premier temps, une étude bibliographique sur les différents procédés de synthèse du méthyl acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside, du tri - O - méthyl-3,4,6 acétamido-2, désoxy-2 D-glucopyrannose, du di - O - méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose, du di - O - méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose, du di - O - méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose, du mono - O - méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose, du mono - O - méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose, et du mono - O - méthyl-4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

I.- METHYL ACETAMIDO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

Diverses tentatives de méthylation de la glucosamine base se sont soldées par un échec. Il a donc paru indispensable d'utiliser la N-acétyl glucosamine comme composé de départ. Cependant, l'instabilité de la N-acétyl glucosamine, en milieu alcalin, est telle que, dans la plupart des méthodes de substitution, elle se trouve profondément dégradée. C'est pourquoi, le méthyl N-acétyl glucosaminide est généralement utilisé comme composé de départ pour les réactions de synthèse des composés de substitution de la N-acétyl glucosamine.

A.- Préparation à partir d'halogéno-dérivés.

KOENIGS et KNORR (15) ont décrit un procédé d'osidation des oses à partir de poly - O-acétyl halogéno-dérivés. Cette méthode a été adaptée à la méthylosidation de la glucosamine par différents auteurs dans les conditions décrites au Tableau II (p. 10).

B.- Méthylosidation par le méthanol et l'acide chlorhydrique.

La méthylosidation des oses neutres s'effectue habituellement par l'action, à reflux d'une solution méthanolique d'acide chlorhydrique. De nombreux auteurs ont tenté d'appliquer cette technique à la glucosamine elle-même, ou à ses dérivés de substitution (Tableau III, p. 11).

TABLEAU II

Procédés de méthylosidation de la glucosamine à partir de ses dérivés halogénés.

S U B S T R A T	REACTIFS	PRODUITS OBTENUS	AUTEURS
Chloro-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannose	$\text{CH}_3 \text{ OH}$ <hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> $\text{Ag}_2 \text{ CO}_3$	Anomère β du (1)	LEABACK et WALKER (16)
Bromo-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannose	$\text{CH}_3 \text{ OH}$ <hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> $\text{Ag}_2 \text{ CO}_3$	Anomères α et β du (1)	MOGGRIDGE et NEUBERGER (17)
Bromohydrate du bromo-1 tri-O-acétyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	$\text{CH}_3 \text{ OH}$ <hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> Pyridine	Anomères α et β du (2)	IRVINE, Mc NICOLL et HYND (18)

(1) Méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside

(2) Bromhydrate du méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside

TABLEAU III

Procédés de méthylosidation par le méthanol et l'acide chlorhydrique.

S U B S T R A T	REACTIFS	PRODUITS OBTENUS	AUTEURS
Tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	CH ₃ OH / HCl 2 %	Anomères α et β du (1)	MOGGRIDGE et NEUBERGER (19)
Acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	CH ₃ OH / HCl	Anomères α et β du (1)	FLOWERS et JEANLOZ (20)
Carbobenzyloxamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	CH ₃ OH / HCl à 65° C	Anomère α du (2)	NEUBERGER et RIVERS (21)
Carbobenzyloxamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	CH ₃ OH / HCl à 20° C	Anomère β du (2)	NEUBERGER et RIVERS (22)

(1) Chlorhydrate du méthyl amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside

(2) Méthyl carbobenzyloxamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside

C.- Procédé de ROTH et PIGMAN (23).

Le O - benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose est méthylosidé en milieu alcalin par une quantité stoechiométrique de sulfate de méthyle. Les auteurs obtiennent, après hydrolyse du groupement benzylidène par une solution aqueuse d'acide acétique, les anomères α et β du méthyl acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.

D.- Procédé de FISCHER (24).

La glucosamine est méthylosidée en présence de méthanol anhydre et d'un échangeur de cations utilisé comme catalyseur (MATSUSHIMA et MIYAZAKI (25)).

Les anomères pyraniques et furanniques du méthyl amino-2 désoxy-2 D-glucoside formés, peuvent être séparés par chromatographie sur colonne d'échangeur d'anions (MATSUSHIMA et MIYAZAKI (26)), puis N-acétylés par la méthode de LEVY et Mc ALLAN (27).

II.- TRI - O - METHYL-3,4,6 ACETAMIDO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

A.- Méthylation au sulfate de méthyle.

Le procédé de méthylation au sulfate de méthyle utilise un solvant basique ; aussi son application directe à la N-acétyl glucosamine s'est traduite par des rendements très faibles (HAWORTH (28) et CUTLER *et al.* (29)). Pour éviter une dégradation de l'osamine lors de la méthylation, différents auteurs (CUTLER *et al.* (30) et NEUBERGER (31)) ont utilisé les méthyl osides de la N-acétyl glucosamine. Les différentes méthodes sont rassemblées dans le Tableau IV (p. 13).

B.- Méthylation à l'iodure de méthyle.

Les procédés de méthylation de la glucosamine utilisant l'iodure de méthyle comme réactif sont rassemblés dans le Tableau V (p. 14).

TABLEAU IV

Procédés de méthylation au sulfate de méthyle.

SUBSTRAT	REACTIFS	SOLVANT	PRODUITS OBTENUS	RENDEMENT	AUTEURS
Acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	$(\text{CH}_3)_2 \text{SO}_4$ + Na OH	eau	(1)	très faible	HAWORTH (32)
Tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	$(\text{CH}_3)_2 \text{SO}_4$ + Na OH	CCl_4 + eau	(1)	faible	CUTLER, HAWORTH et PEAT (33)
Méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	$(\text{CH}_3)_2 \text{SO}_4$ + Na OH	CCl_4	(1)	95 %	CUTLER, HAWORTH et PEAT (34)
Méthyl acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside	$(\text{CH}_3)_2 \text{SO}_4$ + Na OH	H_2O	(2)	70 %	NEUBERGER (35)

(1) Méthyl acétamido-2 désoxy-2 tri-O-méthyl-3,4,6 β -D-glucopyrannoside(2) Méthyl acétamido-2 désoxy-2 tri-O-méthyl-3,4,6 α -D-glucopyrannodise

TABLEAU V

Méthylation à l'iodure de méthyle.

S U B S T R A T	REACTIFS	SOLVANT	PRODUITS OBTENUS	AUTEURS
Acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	CH ₃ I + Ag OH	D M F A	(1)	KUHN, BAER et GAUHE (36)
Tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	CH ₃ I + Ba O et Ba (OH) ₂	D M F A	(1)	KUHN et TRISCHMANN (37)

(1) Méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside

Conclusion :

Les différentes méthodes que nous venons de signaler permettent de préparer les dérivés tri - O - méthylés de la glucosamine ; mais les rendements sont en général assez faibles. En effet, MONSIGNY (38) en effectuant une étude comparée des différentes méthodes a pu montrer que la méthylation n'était pas complète. Les méthodes de HAWORTH (39), de KUHN et TRISCHMAN (40) et de SRIVASTAVA (41) conduisent à des mélanges complexes de dérivés incomplètement méthylés. La méthode de KUHN, BAER et GAUHE (42) est plus efficace. Enfin, la méthode d'HAKOMORI (43) appliquée au méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranoside fournit une méthylation complète. Malheureusement, en utilisant la méthode d'HAKOMORI, il est difficile d'éviter une N-méthylation des amides : LEDERER (44).

Ainsi donc, il semble que la meilleure méthode soit celle de KUHN, BAER et GAUHE (45).

III.- CHLORHYDRATE DU DI- O - METHYL-3,6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

A.- Synthèse directe.

JEANLOZ (46) prend pour composé de départ le méthyl O - méthyl-3 O-triphényl méthane-6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyranoside ; puis l'auteur suit les étapes suivantes (Fig. 2, p. 16) :

- le groupement hydroxyle porté par le carbone 4 est masqué par estérification au chlorure de benzoyle.
- le groupement trityle est éliminé par hydrolyse ménagée.
- le groupement hydroxyle ainsi libéré sur le carbone 6 est méthylé par le procédé de PURDIE (47).
- une hydrolyse alcaline donne naissance au méthyl di - O - méthyl-3,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyranoside.
- l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 4 N pendant 4 heures à 100° C donne le chlorhydrate du di - O - méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyranose.

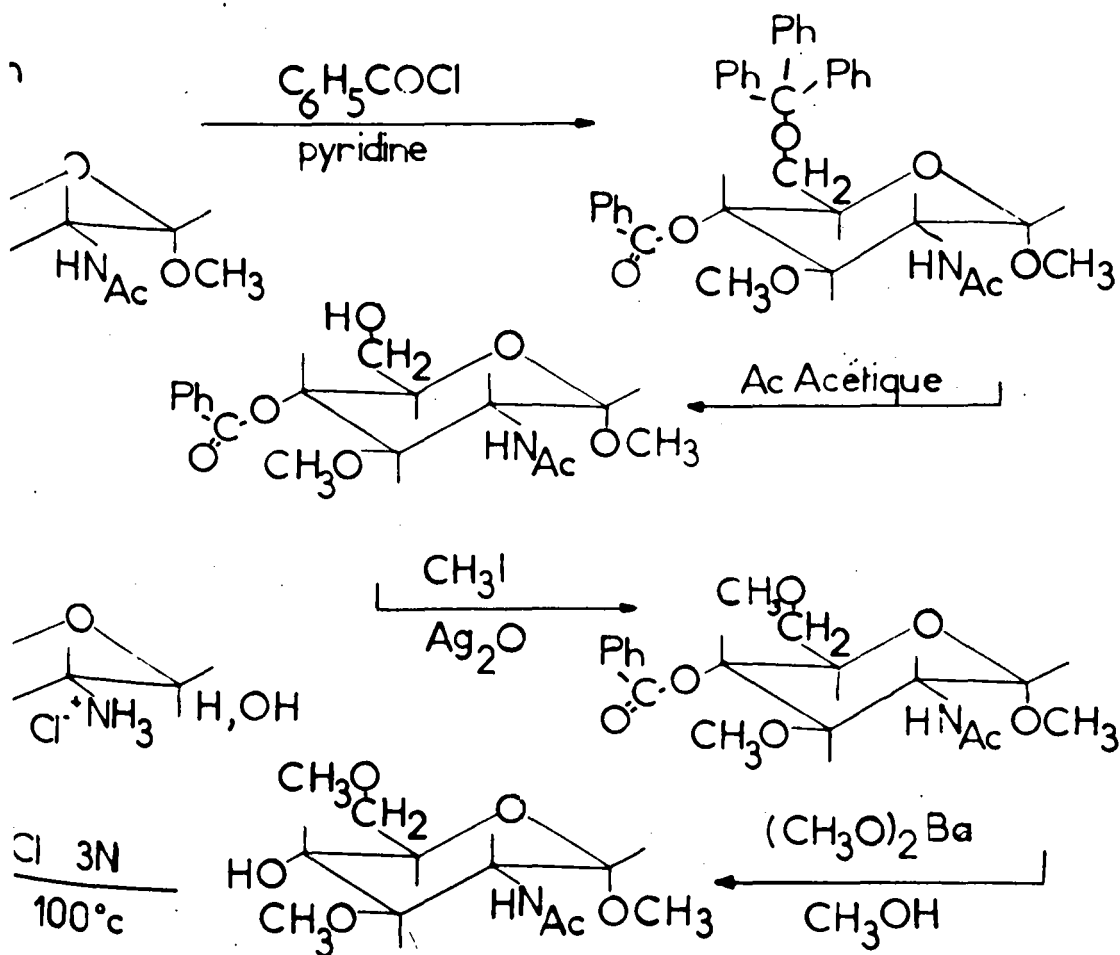


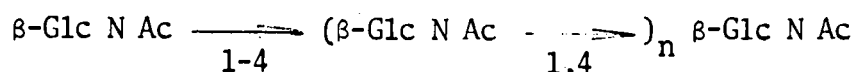
Figure 2

Schéma de synthèse du di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose selon le procédé de JEANLOZ.

B.- Préparation à partir de la chitine.

La chitine est une substance de soutien chez les insectes et les crustacés ; divers champignons et lichens en renferment également.

La chitine est considérée comme un homoglycane de structure linéaire constitué par un enchaînement d'acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside (Fig. 3, p. 18) :



La chitine est un produit insoluble dans les solvants utilisés pour la méthylation. Il est de ce fait indispensable de la modifier.

WOLFROM *et al.* (48) utilisent le produit de N-désacétylation de la chitine : le chitosane. Après méthylation partielle au sulfate de méthyle, les auteurs peracétylent le produit obtenu et réalisent une méthylation selon KUHN et TRICHMAN (49), enfin après une hydrolyse chlorhydrique ils obtiennent le chlorhydrate du di - O - méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

IV. - CHLORHYDRATE DU DI - O - METHYL-3,4 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

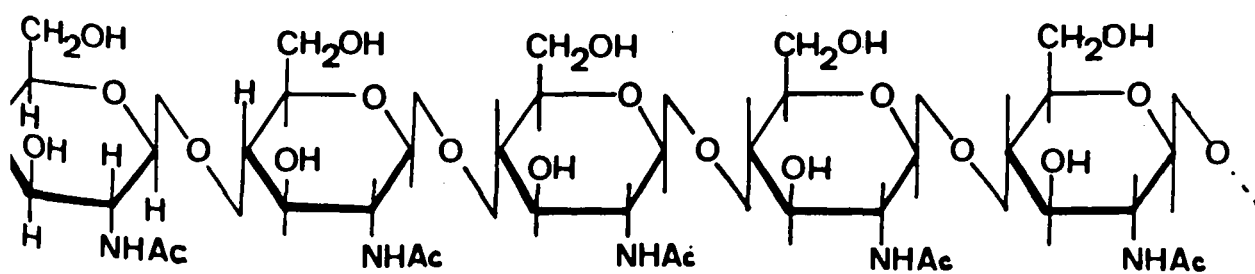
JEANLOZ (50) utilise comme produit de base le méthyl acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside ou le méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 α -D glucopyrannoside, et suit les étapes ci-dessous :

- le groupement hydroxyle porté par le carbone 6 est bloqué sous forme d'éther par le chlorure de trityle.

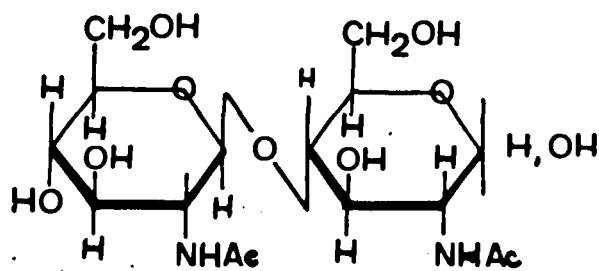
- Le dérivé tritylé est ensuite perméthylé par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent.

- L'élimination du groupement trityle mène à la préparation du méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside.

- L'hydrolyse chlorhydrique du produit ainsi préparé donne le chlorhydrate du di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.



CHITINE



CHITOBIOSE

Figure 3

Représentation graphique de la chitine et du chitobiose.

V. - CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-4,6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

A.- Synthèse directe.

Le méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside est le produit de base qu'utilise JEANLOZ (51) dans la synthèse du di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose. L'auteur suit le chemin réactionnel suivant :

- L'hydroxyle porté par le carbone 3 est estérifié par le chlorure de benzoyle.
- Les hydroxyles portés sur les carbones 4 et 6 sont libérés par une hydrolyse acide sélective.
- Le méthyl O-benzoyl-3 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside est soumis à une méthylation totale.
- L'action du méthanolate de baryum mène à la préparation du méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside.
- Une hydrolyse chlorhydrique fournit le di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

B.- Préparation à partir d'un oside isolé du lait de Femme.

MONTREUIL *et al.* (52) ont identifié le di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose après perméthylation et hydrolyse d'un hexaose isolé du lait de Femme par GRIMMONPREZ (53).

On peut donc envisager d'utiliser ce substrat pour préparer ce dérivé diméthylé, à condition d'en posséder des quantités appréciables.

VI. - CHLORHYDRATE DU O-METHYL-3 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

A.- Synthèse à partir du méthyl acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside.

NEUBERGER (54) substitue les groupements hydroxyles portés par les carbones 4 et 6 du méthyl acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside par un groupement benzylidène, par action du benzaldéhyde en présence de chlorure de zinc.

Le méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside, dissous dans le dioxanne, est méthylé par le sulfate de méthyle en présence de soude.

Le méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside est hydrolysé partiellement par l'acide acétique. L'auteur obtient ainsi le méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside. Ce produit soumis ensuite à l'action de l'acide chlorhydrique donne le chlorhydrate du O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

B.- Synthèse à partir de l'acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

L'acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose est substitué sur les carbones 4 et 6 par un groupement benzylidène, selon le procédé de ROTH et PIGMAN (55). Ce dérivé est ensuite méthylé par le diméthylsulfate en présence de soude et de diméthylsulfoxyde. Après hydrolyse chlorhydrique, les auteurs obtiennent le chlorhydrate du O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

VII. - CHLORHYDRATE DU MONO-O-METHYL-6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

JEANLOZ (56) utilise les réactions suivantes pour préparer le mono-O-méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose à partir du méthyl O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside.

- L'action du chlorure de benzoyle ou de benzyle bloque les hydroxyles portés par les carbones 3 et 4 du dérivé tritylé.

- Une hydrolyse sélective par l'acide acétique libère l'hydroxyle porté par le carbone 6.

- Le produit obtenu est méthylé totalement.

- Le dérivé méthylé soumis à l'action du méthanolate de baryum (dans le cas d'un ester benzoïque) ou de l'éthanolate de sodium (dans le cas d'un éther benzylique), mène à la synthèse du méthyl O-méthyl-6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside.

- L'hydrolyse chlorhydrique de ce dérivé méthylé donne le chlorhydrate du mono O-méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

VIII. - CHLORHYDRATE DU MONO-O-METHYL -4 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

Le méthyl O-tosyl-3 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside est le substrat de base qu'employent JEANLOZ et GANSSER (57) pour synthétiser le méthyl mono-O-méthyl-4 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside. Les auteurs utilisent les réactions suivantes (Fig. 4, p. 22) :

- L'hydroxyle porté par le carbone 6 du dérivé tosylé est bloqué par l'action du chlorure de tosyloxy.

- Le méthyl di-O-tosyl -3,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside est méthylé par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent.

- L'élimination par réduction des groupements tosyloxy du dérivé perméthylé libère le méthyl mono-O-méthyl-4 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside.

- Une hydrolyse chlorhydrique du dérivé méthylé obtenu mène à la synthèse du chlorhydrate du mono-O-méthyl-4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

4. SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES ETHERS METHYLIQUES DE LA GLUCOSAMINE.

La détermination de la structure d'un glycanne par le procédé de perméthylation nécessite la séparation et l'identification des différents constituants méthylés libérés par hydrolyse acide.

I. - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

L'analyse des dérivés méthylés de la glucosamine par chromatographie en phase gazeuse ne peut être envisagée que si la fonction réductrice est substituée ou réduite ; et si le groupement aminé est substitué par N-acétylation par exemple. Mais dans ces conditions, les dérivés sont peu volatils et les séparations sont difficiles. C'est pourquoi, les techniques décrites jusqu'à présent concernent les produits d'acétylation des dérivés méthylés du méthyl acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside (WALLENFELS *et al.* (58)) et les produits d'acétylation des dérivés méthylés de l'acétamido-2 désoxy-2 glucitol (PERRY et WEBB (59)).

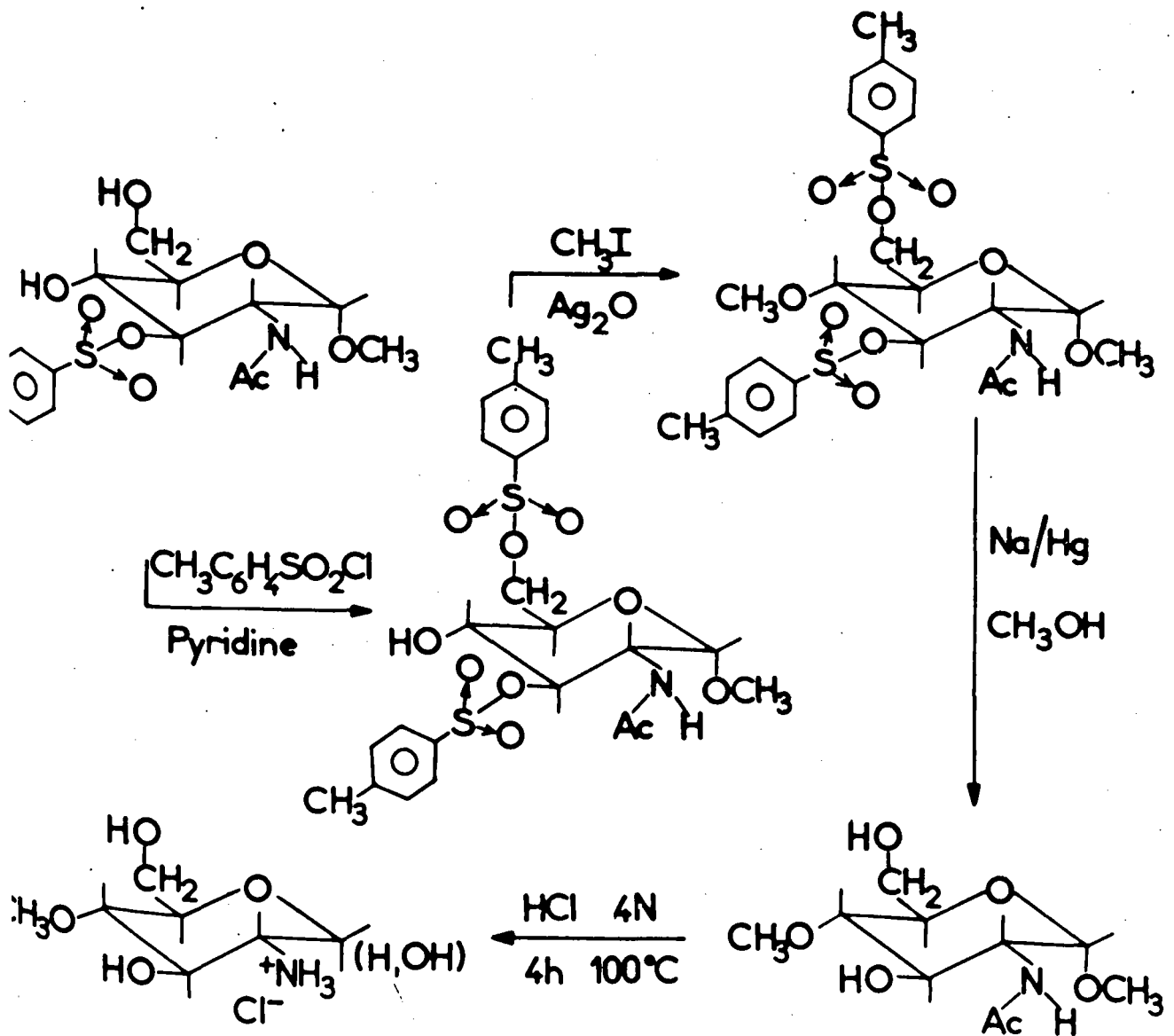


Figure 4

Schéma de synthèse du mono-O-méthyl-4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyranose selon le procédé de JEANLOZ *et al.* (60).

Enfin LLOYD *et al.* (61), afin d'obtenir des dérivés méthylés volatils, transforment les dérivés méthylés de la glucosamine en dérivés méthylés de l'arabinose, par désamination oxydative. L'analyse est alors effectuée sur les produits de triméthylsilylation de méthylsides des dérivés méthylés de l'arabinose.

Ces différents procédés de chromatographie en phase gazeuse sont rassemblés dans le Tableau VI (p. 24).

II. - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.

La technique de chromatographie en couche mince est excellente pour séparer les composés organophiles. Cependant, les méthyl osides se dédoublent en leurs deux anomères comme dans le cas de la chromatographie en phase gazeuse. Cette technique peut être utilisée pour suivre le degré de méthylation des témoins avec le système-solvant de HAY *et al.* (62). Mais ce procédé de chromatographie ne permet pas la séparation des sept couples d'anomères des dérivés méthylés de la glucosamine.

LLOYD, EVANS et FIELDER (63) ont décrit une méthode de séparation des sept éthers méthyliques du désoxy-2 (dinitroanilino-2,4)-2 D-glucopyranose sur couche mince de Kieselgel G dans le système-solvant chloroforme/éthanol (19:1).

III. - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

La chromatographie de partage sur papier est connue pour être une excellente méthode de séparation des composés hydrophiles ; elle convient donc fort bien à l'analyse des oses méthylés rendus hydrosolubles par l'hydrolyse des liaisons osidiques. En outre, dans ces conditions, les deux formes anomériques α et β , qui sont en équilibre, migrent ensemble, ce qui réduit à sept le nombre des dérivés méthylés de la glucosamine. Enfin la présence du groupe-ment aminé libre permet d'identifier sélectivement les dérivés. Le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) préconisé par DANISHEFSKY *et al.* (64) ne permet pas la séparation de tous les dérivés (MONSIGNY (65)).

Chromatographie en phase gazeuse.

PRODUITS	COLONNE	TEMPERATURE	DEBIT du GAZ VECTEUR	AUTEURS
Produits d'acétylation des éthers méthyliques du méthyl acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside	10 % BDSP (*) sur acide silicique	228° C	He 210 ml/mm	WALLENFELDS <i>et al.</i> (66)
Produits d'acétylation des éthers méthyliques de 1'acétamido-2 désoxy-2 glucopyrammitol	10 % NPGSP (**) sur chromosorb	245° C	He 100 ml/mm	PERRY et WEBB (67)
Produits de triméthylsilylation des méthylsides des dérivés méthylés de l'arabinose	15 % BDSP (*) sur célite	150° C	N ₂ 30 ml/mm	LLOYD <i>et al.</i> (68)

(*) BDSP : le polyester de l'acide succinique et du butanediol.

(**) NPGSP : le polyester de l'acide sébacique et du néopentyl-glycol.

IV. - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ECHANGEURS DE CATIONS.

Les dérivés méthylés du chlorhydrate de glucosamine obtenus après hydrolyse chlorhydrique des différents dérivés méthylés peuvent être séparés sur résine échangeuse de cations (MONSIGNY (69)). Dans ces conditions, d'une part, le groupement semi-acétalique est libre, et les deux anomères d'un même dérivé ont la même vitesse de migration ; et d'autre part, le groupement aminé étant libre, il permet une identification sélective des dérivés méthylés de la glucosamine, en évitant les interférences avec les dérivés méthylés des oses neutres. Pour ces raisons, cette méthode paraît être une méthode de choix dans l'analyse des dérivés méthylés de la glucosamine à partir des glucosaminoglycannes perméthylés.

PERRY *et al.* (70) ont séparé les éthers méthyliques de la glucosamine selon un procédé identique.

V. - CONCLUSIONS.

Les recherches effectuées par MONSIGNY (71) sur la séparation des éthers méthyliques de la glucosamine ont montré :

- que la chromatographie en couche mince permet une analyse rapide des isomères méthylés du méthyl acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside, sans toutefois individualiser tous les composés. Elle n'est pas directement applicable à la séparation des osamines libérées par hydrolyse d'un glycanne perméthylé.

- que la chromatographie sur papier permet l'analyse de certains dérivés méthylés de la glucosamine sans modification préalable. Cette technique trouve donc son intérêt soit dans les analyses d'une cinétique de méthylation d'un glycanne, soit dans l'identification des mono-O-méthyl-3 et di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannoses.

- que l'utilisation de la chromatographie sur échangeurs de cations, associée à la chromatographie sur papier, au cas où les mono-O-méthyl-3 et di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannoses sont présents, permet de réaliser la séparation de tous les dérivés méthylés de la glucosamine.

- que la séparation des dérivés méthylés de la glucosamine par chromatographie en phase gazeuse ne peut être envisagée que si la fonction réductrice est substituée ou réduite et la fonction amine N acétylée. Des produits d'acétylation et de triméthysilylation des dérivés méthylés de l'arabino-
se, obtenus par désamination oxydative des dérivés méthylés de la glucosamine, ont pu être séparés par chromatographie en phase gazeuse.

TRAVAUX PERSONNELS

SYNTHÈSE et PRÉPARATION
des
ETHERS MÉTHYLIQUES de la GLUCOSAMINE

Dans ce chapitre, nous exposerons successivement la préparation :

- du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside.
- du benzyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside.
- du tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.
- du di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.
- du di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.
- du di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.
- du mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.
- du mono-O-méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

1. MATERIEL ET METHODES.

I. - SUBSTRATS DE BASE.

Nous avons utilisé le chlorhydrate de la D (+)-glucosamine (Fluka) comme substrat de départ dans toutes nos synthèses.

L'utilisation de la chitine pure (Fluka) nous a permis de préparer deux dérivés méthylés.

II. - PRÉPARATION OU PURIFICATION DES SOLVANTS ET DES MATIÈRES PREMIÈRES.

A. - Benzaldéhyde.

Le Benzaldéhyde pur (U.C.B.) est purifié par distillation sous pression réduite.

E : 179,0° C	sous	760 mm de mercure	
154,1° C	"	400 mm	"
131,7° C	"	200 mm	"
112,5° C	"	100 mm	"
62,0° C	"	10 mm	"
26,2° C	"	1 mm	"

B.- Pyridine anhydre.

Après un reflux de 4 heures sur baryte anhydre, la pyridine est distillée en atmosphère anhydre, et conservée sur potasse.

C.- Toluène pur.

Le toluène commercial est purifié de la façon suivante : un mélange de toluène (1000 ml) et d'acide sulfurique pur R.P. (100 ml) est agité, à 20° C, pendant 24 h. Après décantation, la phase organique est distillée sur chlorure d'aluminium (50 g). Le distillat est lavé une fois avec 500 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium 20 %, puis cinq fois avec 500 ml d'eau distillée. Enfin, le toluène est débarrassé de l'eau par filtration sur papier Whatman n° 3 et est conservé sur chlorure de calcium sec. Il est redistillé avant l'emploi.

D.- Méthanol anhydre.

Le méthanol employé dans les réactions de méthylosidation (p. 51) est déshydraté de la manière suivante :

1 litre de méthanol est chauffé à reflux, pendant 4 heures, en présence de 50 g de tournure de magnésium, puis distillé en atmosphère anhydre et conservé dans des flacons bien bouchés.

E.- Ether éthylique anhydre et sans peroxyde.

L'éther éthylique commercial (5 l) est maintenu pendant une semaine sur du chlorure de calcium anhydre ; on effectue cette opération trois fois en changeant à chaque fois le chlorure de calcium. L'éther est ensuite siphonné puis abandonné sur sodium pendant une semaine au moins. Cette dernière opération permet d'éliminer les dernières traces d'eau et de détruire les peroxydes présents dans l'éther éthylique.

F.- Oxyde d'argent.

L'oxyde d'argent utilisé dans les réactions de KOENIGS et KNORR (p. 51) est préparé extemporanément à l'abri de la lumière. La baryte hydratée (100 g) est dissoute dans 1 l d'eau chaude. Cette solution est filtrée à chaud ; le filtrat est additionné lentement à une solution chaude de nitrate d'argent

(100 g dans 500 ml d'eau). Le précipité formé est recueilli sur Buchner, et est lavé abondamment à l'eau bouillante jusqu'au moment où le filtrat ne donne plus de précipité de sulfate de baryum par addition d'acide sulfurique. L'oxyde d'argent ainsi préparé est séché à l'étuve sous vide à 50° C.

G.- Méthanolate de sodium.

Le méthanolate de sodium utilisé dans les réactions de O-désacétylation ou de O-débenzoylation est préparé de façon extemporanée en dissolvant des copaux de sodium (0,5 g) dans du méthanol anhydre (100 ml).

III.- TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES.

A.- Chromatographie en couche mince.

La technique de chromatographie en couche mince est excellente pour séparer des composés organophiles.

a) Préparation des plaques :

A 30 g de Silicagel G (MERCK), on ajoute 60 ml d'eau. La suspension obtenue est agitée énergiquement pendant 3 minutes, puis est coulée, à l'aide d'un étaleur (DESAGA), sur des plaques de verre préalablement lavées à l'eau distillée et essuyées avec du papier filtre. Les plaques sont activées par chauffage à 110° C pendant 30 minutes.

b) Système - solvants :

La chromatographie est effectuée dans des cuves en verre à base rectangulaire (8 x 22 cm) contenant 100 ml de l'un des système-solvants suivants, par exemple :

- . Chloroforme/méthanol (9:1)
- . Benzène/méthanol/chloroforme (92:8:2)
- . Benzène/éthanol/eau/acide acétique (200:47:15:1)

(HAY, LEWIS et SMITH (72)).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a migré de 15 cm.

c) Révélation :

Tous les composés organiques d'un chromatogramme sur couche mince de silice, peuvent être révélés par pulvérisation d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 %, suivie d'un chauffage à 120° C pendant 15 mn.

B.- Chromatographie et électro-chromatographie sur papier.

Les composés hydrophiles ont été analysés par chromatographie descendante ou par électro-chromatographie sur papier WHATMAN n° 3.

a) Système-solvant ; système-tampon :

En chromatographie, nous avons généralement utilisé la phase supérieure du système-solvant biphasique de PARTRIDGE (73) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

En électrophorèse à 400 V pendant 18 h, nous avons utilisé le système-tampon pH 3,9 pyridine/acide acétique/eau (3:10:387) (MICHL (74)).

b) Révélation :

La révélation des osamines peut être effectuée de diverses façons, en tirant parti :

- soit de la fonction réductrice, on utilise alors le réactif de PARTRIDGE (75) à l'oxalate d'aniline.
- soit de la présence de la fonction amine, on utilise alors un réactif à la ninhydrine.
- soit de la présence d'un groupement α glycol ou α amino alcool, on utilise alors le réactif à l'acide periodique et à la benzidine.
- soit des propriétés particulières des osamines, on utilise alors la réaction d'ELSON et MORGAN.
- soit des propriétés particulières des N-acétyl-osamines en milieu alcalin, on utilise alors, après N-acétylation la réaction d'EHRlich "indirecte".
- soit du groupement acétamido dans les N-acétylosamines, on utilise le réactif de RYDON et SMITH (76).

α - Révélation des osamines par l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (77)

Les chromatogrammes sont imprégnés du réactif obtenu en mélangeant :

- 2 vol. d'une solution éthanolique d'aniline à 2 % (v:v).
- 3 vol. d'une solution aqueuse d'acide oxalique à 25 % (p:v) et chauffés à l'étuve à 105° C pendant 2 à 20 mn. Les osamines donnent une coloration spécifique brune.

β - Révélation des osamines par la ninhydrine :

Le réactif (solution à 1 g de ninhydrine dans 94 ml d'acétone et 6 ml d'acide acétique) est finement pulvérisé sur le chromatogramme qui est ensuite maintenu à 100° C pendant 5 à 15 mn. L'emplacement des composés aminés est marqué par l'apparition de taches rouge-violacé. Cette coloration est instable et pour conserver les chromatogrammes, on pulvérise le réactif de KAWEREAU (78) obtenu en mélangeant 1 ml de solution aqueuse saturée de nitrate cuivrique, 0,2 ml d'acide nitrique à 10 % dans l'eau et 500 ml d'éthanol absolu. Les taches rouge-violacé virent au rouge brique, par formation d'oxyde cuivreux inaltérable.

γ - Révélation des α glycols ou α amino alcools par le réactif periodique - benzidine :

Le chromatogramme est révélé selon le procédé de MONTGOMERY et WU (79). Le papier est trempé rapidement dans une solution acétonique d'acide periodique fraîchement préparée (107 mg de NaIO_4 dissous dans 4 ml d'eau et 1 ml d'acide acétique ; la solution obtenue est complétée à 100 ml avec de l'acétone fraîchement distillée). Après 5 minutes exactement de séchage à la température de la pièce, le papier est trempé dans une solution préparée extemporanément de benzidine dans l'acétone (1,5 g p. 100 ml). L'emplacement des α glycols est révélé par l'apparition de taches blanches sur fond uniformément bleu.

δ - Révélation des osamines par la réaction d'ELSON et MORGAN :

Nous avons utilisé le réactif de PARTRIDGE (80) : pulvérisation d'une solution alcaline d'acétylacétone (obtenue en mélangeant 1,5 ml d'acétylacétone et 50 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium cristallisé (17 g p. 100 ml, séchage à 105° C, pendant 5 mn, puis pulvérisation d'un réactif d'EHRlich modifié (obtenu en dissolvant 1 g de p-diméthylamino-benzaldéhyde dans 240 ml d'un mélange de n-butanol, d'éthanol et d'acide chlorhydrique concentré dans les proportions (6:1:1) et enfin séchage à 90° C pendant 5 à 10 mn. Les osamines apparaissent sous forme de taches violacé-mauve.

ε - Révélation des osamines N-acétylées par la réaction d'HERLICH indirecte :

Les N-acétylosamines se cyclisent en milieu alcalin en donnant 3 chromogènes qui ont été identifiés par STANLEY (81) et KUHN et KRUGER

(82). Cette cyclisation n'est possible que si l'hydroxyle du carbone 4 est libre. Cette réaction est donc intéressante pour différencier les dérivés non méthylés sur le carbone 4 des dérivés méthylés en 4. Les chromogènes formés donnent, par condensation avec le p. diméthylaminobenzaldéhyde, une coloration pourpre caractéristique.

ζ - Révélation de la fonction amide des N-acétyl osamines par le réactif de RYDON et SMITH (83) :

Le chromatogramme est placé pendant 2 heures dans une atmosphère saturée en chlore (obtenue en faisant réagir de l'acide chlorhydrique sur du permanganate de potassium). Après une ventilation de 2 heures dans un courant d'air frais, le papier est imprégné par pulvérisation d'une solution obtenue en mélangeant extemporanément à volumes égaux, une solution aqueuse d'iodure de potassium à 2 % et une solution aqueuse de thiodène à 2 %. L'emplacement des composés possédant une fonction amide (cas de N-acétyl osamines) se révèle par formation de taches brunes sur fond blanc. Ces taches sont fugaces et il convient de les délimiter très rapidement.

C.- Chromatographie d'adsorption sur colonne de charbon/célite.

a) Les adsorbants :

Le charbon Activit 50 X L est lavé plusieurs fois à l'eau distillée par décantation pour éliminer les particules trop fines. Le charbon est traité en colonne par l'acide chlorhydrique concentré puis par l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'éluat ; il est enfin séché à l'air libre. Ce traitement à l'acide chlorhydrique désactive partiellement le charbon, ceci permet de limiter les adsorptions irréversibles.

La célite n° 535 est lavée plusieurs fois par décantation avec de l'eau distillée, puis elle est séchée à l'air libre.

b) Montage de la colonne :

Le mélange à poids égaux de charbon et célite est introduit sous forme d'une pâte épaisse dans une colonne de verre (40 x 4 cm). L'extrémité inférieure de la colonne est fermée par un tampon de laine de verre recouvert d'une fine couche de "ballotine" de telle façon que le volume mort soit le plus petit possible. La colonne ainsi montée est lavée avec de l'eau distillée de manière à bien tasser le support chromatographique.

c) Développement de la chromatographie :

Une solution aqueuse de glucides à 1 % est appliquée au sommet de la colonne. On utilise 150 ml du mélange de charbon/célite pour 1 g de glucides. Les glucides sont alors déplacés par le passage des mélanges eau-alcool de concentration alcoolique croissante.

D.- Chromatographie d'adsorption sur colonne de silice.

a) L'adsorbant :

On utilise directement le silicagel purifié MERCK (70-325 "mesh ASTM").

Dans un bécher de 1000 ml on met en suspension sous agitation énergique 300 ml de silicagel dans 500 ml de solvant.

b) Montage de la colonne :

Le gel de silice est introduit dans une colonne de verre (80 x 3 cm). L'extrémité inférieure de la colonne est fermée par un tampon de laine de verre de telle façon que le volume mort soit le plus petit possible. Le support chromatographique est tassé par passage de solvant pendant une nuit. Tous les tubes capillaires utilisés sont en téflon, afin d'éviter les réactions secondaires dues aux solvants organiques.

c) Développement de la chromatographie :

1 g de substance à purifier, dissous dans le minimum de solvant (5 à 10 ml), est injecté en haut de la colonne. Les produits sont élués par le solvant choisi avec un débit de 2 ml/mn ; puis fractionnés tous les 5 ml.

E.- Chromatographie à l'auto-analyseur TECHNICON.

Les osamines méthylées peuvent être séparées par chromatographie sur colonne d'échangeur de cations (MONSIGNY (84)).

a) Colonne :

Nous utilisons la colonne (*) de chromatographie pour l'analyse des acides aminés. La résine est régénérée avant l'emploi par passage de soude 0,2 N. La colonne est stabilisée avec le tampon pH 3,1.

(*) Colonne (0,6 x 65 cm) remplie de résines polystyrène sulfonée type Dowex 50 W X 8, diamètre des particules $16 \pm 1\mu$.

b) Eluant :

L'élution est réalisée par le passage d'un gradient de force ionique dont la composition est précisée dans le Tableau VII (p. 36).

c) Réactif d'ELSON et MORGAN adapté à l'auto-analyseur TECHNICON par MONSIGNY (85) :

- Solution tamponnée d'acétylacétone :

Acétylacétone 7 ml
Solution de phosphate monosodique 0,66 M 100 ml

Cette solution est stable pendant 24 h.

- Solution de soude 1,66 M.

- Solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde :

p-diméthylaminobenzaldéhyde 3,2 g
Ethanol 210 ml
HCl pur R.P. 30 ml

Cette solution est préparée extemporanément.

Dans la figure 5 (p. 37), nous avons schématisé le dispositif d'auto-analyse que MONSIGNY a mis au point et qui permet d'effectuer les dosages simultanés par le réactif à la ninhydrine (dans les conditions proposées par la firme TECHNICON) et par le réactif d'ELSON et MORGAN modifié.

IV.- TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES.

A.- Spectroscopie Infra-Rouge.

a) Intérêt :

Les spectres Infra-Rouge des oses et osides sont extrêmement complexes et leur interprétation complète n'est pas possible. Cependant ils présentent un grand intérêt :

- pour identifier les sucres : le spectre constitue une sorte de "carte d'identité".
- pour déceler la présence d'un grand nombre de groupements fonctionnels.
- pour déterminer une structure, une configuration ou même une conformation.

TABLEAU VII

Composition du gradient P-OSA-15 permettant la séparation des dérivés méthylés de la glucosamine (colonne de 0,6 x 65 cm).

COMPARTIMENT	pH 2,875 (*)	Na Cl (**)
1	40	-
2	40	-
3	40	-
4	37,5	2,5
5	37,5	2,5
6	35	5
7	35	5

(*) Solution de citrate trisodique 0,2 M ajusté à pH 2,875 avec l'acide chlorhydrique pur R.P.

(**) Solution à 35 g de Na Cl dans 100 ml d'eau distillée.

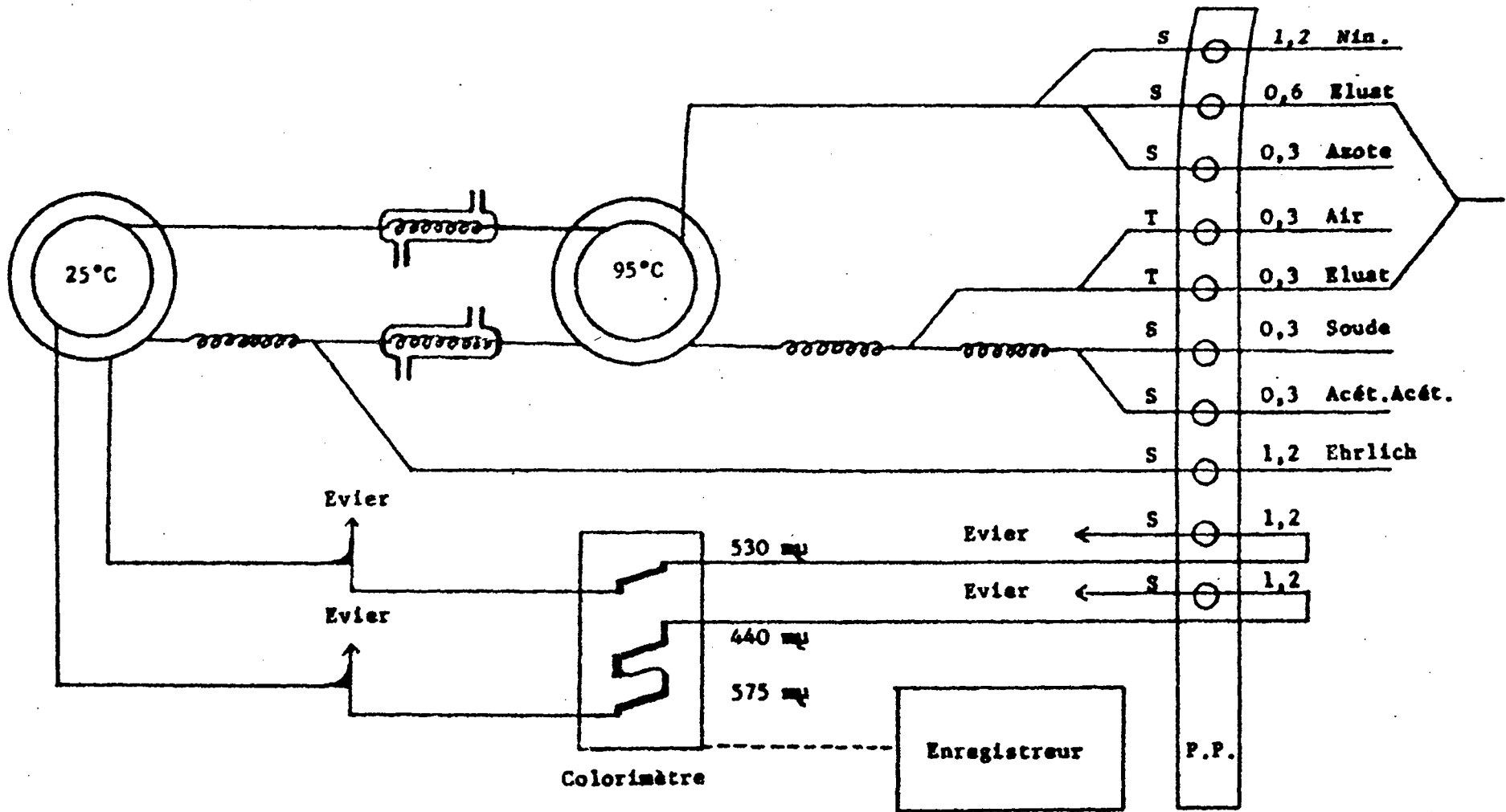


Figure 5

Schéma de dispositif automatique, adapté à l'auto-analyseur d'acides aminés, de dosage simultané
 1) des acides aminés et des osamines par le réactif à la ninhydrine et 2) des osamines seules par
 le réactif d'ELSON-MORGAN modifié. S : tubes de "Solvaflex" ; T : tubes de "Tygon" ; P.P. : pompes
 péristaltiques. Les nombres précisent le débit des fluides en ml p. mm.

b) Applications :

Nous utiliserons la spectroscopie Infra-Rouge, essentiellement pour identifier les groupements fonctionnels ; il est en effet facile de suivre l'évolution d'une réaction chimique, comme par exemple le blocage d'un hydroxyle sous forme d'ester benzoïque, ou la substitution d'une amine ou d'un amide.

Les différentes fréquences d'absorption Infra-Rouge concernant la chimie des sucres (oscillations de valence et de déformation, voir figure 6 p. 39) sont réunies dans le Tableau VIII (p. 40).

Etudions par exemple le spectre I.R dans le Nujol (*) du benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-gluco-pyranoside (Fig. 7, p. 41).

. Nous n'observons pas de bande d'absorption vers $3700-3500 \text{ cm}^{-1}$; il n'y a donc pas de groupement hydroxyle libre.

. $\lambda = 3340 \text{ cm}^{-1}$ bande d'absorption (valence) possible d'une liaison N-H dans un amide. Notre hypothèse se confirme par la présence des bandes d'absorption à 1660 cm^{-1} (amide I, ou C=O valence) et à 1535 cm^{-1} (amide I, ou N-H déformation et C-N valence).

. $\lambda = 1740 \text{ cm}^{-1}$ vibration caractéristique d'une liaison C=O ester.

. La présence d'un groupement aromatique se manifeste par les bandes d'absorption suivantes :

$3060 \text{ cm}^{-1} = \text{C-H}$ vibration de valence.

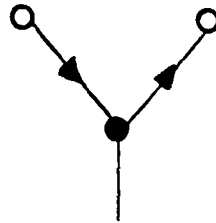
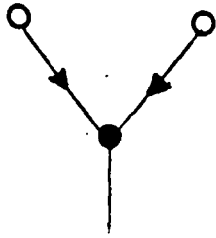
740 et $695 \text{ cm}^{-1} = \text{C-H}$ déformation hors du plan.

En résumé, l'analyse en I.R du glucosaminide utilisé nous confirme :

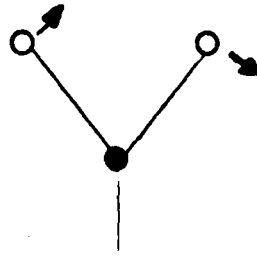
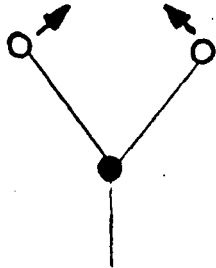
- que tous les hydroxyles sont bloqués, probablement sous forme d'ester.
- qu'une liaison amide $\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{N} - \text{C} \\ | \\ \text{H} \end{array}$ est présente.
- que l'osamine peut être substituée par un groupement aromatique.

(*) Le Nujol est une paraffine liquide qui présente en spectroscopie I.R. quatre bandes d'absorption importante à $2940, 2860, 1460$ et 1380 cm^{-1} .

- Oscillations de Valence :

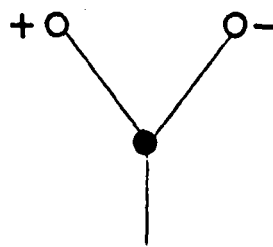
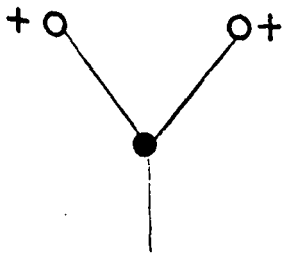


- Oscillations de déformation :



cisaillement
"bending"

rotation plane
"rocking"



balancement
"wagging"

torsion
"twisting"

Figure 6

Modes de vibration correspondant à l'énergie d'une radiation Infra-Rouge pour une molécule triatomique.

TABLEAU VIII

Quelques fréquences caractéristiques d'absorption Infra-Rouge.

1°/ Oscillations de Valence ("Stretching vibrations").

A. Liaison du type A-H :	2400-3800 cm ⁻¹
1. a. O-H (libre)	3500-3700 cm ⁻¹
b. OH (lié)	3100-3500 cm ⁻¹
2. a. N-H (libre)	3200-3500 cm ⁻¹
b. N-H (lié)	3100-3500 cm ⁻¹
c. NH ₂	3200-3300 cm ⁻¹
3. C-H	3200-3300 cm ⁻¹
4. S-H	2800-2900 cm ⁻¹
B. Liaison C-O éther	1060-1150 cm ⁻¹
C. Liaison du type A=B	
1. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} = \text{C} \\ \diagdown \end{array}$	1600-1700 cm ⁻¹
2. -C ≡ C-	1960-2350 cm ⁻¹
3. -C ≡ N	2260-2240 cm ⁻¹
4. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} = \text{O} \\ \diagdown \end{array}$	1550-1850 cm ⁻¹
a. anhydride	1800-1850 cm ⁻¹
b. carbonyle	1760-1800 cm ⁻¹
c. ester	1725-1750 cm ⁻¹
d. aldéhyde ou cétone	1650-1725 cm ⁻¹
e. amide	1625-1700 cm ⁻¹
5. S = O	
a. ester sulfonique	1145-1200 cm ⁻¹
	1330-1420 cm ⁻¹
b. sulfoxyde	1040-1060 cm ⁻¹
c. ester sulfurique	1150-1230 cm ⁻¹
	1350-1440 cm ⁻¹
6. N = O	
ester nitrique	1250-1300 cm ⁻¹
	1600-1650 cm ⁻¹

TABLEAU VIII (suite)

Quelques fréquences caractéristiques d'absorption Infra-Rouge.

2°/ Oscillations de déformation

A. Liaison du type A-H : cisaillement ("bending")

1.	a.	-NH ₂	1590-1650 cm ⁻¹
	b.	-NH- (amide)	1525-1575 cm ⁻¹
2.	a.	-CH ₂ - (saturé)	1425-1475 cm ⁻¹
	b.	-CH ₃	1350-1400 cm ⁻¹
	c.	-O-H	1050-1075 cm ⁻¹

B. Liaison du type A-H : déformation hors du plan ("out of plane")

C - H aromatique	690-770 cm ⁻¹
------------------	--------------------------

C. Liaison -C-H carbone anomérique

équatorial	844 ± 8 cm ⁻¹
axial	891 ± 7 cm ⁻¹

(Les fréquences sont exprimées en cm⁻¹ (nombre d'onde 1/λ) : 500 cm⁻¹ correspond à 20 μm).

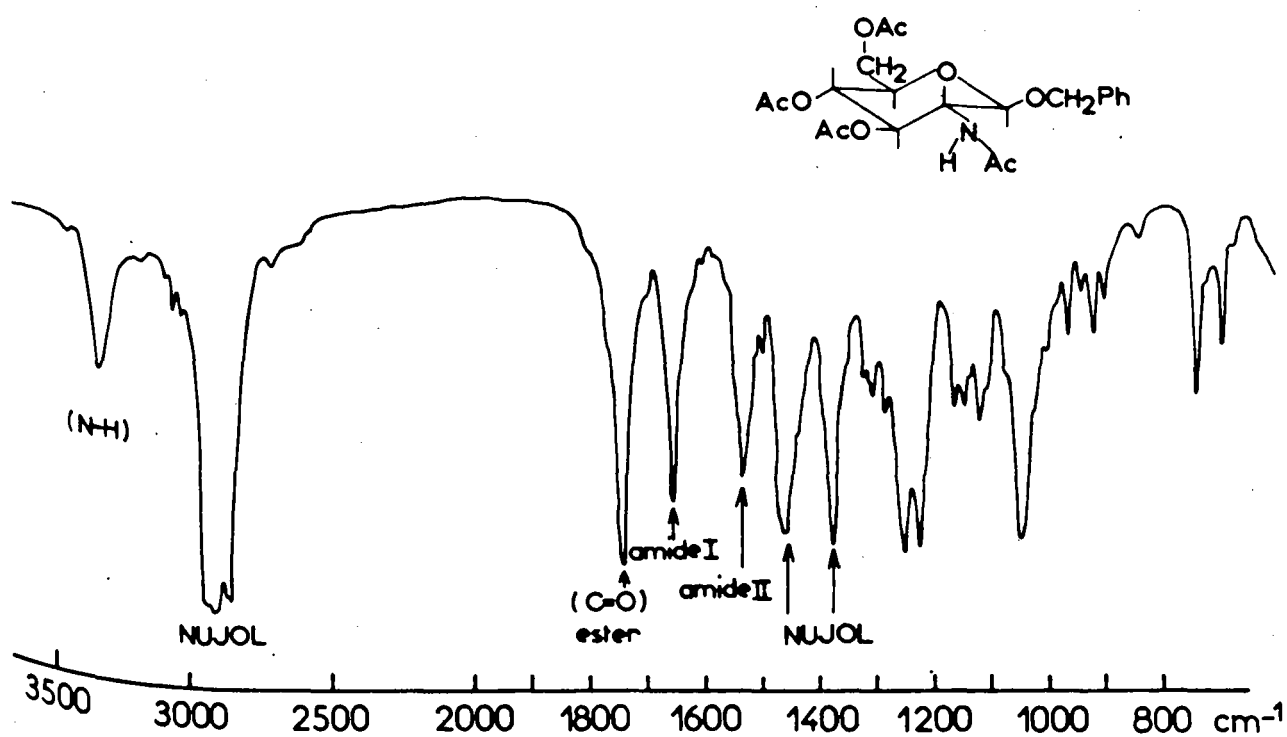


Figure 7

Spectre Infra-Rouge dans le nujol du Benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 déoxy-2 β-D-glucopyranoside.

B.- Résonance magnétique nucléaire.

a) Intérêt :

La résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) s'applique essentiellement aux composés hydrogénés, c'est ce que l'on appelle communément la résonance magnétique protonique (R.M.P.). Notons qu'il est possible d'effectuer de la R.M.N. sur ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , ^{17}O , ^{13}C , ces noyaux possédant un moment magnétique nucléaire.

Le spectre R.M.N. d'un sucre permet de disposer un maximum d'hydrogènes sur sa chaîne carbonée. En effet la fréquence d'absorption dépend de l'environnement chimique des noyaux, en conséquence des atomes d'hydrogène possédant un environnement chimique différent dans une molécule, donneront une série de pics d'absorption (*) représentant le squelette hydrogéné de la molécule. L'aire de chaque pic est proportionnelle au nombre d'hydrogènes présents dans une situation équivalente.

Ainsi l'étude d'un sucre en R.M.N. permet de compléter nos connaissances sur sa structure et sa conformation. C'est une méthode complémentaire de la spectroscopie Infra-Rouge.

En outre, lorsque deux protons sont liés sur des atomes voisins, il apparaît plusieurs fréquences de résonance, dues au couplage des protons (**). Le nombre de pics dépend du nombre de protons liés sur l'atome voisin.

b) Applications :

Le tableau IX (p. 43) réunit quelques valeurs de τ rencontrées dans la chimie des sucres.

Voyons ce que peut nous apporter la R.M.N. dans l'établissement de la structure du benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranoside (Fig. 8, p. 44).

(*) Le déplacement de la fréquence de résonance appelé déplacement chimique " δ " est mesuré à partir de la fréquence de résonance d'un témoin (tétraméthylsilane) et est exprimé en p.p.m. $\tau = (10 - \delta)$.

(**) Dans ce cas, la distance qui sépare 2 pics (dus à un phénomène de couplage) est exprimée en Hertz et appelée Constante de couplage.

TABLEAU IX

Quelques valeurs de τ rencontrées dans la chimie
des sucres.

Valeurs de τ	Groupements organiques
τ 2,6 à 2,8	Protons d'un noyau aromatique
τ 6,1 à 6,8	Protons d'un groupement méthoxyle
τ 6,6 à 7,9	Protons d'un groupement N-méthyle
τ 7,6 à 8,2	Protons d'un groupement acétamido
τ 7,9 à 8,0	Protons d'un groupement acétyle

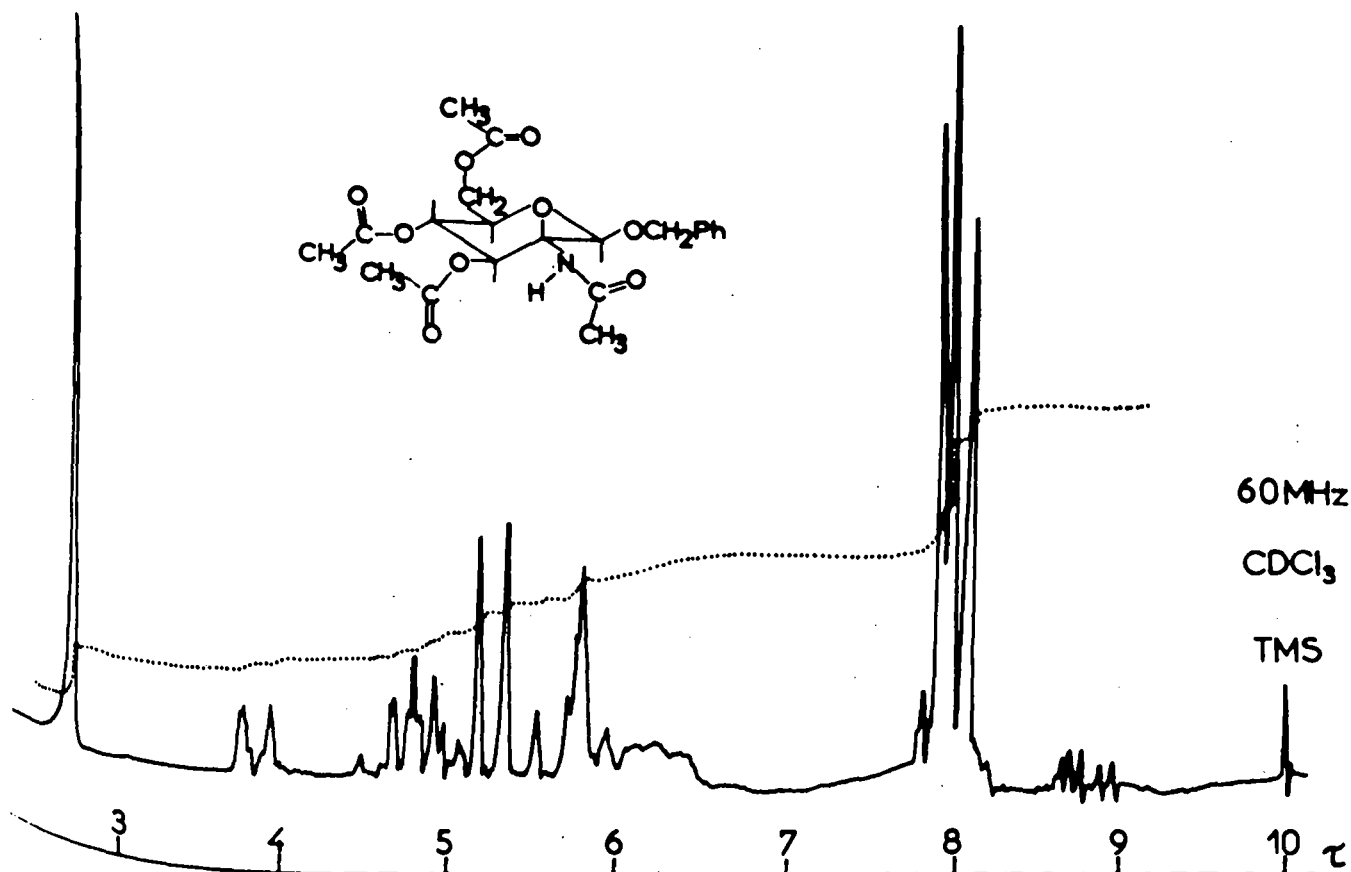


Figure 8

Spectre en R.M.N à 60 MHz dans le CDCl₃ du benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyranoside.

R.M.N. à 60 MHz, référence TMS, solvant CDCl₃.

- τ 2,68 (1 singulet, 5 protons), on a donc un noyau aromatique (*).
- τ 7,92 (1 singulet, 3 protons), il s'agit du CH₃ d'un groupement acétyle.
- τ 8,00 (1 singulet, 6 protons), ce pic est relatif à 2 groupements acétyles.
- τ 8,12 (1 singulet, 3 protons), ce sont les hydrogènes du CH₃ du groupement acétamido.
- τ 3,87 (1 doublet J = 8 Hz, 1 proton). Ce doublet caractérise le proton anomérique en position axiale, c'est-à-dire qu'il s'agit d'un anomère β.

Cette analyse en R.M.N. nous apprend donc que le sucre étudié :

- est un anomère β.
- qu'il possède trois groupements acétyles et un groupement acétamido.
- qu'il est substitué par un groupement aromatique (benzyle).

CONCLUSIONS

Sachant que le produit étudié provient de l'action de l'alcool benzylique sur le chloro-1 désoxy-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α-D-glucopyrannose (voir p. 55), les analyses en I.R et en R.M.N permettent de conclure que le produit isolé est le benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside.

La spectroscopie I.R et la spectroscopie R.M.N sont deux méthodes d'investigation complémentaires pour déterminer la structure d'un produit.

V.- DETERMINATION DES CONSTANTES PHYSIQUES.

A.- Point de fusion.

Les points de fusion des produits isolés sont pris sur un banc chauffant "Kofler" ou pour plus de précision à l'aide d'un microscope à platine chauffante LEITZ.

(*) Le déplacement chimique $\delta = 10 - 2,68 = 7,32$ ppm. On n'observe qu'un seul pic dont la surface correspond à 5 H₃. Chaque proton est dans ce cas considéré comme ayant un environnement équivalent (même fréquence de résonance), et le couplage est trop faible pour être visible dans les conditions utilisées.

B.- Pouvoir rotatoire.

Les mesures des pouvoirs rotatoires sont effectuées à l'aide d'un polarimètre photoélectrique ZEISS.

VI.- O-DESACETYLATION PAR LA SOUDE.

A.- Principe.

Les dérivés peracétylés doivent être O-désacétylés pour être analysés en chromatographie de partage sur papier ; car cette technique ne se prête pas à la séparation des composés organophiles.

La O-désacétylation s'effectue par l'action d'une solution de soude 0,08N à 4°C sur un glucide peracétylé (voir à ce sujet les travaux de BAYARD (86)).

B.- Mode opératoire.

Un dérivé peracétylé (10 mg) est repris par 5 ml d'acétone. A la solution refroidie à 4° C, on ajoute 20 ml d'une solution de soude 0,1 N elle-même refroidie. Après 30 minutes d'agitation à 4° C, on additionne deux gouttes de phénol phtaléine, la solution vire au rouge carmin. La neutralisation s'effectue par addition de 2 à 4 ml de résine Dowex 50 x 8 ('mesh 25-50, H⁺) ; le pH neutre est atteint lorsque la solution est totalement décolorée. On filtre sur verre fritté. Le filtrat est évaporé en capsule sous air sec.

2. PREPARATIONS.

I.- SYNTHÈSE DU MÉTHYL ACÉTAMIDO-2 DESOXY-2 β-D-GLUCOPYRANNOSE.

A.- Principe.

La synthèse du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside s'effectue selon le chemin réactionnel suivant (Fig. 9 ; p. 47) :

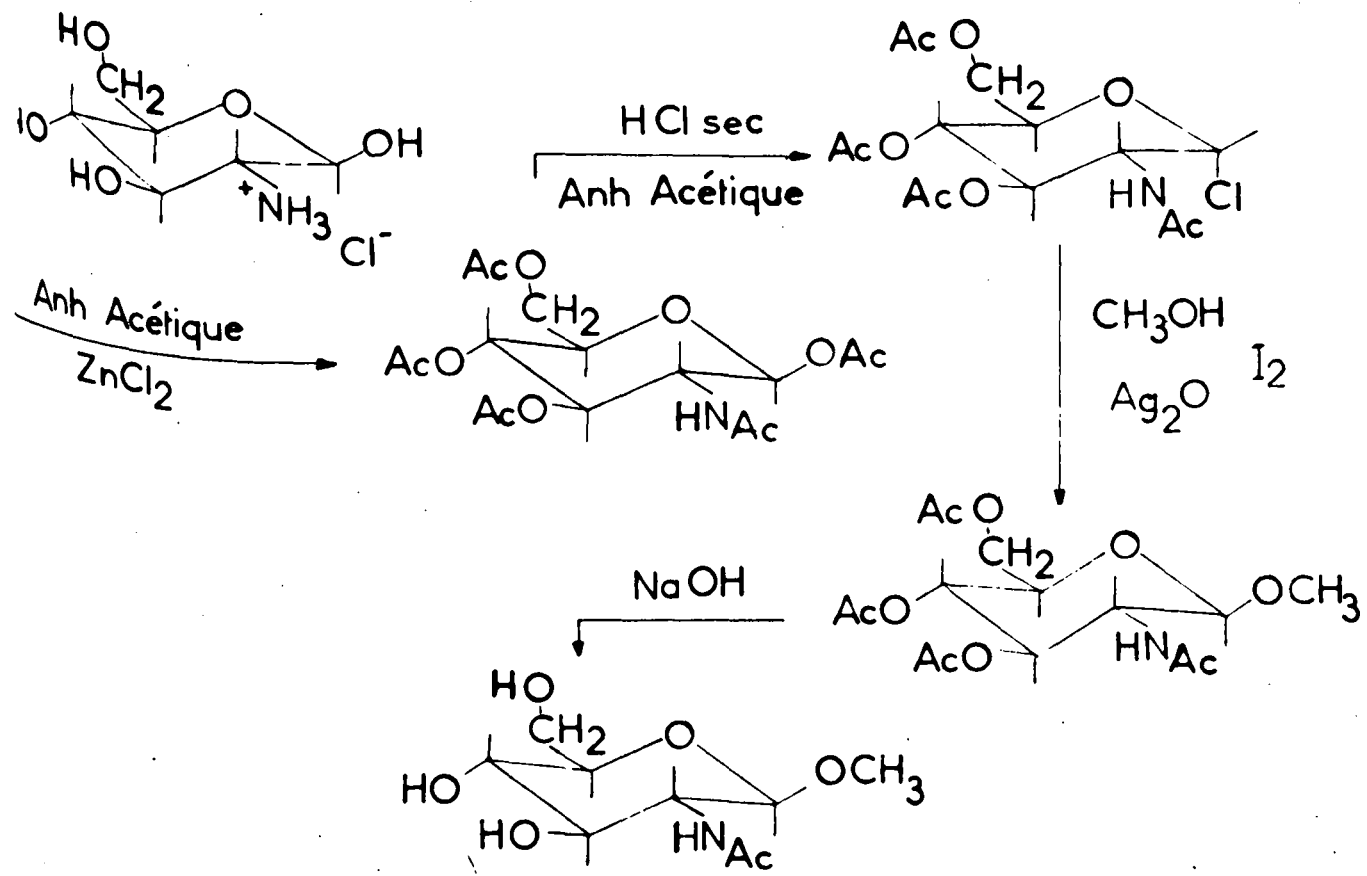


Figure 9

Schéma de synthèse du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside.

- Synthèse de l'anomère β du tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2-D-glucopyrannose (O-peracétyl N-acétyl D-glucosamine).

- Passage à l'anomère α du chloro-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2-D-glucopyrannose (α -chloro O-peracétyl N-acétyl glucosamine).

- Synthèse du méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside par condensation de l' α -chloro O-peracétyl N-acétyl glucosamine avec le méthanol anhydre.

- La O-désacétylation du méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside mène à la préparation du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside.

B.- Procédés.

a) Préparation du tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose :

1. Principe.

La glucosamine est peracétylée par l'anhydride acétique en présence de chlorure de zinc, selon le procédé de JONES *et al.* (87) modifié par MONSIGNY (88).

2. Mode opératoire.

50 g de chlorure de zinc anhydre finement pulvérisé, sont dissous dans 320 ml d'anhydride acétique, en maintenant la température du bain-marie à 45° C. A la solution obtenue, on ajoute, en 30 minutes environ, de façon continue, et en laissant la température s'élever à 55-60° C, 60 g de chlorhydrate de glucosamine finement pulvérisé et préalablement séché sous vide. Après complète dissolution, la température du mélange est portée, au bain-marie, à 90° C, jusqu'à l'apparition d'une teinte légèrement brune (5 à 10 mn). La solution, refroidie à 60° C, est versée sous agitation continue, sur un mélange de glace pilée (750 ml) et de bicarbonate de sodium (390 g). La température atteint alors -10° C environ. La précipitation de la peracétyl-glucosamine commence à ce stade. On laisse reposer le mélange pendant 18 h à 4° C. Le précipité blanc formé est recueilli sur un entonnoir de Büchner, et dissous dans le minimum de chloroforme. La phase organique est lavée 2 fois avec un volume égal d'eau distillée à 4° C et déshydratée par agitation avec du sulfate de magnésium anhydre. Elle est ensuite concentrée à faible volume. La peracétyl-glucosamine est finalement reprécipitée par addition d'éther de pétrole.

3. Résultats.

La peracétyl-glucosamine préparée est homogène en chromatographie sur couche mince de Silicagel G, dans le système-solvant benzène/méthanol/chloroforme (92:8:2).

Rendement 61 % ; $(\alpha)_D^{24}$ exp + 12° (cl dans le chloroforme) ;
F 147° C. Selon LEABACK et WALKER (89) : $(\alpha)_D^{20}$ + 1,0° (cl dans le chloroforme) ;
F 187° C ; selon JONES *et al.* (90) : $(\alpha)_D^{25}$ + 3° (cl dans le chloroforme) ;
F 192° C ; pour le tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranose.

Analyse en I.R dans le nujol :

$\lambda_{\text{KBr Max}}$ 3260 (N-H), 1745 (C=O, acétyl), 1660 (amide I), 1550 (amide II), 1240 (C-O, acétyl), 890 (C-H axial, anomérie β), 3070, 1305, 1115, 1070, 1040, 950, 915 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 60 MHz : référence TMS, solvant CDCl_3 .

τ 4,25 (doublet : J = 8,5, 1 proton, anomérie β)
 τ 4,81 (multiplets : 3 protons), τ 5,83 (multiplets : 4 protons), τ 7,90 (singulet : 3 protons, 1 acétyl), τ 7,93 (singulet : 3 protons, 1 acétyl), τ 7,98 (singulet : 6 protons, 2 acétyl), τ 8,10 (singulet : 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

Les analyses en R.M.N et en I.R du produit isolé nous confirment la présence de quatre groupements acétyles et d'un groupement acétamido ; il s'agit donc bien du tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyranose à forte proportion d'anomère β .

b) Préparation du chloro-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyranose :

1. Principe.

Le chloro-1 tri-O-acétyl acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyranose est préparé selon le procédé de LEABACK et WALKER (91) par l'action de l'acide chlorhydrique sec sur le tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranose dans l'anhydride acétique.

2. Mode opératoire.

40 g de O-peracétyl N-acétyl β -D-glucosamine sont suspendus dans 200 ml d'anhydride acétique. Dans le mélange maintenu à 0° C, on fait passer un courant d'acide chlorhydrique gazeux sec jusqu'à dissolution complète du produit. La solution est maintenue à la température du laboratoire pendant 16 h, puis additionnée de 500 ml de chloroforme. Le mélange refroidi est extrait avec deux volumes d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium ajoutée par petites portions, en refroidissant le mélange sous un courant d'eau froide après chaque addition. La solution chloroformique est ensuite lavée deux fois avec de l'eau glacée, séchée sur sulfate de magnésium calciné, décolorée par le charbon et concentrée sous pression réduite. On obtient un sirop qui, extrait avec de l'éther anhydre sans peroxyde, abandonne des cristaux blancs. On recueille ainsi 15 g de produit après séchage à l'étuve sous vide à 50° C.

3. Résultats.

Le chloro-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannose obtenu est homogène en chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant benzène/méthanol/chloroforme (92:8:2). $(\alpha)_D^{24}$ exp + 119° (cl dans le chloroforme), F exp 133° C [décomposé] ; $(\alpha)_D^{18}$ th + 118° (cl dans le chloroforme), F 133-134° C [décomposé] selon LEABACK et WALKER (92).
Rendement 40 %.

Analyse en I.R dans le nujol :

$\lambda_{\text{KBr}}^{\text{Max}}$ 3240 (NH), 1730 (c = O, acétyl), 1645 (amide I), 1545 (amide II), 1240 (c - o, acétyl), 821 (C - H équatorial, anomérie α), 3450, 3040, 1280, 1120, 1060-1030, 910, 890, 875, 760, 720 cm^{-1} .

4. Conclusion.

L'analyse en I.R confirme que l'acide chlorhydrique anhydre sur le tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannose produit sélectivement l'anomère α du chloro-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose. La réaction s'effectue avec une inversion de WALDEN, c'est probablement une substitution nucléophile d'ordre 2.

c) Préparation du méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le méthanol anhydre est condensé sur le chloro-1 désoxy-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α-D-glucopyrannose en présence d'oxyde d'argent et d'iode.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

20 g de driérite desséchée, 6 g d'oxyde d'argent anhydre fraîchement préparé et 10 mg d'iode sont mis en suspension dans 50 ml de méthanol anhydre. Le mélange est agité une heure à température ambiante, à l'abri de la lumière. On ajoute ensuite 5 g de chloro-1 désoxy-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α-D-glucopyrannose dissous dans 10 ml de benzène. On agite une semaine et on laisse reposer le mélange une semaine à température ambiante.

β - Extraction :

On reprend le mélange noirâtre avec 50 ml de chloroforme. On filtre sur célite et on lave par 3 x 50 ml de chloroforme, puis 3 x 50 ml de méthanol ; puis on concentre à faible volume.

γ - Purification :

Le sirop est repris avec du chloroforme. On additionne du charbon activé pour décolorer la solution. On filtre sur célite, et on concentre le filtrat à faible volume. On additionne de l'éther éthylique à la phase organique jusqu'à l'apparition d'un louche ; le produit cristallise après une nuit à +4° C.

3. Résultats et discussion.

L'analyse chromatographique en couche mince dans le système-solvant benzène/méthanol/chloroforme (92:8:2) montre la présence d'un seul constituant.

Rendement : 56 % ; F exp : 150° C ; $(\alpha)_D^{24}$ exp 3,9 $\frac{24}{h}$ -4,4° (cl dans le chloroforme). LEABACK et WALKER (93) ont trouvé pour le méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside les constantes physiques suivantes : F 163° C ; $(\alpha)_D^{16}$ - 22,2° (cl dans le méthanol).

Nous observons une légère mutarotation du produit isolé, cela explique la présence d'une faible quantité d'un produit dû à une réaction secondaire, possédant sa fonction réductrice libre. Il s'agit vraisemblablement du tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannose, obtenu par l'action de traces d'eau sur le chloro-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannose.

Analyse en I.R dans le nujol :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3260 (N-H), 1750 (C=O, acétyl), 1650 (amide I), 1565 (amide II), 1230 (C - O), 890 (C-H axial, anomérie β), 3300, 3090, 1310, 1170, 1070, 1040, 980, 945, 910, 720 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 60 MHz : référence TMS, solvant CDCl_3 .

τ 6,50 (singulet : 3 protons, 1 méthyl), τ 7,93 (singulet : 3 protons, 1 acétyl), τ 7,99 (singulet : 6 protons, 2 acétyl), τ 8,06 (singulet : 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

Les analyses en I.R et en R.M.N du produit isolé permettent d'identifier trois groupements acétylés, un groupement acétamido et un groupement méthylé.

La condensation du méthanol anhydre sur le chloro-1 désoxy-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannose fournit du méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside.

d) Préparation du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside est O-désacétylé par la soude.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

Le méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside est repris par 20 ml de méthanol. On ajoute 450 ml de soude 0,1 N et on laisse le tout une heure à 37° C sous agitation.

β - Extraction et purification:

La solution est ensuite purifiée par passage sur une colonne (2 x 30 cm) de Dowex 50 x 8 ("mesh" 25-50 ; H⁺). L'éluat obtenu après rinçage de la colonne est concentré sous vide. Le sirop jaune obtenu est décoloré, après dilution dans le méthanol, par du charbon actif. La solution limpide obtenue après filtration sur célite, est concentrée à l'évaporateur rotatif. On précipite 3,2 g de produit par addition d'éther à la solution méthanolique. Le précipité filtré est recristallisé dans l'éthanol.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), après révélation au réactif de RYDON et SMITH (94) ou au réactif à l'acide periodique et benzidine de MONTGOMERY et WU (95) montre la présence d'un seul constituant (Fig. 10 ; p.34).

Rendement : 85 %, F 194° C, (α)_D²⁴ - 90° (c1 dans le méthanol). ROTH et PIGMAN (96) donnent pour le méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranoside : F 190-191° C, (α)_D²⁰ - 42° (c2 dans l'eau) ; tandis que LEABACK et WALKER (97) trouvent : F 204° C, (α)_D¹⁹ - 47,1° (1,5 dans l'eau) ; alors que KUHN (98) propose : F 235° C (α)_D - 43° (dans l'eau).

Analyse en I.R :

λ ^{KBr}
^{Max} 3480, 3360 (OH), 3270 (N-H), 2960-2840 (C-H), 1660-1640 (amide I), 1560-1540 (amide II), 890 (C-H axial, anomérie β), 1320, 1210, 1160, 1075, 1030, 940 cm⁻¹.

Analyse en R.M.N à 90 MHz : référence externe HMS, solvant D₂O.
 τ 5,25 (1 doublet J = 8 Hz, 1 proton, anomérie β), τ 6,19 (1 singulet, 3 protons, 1 méthyl), τ 7,64 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

Les analyses en I.R et en R.M.N nous confirment la présence de groupements hydroxyles, d'un groupement méthyle et d'un groupement acétamido.

La O-désacétylation du méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranoside fournit le méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranoside.

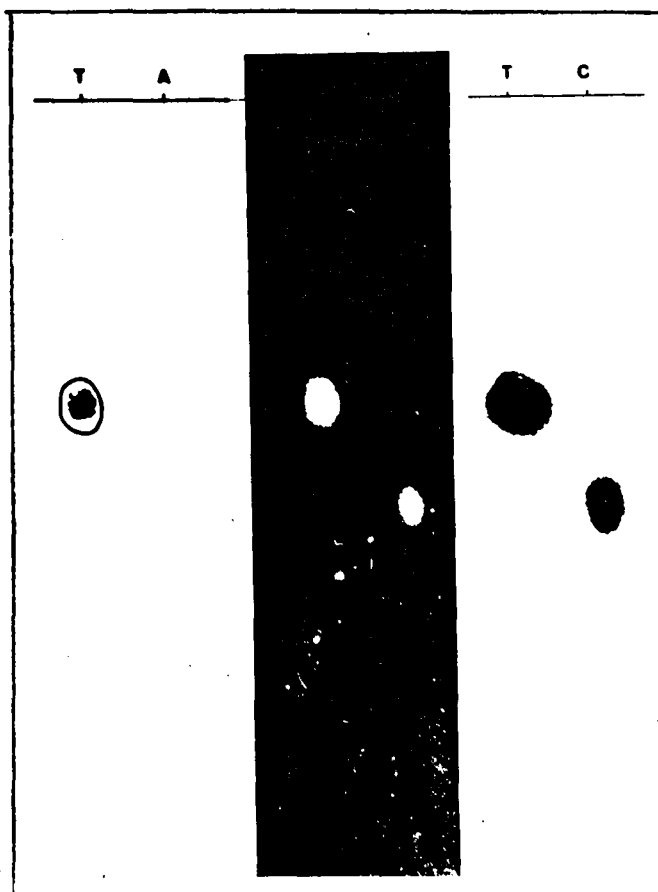


Figure 10

Chromatographie sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside (A, B, C).

- T : Acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.
- A : Révélation au réactif à l'oxalate d'aniline.
- B : Révélation au réactif periodate benzidine.
- C : Révélation au réactif de RYDON et SMITH.

II.- SYNTHÈSE DU BENZYL ACÉTAMIDO-2 DÉSOXY-2 β -D-GLUCOPYRANNOSE.

Nous avons envisagé la synthèse de ce dérivé pour l'utiliser comme composé de référence en R.M.N. Afin d'identifier avec certitude la fréquence de résonance du méthyl du C_1-O-CH_3 , il semblait intéressant de préparer le benzylidose de la glucosamine. D'autre part, le groupement benzyl peut-être éliminé par réduction catalytique ; ce qui correspond à une technique d'osidolyse beaucoup plus douce qu'une hydrolyse catalysée par l'acide chlorhydrique.

A.- Principe.

Le procédé de KOENIGS et KNORR (99) est utilisé pour préparer le benzyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside :

- Condensation de l'alcool benzylique sur l'acétochloroglucosamine.
- O-désacétylation par le méthanolate de sodium du benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside.

B.- Procédés.

a) Synthèse du Benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside :

1. Principe.

L'alcool benzylique anhydre est condensé sur le chloro-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside en présence de sels d'argent.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

A une suspension de 16 g de carbonate d'argent fraîchement préparé et de 10 g de drierite desséchée dans 50 ml d'alcool benzylique redistillé, on ajoute 5 ml d'une solution de perchlorate d'argent à 10 % dans le toluène. Le mélange est agité une heure à température ambiante, à l'abri de la lumière.

On additionne ensuite 5 g de chloro-1 désoxy-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannose dissous dans le toluène anhydre. On agite une semaine.

β - Extraction :

On reprend la suspension noirâtre avec 50 ml de chloroforme. On filtre sur célite, puis on lave au chloroforme. La phase organique est concentrée à faible volume.

γ - Purification :

Au sirop repris par du chloroforme, on additionne un mélange d'éther éthylique et d'éther de pétrole jusqu'à l'apparition d'un louche. Le produit cristallise après une nuit à +4° C.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique en couche mince dans le système-solvant benzène/méthanol/chloroforme (92:8:2) montre la présence d'un seul constituant.

F exp 154° C, $(\alpha)_D^{24}$ exp - 38° (c 1 dans le chloroforme). CUTLER et PEAT (100) donnent pour le benzyl tri-O-acétyl-3,4,6-acétamido-2-désoxy-2 β -D-glucopyrannoside : F 163° C $(\alpha)_D^{14}$ - 38,3° (c 0,63 dans le chloroforme).

Analyse en I.R dans le nujol :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3340 (N-H), 3060 (=C-H, noyau aromatique), 1740 (C=O, acétyl), 1660 (amide I), 1535 (amide II), 740, 695 (C-H hors du plan, noyau aromatique), 1500, 1250, 1220, 1160, 1140, 1120, 1040, 960, 920, 900 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 90 MHz : référence interne TMS, solvant

CDCl_3 :

τ 2,68 (singulet, 5 protons, noyau aromatique), τ 3,80 (doublet $J=9 \text{ Hz}$, 1 proton, anomérie β), τ 7,92 (singulet, 3 protons, 1 acétyl), τ 8,01 (singulet, 6 protons, 2 acétyl), τ 8,14 (singulet, 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusion.

La condensation de l'alcool benzylique sur le chloro-1 désoxy-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannose fournit le benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside. La réaction s'effectue avec une inversion de WALDEN ; on peut penser que la réaction est une substitution nucléophile d'ordre 2.

b) Préparation du benzyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-gluco-pyranoside :

1. Principe.

Le benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-gluco-pyranoside est O-désacétylé par le méthanolate de sodium.

2. Mode opératoire.

α - Réactif :

On dissout 1 g de sodium métallique dans 200 ml de méthanol anhydre.

β - O-désacétylation :

375 mg de benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-gluco-pyranoside sont dissous dans 4 ml de méthanol anhydre.

On ajoute 1,2 ml de méthanolate de sodium, et on laisse le mélange réactionnel 1 heure à température ambiante.

On neutralise par de la Dowex 50 x 8 ("mesh" 25-50 ; H⁺). On filtre et on évapore à faible volume sous pression réduite.

Le sirop est repris par le méthanol . Après addition d'éther, les cristaux apparaissent après une nuit à +4° C.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique en couche mince de silicagel G dans le système-solvant CHCl₃/CH₃OH (9:3) montre la présence d'un seul constituant (Rf 0,45).

Rendement : 90 % ; F exp : 217° C ; (α)_D²⁴ exp - 49° (eau).

KUHN *et al.* (101) ont trouvé pour le benzyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-gluco-pyranoside : F 205-206° C ; (α)_D²⁰ - 48° (eau).

Analyse en I.R dans le nujol :

λ KBr Max 3450-3350 (OH, hydroxyl), 3310 (N-H), 1640 (amide I), 1550 (amide II), 899 (C-H axial, anomérie β), 755, 735, 700 (C-H hors du plan, noyau aromatique), 2450, 1500, 1210, 1170, 1090, 1040 cm⁻¹.

Analyse en R.M.N à 90 MHz : référence TMS, solvant $(CD_3)_2SO$:

- τ 2,69 (singulet, 5 protons, noyau aromatique)
- τ 8,10 (singulet, 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

La O-désacétylation par le méthanolate de sodium du benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside est quantitative et mène à la préparation du benzyl acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside.

En R.M.N à 90 MHz, le groupement benzyle présente un singulet à τ 2,69 (5 protons) caractéristique du noyau aromatique. Il est donc facile de distinguer en R.M.N le benzyloside du méthyloside qui possède un singulet à τ 6,19 (3 protons) relatif au groupement méthyle.

III.- SYNTHÈSE DU CHLORHYDRATE DU TRI-O-MÉTHYL-3,4,6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCO-PYRANNOSE.

A.- Préparation à partir de la chitine.

Le tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose s'obtient par hydrolyse chlorhydrique du tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose, préparé à partir de la chitine (voir p. 61).

B.- Synthèse directe.

La synthèse du chlorhydrate du tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 glucopyrannose a été réalisée en deux étapes :

- Perméthylation du méthyl mono-O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.
- Hydrolyse chlorhydrique du méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.

a) Préparation du méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside est méthylé totalement par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

On dissout 650 mg d'un mélange d'anomères α et β dans 50 ml d'iodure de méthyle ; puis on ajoute progressivement 1 g d'oxyde d'argent fraîchement préparé. Ce mélange est laissé à reflux pendant 7 heures.

On effectue un deuxième cycle de méthylation par addition de 20 ml d'iodure de méthyle et de 1 g d'oxyde d'argent, en chauffant à reflux pendant une nuit.

On termine la méthylation par un troisième reflux de 4 heures, après une nouvelle addition au mélange réactionnel de 20 ml d'iodure de méthyle et de 1 g d'oxyde d'argent.

On suit les différents cycles de méthylation par chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

β - Extraction :

On filtre, puis on lave par 3 x 20 ml de méthanol. La phase organique est concentrée sous pression réduite.

γ - Purification :

Le sirop obtenu est purifié par fractionnement (3 ml) après passage sur une colonne de gel de silice (70-325 "mesh") dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

3. Résultats.

Nous avons isolé une fraction pure de méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside qui cristallise en longues aiguilles, et un mélange d'anomères α et β à forte proportion de méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside.

Constantes physiques obtenues pour le méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside :

F exp 152°C ; $(\alpha)_D^{24} + 135^\circ$ (c 1 dans le méthanol). NEUBERGER (102) trouve :
F 151°C ; $(\alpha)_D + 102$ (dans l'eau). CUTLER, HAWORTH et PEAT (103) donnent :
F 150°C ; $(\alpha)_D + 104,3^\circ$ (dans l'eau).

Analyse en I.R dans le nujol :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3300 (N-H), 1650 (amide I), 1560 (amide II), 1150-1050 (C-O, éther), 850 (C-H équatorial, anomère α), 3080, 1330, 1300, 1180, 1160, 1130, 1100, 1070, 1050, 980, 950, 720, 700 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 90 MHz : référence TMS, solvant CD_3OD :

τ 5,46 (doublet $J=4 \text{ Hz}$, 1 proton équatorial, anomérie α),
 τ 6,48 (singulet, 6 protons, 2 méthoxyl), τ 6,60 (singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,64 (singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 8,03 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

L'analyse en I.R du produit isolé nous confirme que la méthylation a été totale par l'absence de bande d'absorption vers 3500-3400 cm^{-1} , et qu'elle n'a pas donné lieu à une substitution sur l'azote par la présence des bandes d'absorption à 3300 cm^{-1} (N-H), 1650 cm^{-1} (amide I) et 1560 cm^{-1} (amide II).

Le spectre en R.M.N montre la présence de quatre groupements méthyles et d'un groupement acétamido.

La méthylation du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent mène donc à la synthèse du méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.

b) Préparation du chlorhydrate du tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose :

1. Principe.

Le méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside est hydrolysé par l'acide chlorhydrique 4 N.

2. Mode opératoire.

Le dérivé méthylé (2 mg) est hydrolysé dans un tube scellé sous vide par l'acide chlorhydrique 4 N (2 ml) pendant 4 heures.

La solution obtenue est évaporée plusieurs fois sous pression réduite en présence de méthanol.

3. Résultats - Conclusions.

L'analyse chromatographique sur papier ou à l'auto-analyseur d'acides aminés du sirop obtenu montre la présence d'un seul constituant, qui possède le même comportement que le tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyranose.

IV.- PREPARATION DU CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-3,6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

A.- Principe.

Nous utilisons comme produit de départ la chitine, qui est constituée par un enchaînement linéaire de N-acétyl β -D-glucosaminides liés en 1,4 (Fig. 3, p. 18). La chitine, qui est insoluble dans tous les solvants utilisés dans les réactions de méthylation, est d'abord acétolysée. Les produits organo-solubles sont ensuite méthylés. Une hydrolyse chlorhydrique de ces oligomères méthylés libère alors deux dérivés méthylés, la di-O-méthyl-3,6 glucosamine (di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyranose) et la tri-O-méthyl-3,4,6 glucosamine (tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyranose), qui devront être séparés. Pour obtenir une quantité importante de dérivé diméthylé, il faut utiliser des oligomères de chaînes de longueur maximale compatible avec leur solubilité dans les solvants organiques.

B.- Procédés.

a) Acétolyse de la chitine :

L'acétolyse est une méthode de choix pour libérer à partir de glycanes complexes des enchaînements oligosidiques plus simples (BAYARD (104))

L'acétolyse de la chitine s'effectue généralement en présence d'acide sulfurique et d'anhydride acétique, qui provoquent respectivement une rupture partielle des enchaînements glucosaminidiques et une acétylation de tous les groupements hydroxyles. Les courtes chaînes obtenues sont alors organo-solubles.

A la suite de l'étude bibliographique concernant l'acétolyse de la chitine, à laquelle nous nous sommes livrés, nous avons retenu les procédés

de KUHN et EKONG (105), et d'OSAWA (106) qui sont le plus couramment appliqués. Nous avons soumis ces procédés à une étude critique portant principalement sur le rendement et la nature des peracétyl dérivés obtenus. A la suite de cette étude, nous avons adopté un protocole expérimental qui nous fournit surtout des oligosides avec un bon rendement. Les oligosides libérés après acétolyse de la chitine ont été analysés par chromatographie.

1. Procédé de KUHN et EKONG (107).

α - Principe :

La chitine est soumise à l'action prolongée de l'anhydride acétique en présence d'acide acétique et d'acide sulfurique à 20° C.

β - Technique :

2 g de chitine sont mis en suspension dans 100 ml d'acide acétique auquel on ajoute 100 ml d'anhydride acétique et, goutte à goutte, 8 ml d'acide sulfurique concentré. Le mélange est agité énergiquement jusqu'à l'obtention d'une solution brunâtre (environ 12 h. après l'addition d'acide sulfurique). Après un repos de 4 jours à 20° C, la solution est versée sur 200 ml de glace pilée, puis neutralisée par addition de bicarbonate de sodium. Les peracétyl-dérivés sont extraits trois fois par 200 ml de chloroforme. Les phases organiques sont rassemblées et évaporées à faible volume, les peracétyl-dérivés sont précipités par addition d'éther de pétrole.

γ - Résultats :

Le précipité filtré, séché sous vide à 50° C, pèse 67 mg, ce qui nous donne un faible rendement de 1,7 %. L'analyse chromatographique d'une aliquote O-désacétylée (voir p. 46), sur papier Whatman n° 3, dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) nous montre la présence d'un grand nombre d'oligomères (Fig. 11 , p. 64). Ce procédé de KUHN et EKONG libère peu de peracétyl-glucosamine. L'expérience montre que si l'on prolonge le temps de réaction, le rendement augmente légèrement, mais on observe une diminution de la quantité d'oligomères supérieurs. Une cinétique d'acétolyse de 5 et 7 jours est illustrée par la figure 11, p. 64 .

2. Procédé d'OSAWA (108).

α - Principe :

La chitine est soumise à l'action de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique à 55° C.

β - Technique :

20 g de chitine purifié sont mis en suspension dans 100 ml d'anhydride acétique froid. On additionne ensuite goutte à goutte 13 ml d'acide sulfurique. Le mélange obtenu est agité une nuit à 20° C, puis chauffé 8 heures à 55° C. Le mélange réactionnel est ensuite versé dans une solution refroidie d'acétate de sodium (80 g dans 520 ml d'eau). Le mélange est centrifugé, le surnageant est extrait par 3 x 300 ml de chloroforme. Les phases organiques sont réunies et lavées une première fois à l'eau, puis avec une solution saturée en bicarbonate de sodium et une dernière fois à l'eau. On sèche la phase organique sur sulfate de sodium et on l'évapore à faible volume. Les peracétyl-dérivés sont précipités à l'éther de pétrole.

γ - Résultats :

On recueille après séchage sous vide à 50° C, 2,7 g de dérivés peracétylés. Le rendement de la réaction est de 6,7 %. L'analyse chromatographique sur papier d'une aliquote O-désacétylée (voir p. 46), nous montre que ce procédé d'acétolyse libère une quantité appréciable de peracétyl-glucosamine (Fig. 11, p. 64). Ainsi, l'élévation de la température au cours de la réaction provoque une augmentation de la concentration en peracétyl-glucosamine au détriment de la concentration en oligomères supérieurs.

3. Procédé personnel.

α - Principe :

Le mode opératoire mis au point est un compromis entre ceux de KUHN et d'OSAWA. Nous avons modifié les conditions de température de la manière suivante : au lieu d'opérer à 55° C, comme dans le procédé d'OSAWA, par exemple, nous effectuons la manipulation à température ordinaire, comme dans le procédé de KUHN ; ceci évite une dégradation trop rapide de la chitine en peracétyl chitobiose et en peracétyl glucosamine. En outre, le réactif utilisé est composé uniquement d'anhydride acétique et d'acide sulfurique, comme dans le procédé d'OSAWA.

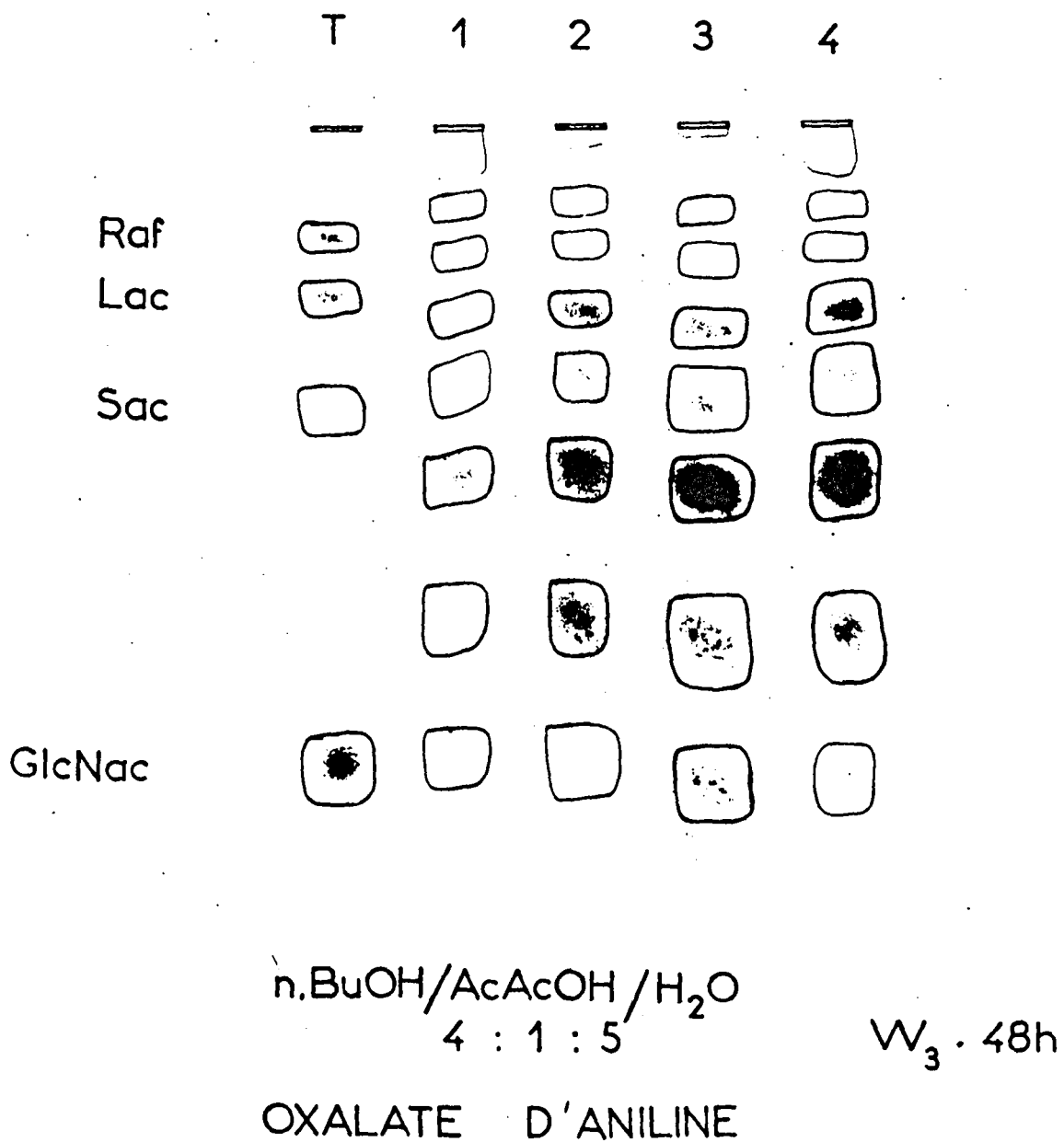


Figure 11

Acétolyse de la chitine.

1. Procédé de KUHN et EKONG (cinq jours).
2. Procédé de KUHN et EKONG (sept jours).
3. Procédé d'OSAWA.
4. Procédé personnel.

β - Technique :

. Réaction : 10 g de chitine préalablement pulvérisée à l'aide d'un broyeur à couteaux sont mis en suspension dans 250 ml d'anhydride acétique ; au mélange maintenu à 0° C, afin d'éviter une élévation brutale de température, on additionne lentement 20 ml d'acide sulfurique concentré. Après une semaine d'agitation à 20° C, le mélange réactionnel est centrifugé. Le résidu est soumis à un nouveau cycle d'acétolyse. La solution limpide brunâtre constituant le surnageant est versée goutte à goutte sur 300 ml de glace pilée, puis amenée à pH 4,5 par addition de bicarbonate de sodium en poudre.

. Extraction : Les dérivés peracétylés sont extraits 8 fois par 100 ml de chloroforme. Les phases organiques sont réunies, puis lavées avec une solution saturée de bicarbonate de sodium et à l'eau distillée, puis elles sont ensuite séchées sur sulfate de sodium. La phase limpide est concentrée à faible volume à l'évaporateur rotatif. Le sirop formé est repris par 30 ml de chloroforme. Les dérivés acétylés sont précipités par addition de 600 ml d'éther de pétrole, le mélange est maintenu 24 heures à + 4° C. Après filtration et séchage, on obtient 7 g de dérivés acétylés.

. Résultats : Après trois cycles d'acétolyse la réaction est quantitative. L'étude chromatographique des dérivés peracétylés montre la présence d'un grand nombre d'oligomères de la peracétyl glucosamine :

- L'analyse chromatographique en couche mince de silice dans le système-solvant chloroforme/méthanol (9:1) est illustrée par la figure 12 (p. 66).

- L'analyse chromatographique sur papier Whatman n° 3 d'une aliquote O-désacétylée (voir p. 46) s'effectue dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) pendant 48 heures (Fig. 11 , p. 64).

La représentation graphique de la variation du log $(R_{\text{Glc Nac}}^R)$ en fonction de la masse moléculaire des osides présents dans un acétolysat de chitine après O-désacétylation, est une droite. Ceci tend à prouver que l'on a bien une famille homologue, dont l'unité de répétition est la N-acétyl glucosamine (Tableau X , p. 67 et Fig. 13 , p. 68).

4. Conclusions.

L'acétolyse de la chitine selon le procédé de KUHN et EKONG (109) libère des oligosides et peu de peracétyl glucosamine ; mais le rendement de la réaction est très faible.

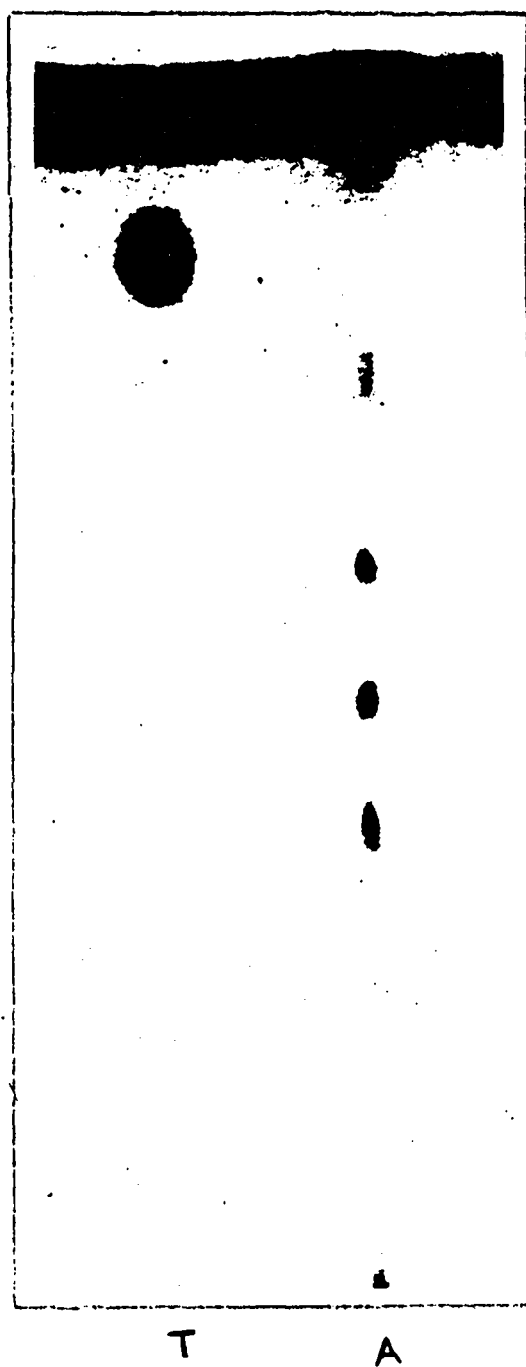


Figure 12

Analyse par chromatographie sur couche mince de Silicagel G
d'un acétolysat de chitine dans le système-solvant :
chloroforme/méthanol (9:1).

T : Tétra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannose.
A : Chitine acétolysée.

TABLEAU X

R (GlcNAc) des osides présents dans un acétolysat de chitine, après O-désacétylation. Chromatographie effectuée sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant n-butanol/acide acétique /eau (4:1:5) pendant 48 h.

PRODUIT	MASSE MOLECULAIRE	R(GlcNAc)	log(RGlcNAc)
N-acétyl glucosamine	221	1	0
Chitobiose	424	0,79	- 0,10
Chitotriose	627	0,56	- 0,25
Chitotétrose	830	0,41	- 0,38
Chitopentose	1 033	0,30	- 0,52
Chitohexose	1 236	0,20	- 0,69
Chitoheptose	1 439	0,13	- 0,89

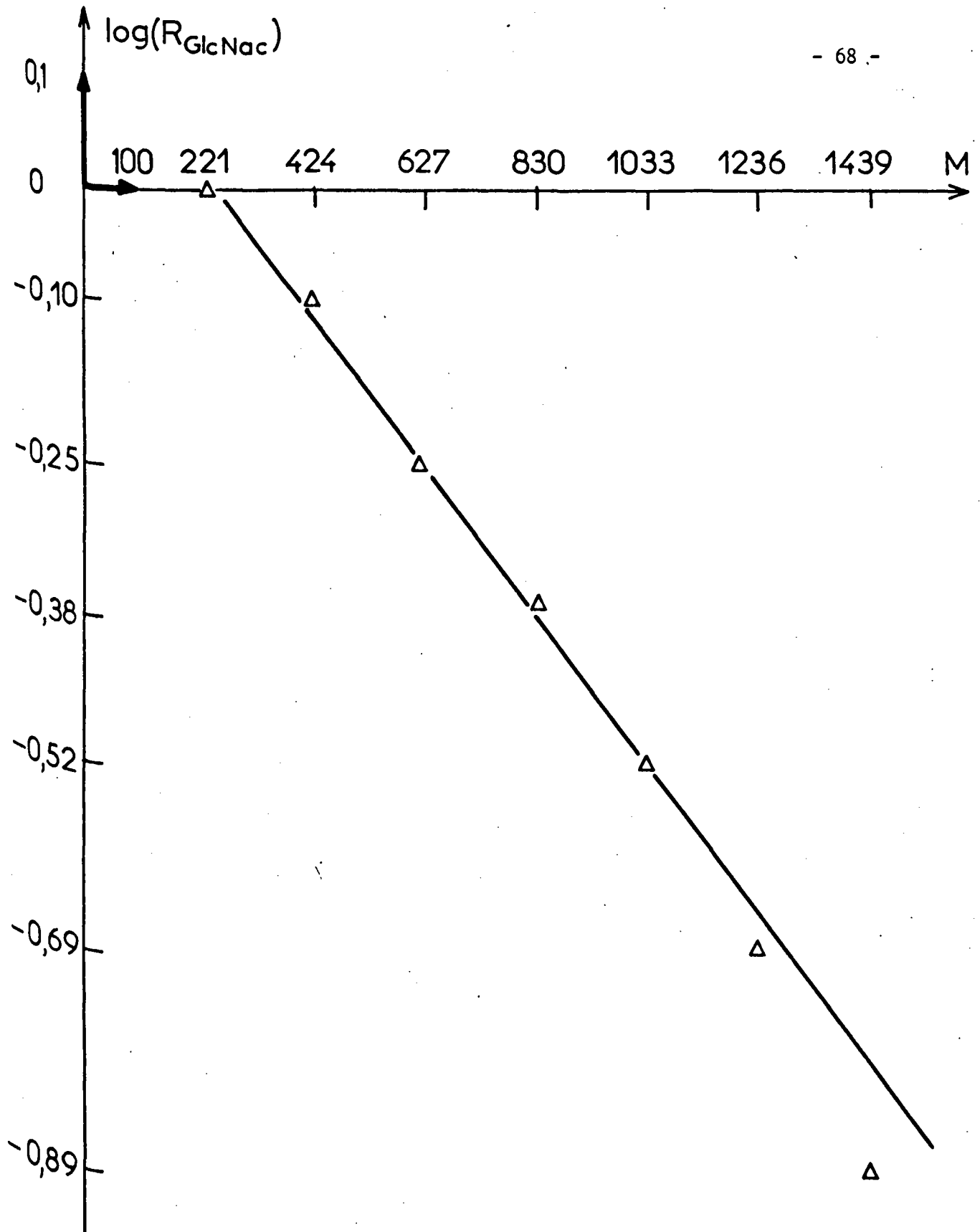


Figure 13

Représentation graphique du $\log (R_{\text{GlcNac}})$ en fonction de la masse moléculaire M des osides présents dans un acétolysat de chitine, après O-désacétylation).

Le procédé de OSAWA (110) libère des oligosides, mais aussi une quantité appréciable de peracétyl glucosamine, le rendement de la réaction est faible.

L'acétolyse de la chitine selon notre procédé personnel libère de nombreux oligosides et peu de peracétyl glucosamine, avec un rendement de 35 % par cycle.

b) Méthylation de la chitine :

1. Principe.

La chitine acétolysée, en solution dans la diméthylformamide, est méthylée en présence d'oxyde de baryum par l'iodure de méthyle selon KUHN et TRISCHMANN (111).

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

A 4 g de chitine acétolysée dissoute dans 40 ml de diméthylformamide, on ajoute 10 g de baryte hydratée $Ba(OH)_2 \cdot 8 H_2O$ finement pulvérisée. Le mélange est agité pendant 1 h. à 0° C. On additionne très lentement 20 ml d'iodure de méthyle, le mélange est maintenu sous agitation 5 h. à 0° C. On ajoute ensuite 15 g d'oxyde de baryum BaO en poudre. Après 30 mn d'agitation on additionne goutte à goutte 15 ml d'iodure de méthyle. On maintient le tout une nuit sous agitation à 0° C. Le mélange est ensuite agité sous réfrigérant ascendant à température ordinaire, dès qu'il prend en masse, on ajoute 5 à 10 ml de diméthylformamide puis 10 à 20 ml d'iodure de méthyle. Enfin, pour compléter la méthylation, l'ensemble est maintenu à 37° C pendant 30 h. sous réfrigérant ascendant.

β - Extraction :

Au mélange réactionnel, on ajoute 30 ml d'une solution saturée en chlorure de sodium (357 g/l). On extrait 8 fois par 100 ml de chloroforme; s'il se forme un gel épais, on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique. Les phases organiques sont réunies et lavées avec une solution de thio-sulfate de sodium à 1 %. On décante et on sèche la phase organique sur sulfate de sodium, on filtre, puis on concentre à faible volume à l'évaporateur rotatif. A la phase concentrée, on additionne une solution saturée de chlorure de sodium jusqu'à précipitation de ce sel. On filtre, on rince avec 3 fois 5 ml de chloroforme et on décante. La phase organique récupérée est séchée puis concentrée à faible volume sous pression réduite. On additionne ensuite de l'éther de pétrole

jusqu'à formation d'un louche (500 ml). On laisse la solution reposer une nuit à +4° C ; les dérivés perméthylés précipitent.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique d'un hydrolysat chlorhydrique de chitine perméthylés à l'auto-analyseur d' amino-acides montre la présence de deux constituants : la tri-O-méthyl-3,4,6 glucosamine et la di-O-méthyl-3,6 glucosamine.

L'analyse chromatographique sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) du même hydrolysat chlorhydrique montre la présence des deux dérivés méthylés prévus et d'un troisième composé non identifié ; tandis que l'analyse électro-chromatographique ne révèle la présence que des deux dérivés méthylés. Le composé non identifié ne possède pas la même charge électrique globale que celle des dérivés méthylés de la glucosamine.

c) Séparation chromatographique de la di-O-méthyl-3,6 N-acétyl glucosamine et de la tri-O-méthyl- 3,4,6 N-acétyl glucosamine :

1. Principe.

La séparation chromatographique des deux dérivés méthylés obtenus à partir de la chitine s'effectue en trois étapes :

- hydrolyse chlorhydrique de la chitine perméthylée.
- N-réacétylation des deux dérivés méthylés libérés.
- fractionnement des éthers méthyliques sur colonne de charbon-célite.

2. Mode opératoire.

α - Hydrolyse chlorhydrique :

La chitine perméthylée (500 mg) est dissoute dans 100 ml d'acide chlorhydrique 4 N. On porte la solution au bain marie bouillant sous réfrigérant ascendant, et sous courant d'azote pendant 4 heures. L'hydrolyse effectuée, on évapore la solution sous vide. Le résidu est repris avec 125 ml d'eau, la solution est alors à pH 2. La solution est amenée à pH 6 avec du bicarbonate de sodium en poudre.

β - N-réacétylation des dérivés méthylés :

On utilise la méthode de ROSEMAN *et al.* (112). L'hydrolysat est repris par 125 ml d'eau ; la solution est amenée à pH 6. A cette solution on additionne 160 ml de bicarbonate de sodium à 0,5 % et 3 ml d'anhydride acétique. Le mélange est laissé 24 h. à 20° C sous agitation magnétique.

γ - Séparation des dérivés méthylés par chromatographie d'adsorption sur colonne de charbon-célite, selon le procédé de WHISTLER et DURSO (113) :

On reprend 500 mg de dérivés méthylés par 50 ml d'eau ; la solution formée est passée sur une colonne de charbon-célite (voir p. 33). Diverses expériences nous ont amené à retenir le gradient d'élution suivant :

700 ml d'eau
1 000 ml d'éthanol à 5 %
2 000 ml d'éthanol à 10 %
700 ml d'éthanol à 15 %
500 ml d'éthanol à 20 %
1 500 ml d'éthanol à 30 %

Les différentes fractions recueillies sont évaporées à faible volume sous pression réduite ; les produits cristallisent.

3. Résultats.

La chromatographie de partage sur papier d'un hydrolysat chlorhydrique (M_1) de chitine acétolysée nous révèle la présence de deux constituants, devant être le tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose et le di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose (Fig. 14 , p. 72).

L'analyse chromatographique sur papier d'un aliquote (M_2) de dérivés méthylés N-réacétylés nous montre la présence de deux constituants, identifiés au di-O-méthyl-3,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose et au tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

Les différentes fractions cristallines, isolées par chromatographie d'adsorption sur colonne de charbon célite, sont étudiées par chromatographie de partage sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant n-butanol/ acide acétique/eau (4:1:5) (Fig. 14 , p. 72).

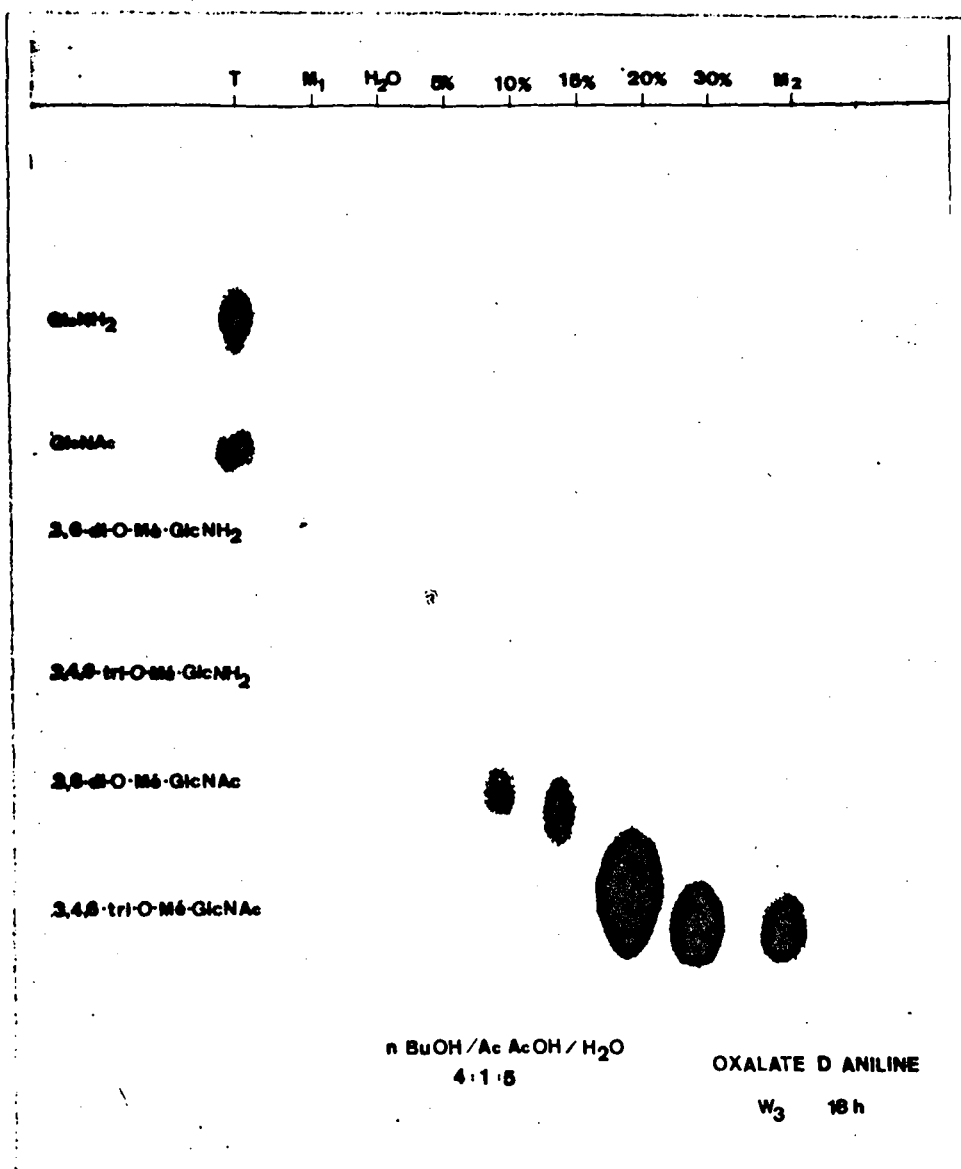


Figure 14

Fractionnement sur colonne de charbon-célite des dérivés méthylés préparés à partir de la chitine. Chromatographie effectuée sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) pendant 18 heures. Révélation au réactif à l'oxalate d'aniline.

T : témoins.

M₁ : chitine perméthylée, puis hydrolysée.

M₂ : produit de N-acétylation d'un hydrolysate de chitine perméthylée.

Les quantités des fractions cristallines isolées sont indiquées dans le Tableau XI (p. 74) ; et leurs constantes physiques dans le Tableau XII (p. 75).

4. Analyse en I.R dans le nujol.

Pour le di-O-méthyl-3,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose:
 $\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3370 (OH, hydroxyl), 3310 (N-H), 1630 (amide I), 1560 (amide II), 1120 (C-O-C, éther), 850 (C-H équatorial, anomérie α), 3090, 1310, 1190, 1080, 1060, 1020, 950, 780, 720 cm^{-1} .

Pour le tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose :
 $\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3345 (OH), 3280 (N-H), 1650 (amide I), 1560 (amide II), 1130 (C-O-C, éther), 850 (C-H équatorial, anomérie α), 3090, 1300, 1090, 1070, 1040, 980, 780, 720 cm^{-1} .

Ces analyses I.R nous apprennent que ces deux dérivés méthylés à l'état cristallin sont sous la forme anomérique α .

5. Conclusions.

Le di-O-méthyl-3,6 et le tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoses ont pu être préparés simultanément par méthylation de la chitine. La séparation de ces deux dérivés méthylés sur une colonne de charbon-célite s'effectue avec un rendement relativement faible, qui est dû à des adsorptions irréversibles.

d) Préparation du chlorhydrate du di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose :

1. Principe.

Le di-O-méthyl-3,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose est hydrolysé par l'acide chlorhydrique.

2. Mode opératoire.

2 mg de di-O-méthyl-3,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose sont hydrolysés, dans un tube scellé sous vide, par 2 ml d'acide chlorhydrique 4 N pendant 4 heures à 100° C. La solution obtenue est évaporée plusieurs fois sous pression réduite en présence de méthanol.

TABLEAU XI

Fractionnement, sur colonne de charbon célite, des dérivés méthylés obtenus après N-acétylation d'un hydrolysate de Chitine perméthylée.

ELUANT	NATURE DES PRODUITS ISOLES	QUANTITES
eau	sels minéraux	
éthanol 5 %	Glc NAc	ε
	tri-O-Mé-3,4,6 Glc NH ₂	ε
	di -O-Mé-3,6 Glc NH ₂	ε
éthanol 10 %	di -O-Mé-3,6 Glc NAc	80 mg
éthanol 15 %	di -O-Mé-3,6 Glc NAc	ε
	tri-O-Mé-3,4,6 Glc NAc	ε
éthanol 20 %	tri-O-Mé-3,4,6 Glc NAc	70 mg
éthanol 30 %	tri-O-Mé-3,4,6 Glc NAc	110 mg

TABLEAU XII

Constantes physiques des dérivés méthylés obtenus à partir de la chitine.

PRODUIT	F exp	F th (*)	$(\alpha)_D^{22}$ exp c 0,5 dans l'eau	$(\alpha)_D^{24}$ th (*) dans l'eau
di-O-méthyl-3,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	220° C décomposé	232 - 233° C	+58,4° 24 h. → +37,3°	→ +37°
tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido- 2-désoxy-2 D-glucopyrannose	230° C décomposé	234° C	+72,4° 24 h. → +43,5°	→ +45°

(*) selon W. JEANLOZ (114).

3. Résultat.

L'analyse chromatographique à l'auto-analyseur d'acides-amino du sirop obtenu montre la présence d'un constituant unique, identifié au di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

C.- Conclusion.

La chitine acétolysée se trouve être un excellent substrat pour la préparation simultanée du di-O-méthyl-3,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose et du tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

V.- PREPARATION DU CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-3,4 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

A.- Principe.

Pour préparer le chlorhydrate du di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose, nous avons suivi les étapes suivantes (Fig.15 , p. 77) :

- La tritylation du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose bloque l'hydroxyle porté par le carbone 6.
- Le dérivé tritylé est soumis à une méthylation totale.
- Détritylation du produit perméthylé.
- Une hydrolyse chlorhydrique du dérivé méthylé doit libérer le chlorhydrate du di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

B.- Procédés.

a) Préparation du méthyl O-méthyl-3 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose est tritylé selon le procédé employé par JEANLOZ (115), par action du chlorure de trityle dans la pyridine anhydre.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

Un mélange d'anomères α et β du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside (4g) (voir p. 105) et du chlorure de tri-

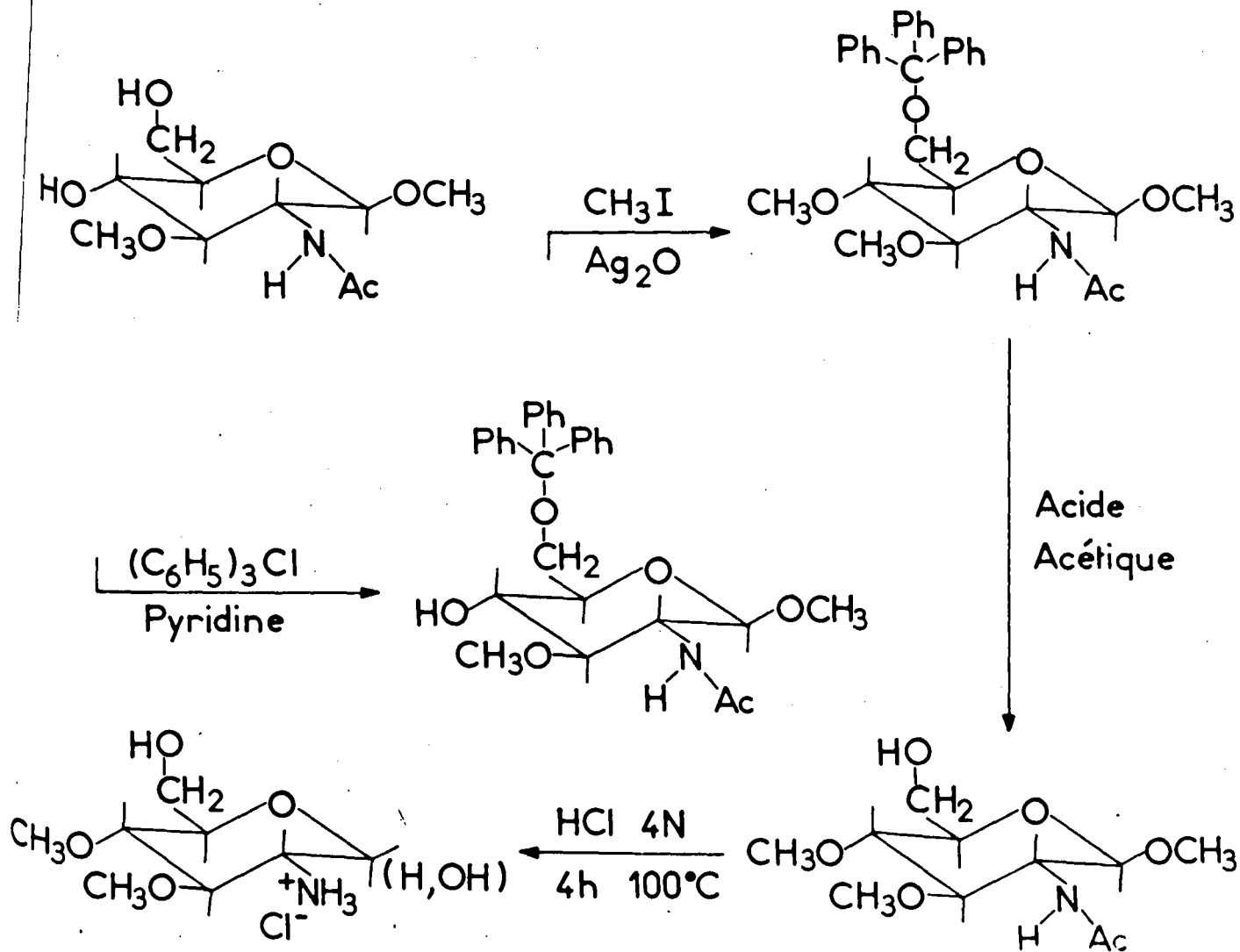


Figure 15

Schéma de synthèse du chlorhydrate du di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 β-D-glucopyranose.

tyle (4,9 g) sont dissous dans 100 ml de pyridine anhydre. Le mélange réactionnel est gardé au bain-marie bouillant pendant 6 heures. La solution prend rapidement une intense coloration jaune.

β - Extraction et purification :

Le mélange réactionnel refroidi est concentré sous pression réduite. Les dernières traces de pyridine sont éliminées par entraînement azeotropique avec du toluène anhydre.

Le sirop obtenu est repris par 200 ml de chloroforme. La phase organique est lavée à l'eau (2 x 50 ml), puis séchée sur sulfate de sodium anhydre. Cette phase organique est concentrée à faible volume.

Le sirop cristallise dans un mélange de méthanol et d'éther éthylique. Les cristaux sont filtrés et lavés à l'éther éthylique ; on obtient ainsi 2,3 g de cristaux prismatiques bien blancs. Le filtrat et les solvants de lavage sont réunis, puis concentrés sous pression réduite. Le résidu est fractionné par passage sur une colonne de silice (3 cm x 80 cm) dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1). On recueille ainsi 4 g de produit pur, et 1,5 g d'un mélange complexe.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) (la révélation à l'acide sulfurique fait apparaître les dérivés tritylés sous forme de taches d'une intense couleur jaune) nous montre :

- que les cristaux isolés correspondent au méthyl 0-méthyl-3 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside (Rf 0,54).
- que le filtrat est constitué d'un mélange d'anomères α et β du méthyl 0-méthyl-3 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside (Rf 0,54 et 0,43).

Constantes physiques du méthyl 0-méthyl-3 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside :

Anomère α :

F exp 206°C ; $(\alpha)_D^{20}$ exp $+ 53^\circ$ (c 1 dans le chloroforme). JEANLOZ (116) donne pour cet anomère : F $206-207^\circ \text{C}$; $(\alpha)_D^{26} + 53^\circ \pm 2^\circ$ (c 1,01 dans le chloroforme).

Anomère β :

F exp 240°C ; $(\alpha)_D^{20}$ exp $- 30^\circ$ (c 1 dans le chloroforme).

Analyse en I.R dans le nujol :

Anomère α :

λ $\begin{matrix} \text{KBr} \\ \text{Max} \end{matrix}$ 3600, 3400 (OH), 3240 (N-H), 3060 (C-H, noyau aromatique), 1630 (amide I), 1530 (amide II), 840 (C-H équatorial, anomère α), 770, 760, 750, 710, 700, 630 (C-H déformation hors du plan, noyau aromatique), 1650, 1490, 1320, 1240, 1185, 1150, 1120, 1050, 970, 940 cm^{-1} .

Anomère β :

λ $\begin{matrix} \text{KBr} \\ \text{Max} \end{matrix}$ 3640 (OH), 3300 (N-H), 3060 (C-H, noyau aromatique), 1650 (amide I), 1550 (amide II), 900 (C-H axial, anomérie β), 780, 765, 750, 710, 700, 630 (C-H déformation hors du plan, noyau aromatique), 1490, 1320, 1220, 1185, 1120, 1090, 1060, 1030, 990, 950 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 60 MHz , référence TMS ; solvant CDCl_3 :

Anomère α :

τ 2,68 (massif, 15 protons, 3 noyaux aromatiques)
 τ 5,31 (doublet $J = 4 \text{ Hz}$, 1 proton équatorial, anomérie α), τ 6,52 (singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,61 (singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 8,00 (singulet, 3 protons, 1 acétamido).

Anomère β :

τ 2,68 (massif, 15 protons, 3 noyaux aromatiques),
 τ 5,25 (doublet $J = 9 \text{ Hz}$, 1 proton axial, anomérie β), τ 6,45 (singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,51 (singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 8,00 (singulet, 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

Les bandes d'absorption à 3060, 780-630 cm^{-1} en I.R, et les pics de résonance vers τ 2,68 en R.M.N confirment l'action du chlorure de trityle sur le méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.

La tritylation s'effectue avec un rendement quantitatif. Nous avons isolé les anomères α et β pur du méthyl-O-méthyl-3 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.

Les caractéristiques physiques de l'anomère β qui n'étaient pas connues sont maintenant définies.

b) Préparation du méthyl di-O-méthyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside :

1. Principe.

Le méthyl O-méthyl-3 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside est soumis à une méthylation par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

600 mg de méthyl O-méthyl-3 O-trityl-6 α et β-D-gluco-pyranosides, 20 ml d'iodure de méthyle sont mis à reflux pendant une nuit en présence de 1,5 g d'oxyde d'argent fraîchement préparé.

On effectue un second cycle de méthylation en ajoutant 20 ml d'iodure de méthyle et 1 g d'oxyde d'argent ; le reflux est maintenu 8 heures.

β - Extraction :

Le mélange réactionnel est filtré sur verre fritté, l'oxyde d'argent est lavé par 3 x 20 ml de chloroforme. Le filtrat est concentré par évaporation sous pression réduite, le sirop obtenu est repris par l'éther éthylique puis évaporé à sec.

γ - Purification :

Le résidu solide obtenu (530 mg) est purifié par chromatographie sur colonne de Silice (3 cm x 80 cm) dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

3. Résultats.

L'analyse chromatographique sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) du produit méthylié, nous révèle la présence de deux constituants : les anomères α et β du méthyl di-O-méthyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside (R_f respectifs : 0,70 et 0,60).

Ces deux anomères ont pu être isolés par chromatographie sur colonne de Silice.

Rendement de la réaction : 80 %.

Constantes physiques :

Anomère α :

F exp 233° C. JEANLOZ (117) donne F 230-233° C pour le méthyl di-O-méthyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside.

Anomère β :

F exp 229° C.

Analyse en I.R dans le nujol :

Anomère α :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3250 (N-H), 3060 (C-H, noyau aromatique), 1630 (amide I), 1550 (amide II), 855 (C-H équatorial, anomérie α), 780, 760, 750, 730, 710, 700 (C-H déformation hors du plan, noyau aromatique), 3200, 1490, 1300, 1215, 1185, 1150, 1125, 1100, 1080, 1060, 1035, 980, 950, 905, 670, 630 cm^{-1} .

Anomère β :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3300 (N-H), 3060 (C-H, noyau aromatique), 1660 (amide I), 1560-1540 (amide II), 898 (C-H axial, anomérie β), 790, 770, 750, 740, 710, 700 (C-H hors du plan, noyau aromatique), 1310, 1220, 1190, 1150, 1100, 1060, 1030, 990, 945, 630 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 60 MH_2 : référence TMS, solvant CDCl_3 :

Anomère α :

τ 2,70 (massif, 15 protons, 3 noyaux aromatiques), τ 5,25 (1 doublet $J = 4 \text{ H}_2$, 1 proton équatorial, anomérie α), τ 6,50 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,62 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,74 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 8,00 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

Anomère β :

τ 2,70 (massif, 15 protons, 3 noyaux aromatiques), τ 6,48 (1 singulet, 6 protons, 2 méthoxyl), τ 6,70 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 8,00 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

Les analyses en I.R des produits isolés ne présentent pas de bande d'absorption vers 3500-3400 cm^{-1} relative au groupement hydroxyle. Les analyses en R.M.N confirment la présence de trois groupements méthoxyles. La méthylation a donc été totale.

Les anomères α et β du méthyl di-O-méthyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside ont pu être isolés purs. Pour la première fois les caractéristiques physiques de l'anomère β ont pu être décrites.

c) Préparation du méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside :

1. Principe.

Une hydrolyse acide sélective du méthyl di-O-méthyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside doit libérer le méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

100 mg de méthyl di-O-méthyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 α et β -gluco-pyranosides sont mis en suspension dans 2 ml d'acide acétique glacial au bain-marie bouillant. Après quelques minutes, la solution devient limpide, on additionne alors 1,3 ml d'eau goutte à goutte. Il se forme un louche au contact de l'eau, qui disparaît rapidement (ce louche est probablement dû au triphényl carbinol).

Le mélange réactionnel est maintenu 1 h. au bain-marie bouillant.

β - Extraction :

La solution limpide est refroidie sous eau courante. Il se forme rapidement un précipité blanc cristallin. On ajoute 7 ml d'eau froide pour obtenir une précipitation totale du triphényl carbinol.

Le mélange est filtré, le précipité est lavé à l'eau froide. Le filtrat et les eaux de lavage sont réunis, puis concentrés sous pression réduite à un sirop.

Le sirop est repris par 3 ml de toluène anhydre, puis concentré sous pression réduite, ceci afin d'éliminer les dernières traces d'acide acétique. On obtient un résidu blanc solide.

γ - Purification :

Au résidu repris par 1 ml de chloroforme on additionne un mélange d'éther éthylique et d'éther de pétrole jusqu'à louche. Cette solution maintenue 1 nuit à +4° C, laisse déposer des aiguilles blanches. Ces cristaux sont recueillis sur büchner, puis séchés sous pression réduite sur P₂O₅.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique sur Silicagel G dans le système-solvant CHCl₃/CH₃OH (9:2) du produit obtenu, nous révèle la présence de deux constituants : les anomères α et β du méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside (Rf respectifs : 0,69 et 0,54).

Par fractionnement de ce mélange sur colonne de gel de silice dans le système-solvant CHCl₃/CH₃OH (9:2) il a été possible d'isoler l'anomère α .

Constantes physiques :

F exp 192° C ; (α)_D²⁵ +151° (c 1 dans le méthanol). JEANLOZ (118) donne pour le méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside : F 192-193° C ; (α)_D²⁵ +152° \pm 3° (c 0,447 dans le méthanol).

Analyse en I.R de l'anomère α :

λ ^{KBr}
_{Max} 3500-3350 (OH), 3300 (N-H), 2920, 2830 (C-H), 1640 (amide I), 1550 (amide II), 840 (C-H équatorial, anomérie α), 1470, 1375, 1190, 1155, 1140, 1125, 1100, 1080, 1060, 1040, 970, 750, 670 cm⁻¹.

Analyse en R.M.N à 90 MHz, référence HMS externe, solvant D₂O:

τ 5,52 (1 doublet J = 4 Hz, 1 proton équatorial, anomérie α), τ 6,56 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,58 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxy), τ 6,75 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 8,12 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

Le spectre en I.R du produit isolé présente une bande d'absorption vers 3500-3350 cm⁻¹ due à la vibration d'un groupement hydroxyle. L'analyse en R.M.N ne présente plus de massif vers τ 2,70 relatif aux groupements

aromatiques. La détritylation du méthyl di-O-méthyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside a bien eu lieu, et nous a permis d'isoler la méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside avec un rendement de 40 %.

d) Préparation du chlorhydrate du di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose :

1. Principe.

Le méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside est hydrolysé par l'acide chlorhydrique.

2. Mode opératoire.

2 mg de dérivé méthylé sont hydrolysés dans un tube scellé sous vide, par 2 ml d'acide chlorhydrique 4 N pendant 4 heures à 100° C. La solution obtenue est évaporée plusieurs fois sous pression réduite en présence de méthanol.

3. Résultat.

L'analyse chromatographique à l'auto-analyseur d'acides aminés du sirop obtenu montre la présence d'un constituant unique, identifié au di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

C.- Conclusions.

Les dérivés tritylés des méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannosides nous ont permis de synthétiser le méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside avec un rendement global de 32 % par rapport au dérivé mono-méthylé utilisé comme substrat de départ.

Les constantes physiques des anomères β du méthyl O-méthyl-3 O-trityl-6 et du méthyl di-O-méthyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannosides ont été décrites pour la première fois.

VI.- PREPARATION DU CHLORHYDRATE DU DI-O-METHYL-4,6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

A.- Principe.

Nous nous sommes proposés de suivre l'un des deux chemins réactionnels suivants (Fig. 16 , p. 86 et Fig. 17 , p. 87) en vue de préparer le chlorhydrate du di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-gluco-pyrannose.

- Préparation du méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyrannoside à partir du méthyl acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyrannoside.

- L'hydroxyle porté par le carbone 3 est bloqué sous forme d'ester benzoïque ou d'éther benzylique.

- Une hydrolyse acide sélective libère les hydroxyles portés par les carbones 4 et 6.

- Le dérivé benzoylé ou le dérivé benzylé est soumis à une méthylation totale.

- On effectue ensuite une hydrolyse chlorhydrique du dérivé méthylé obtenu après débenzoylation par le méthanolate de sodium, ou après débenzoylation par réduction catalytique.

B.-Procédés.

a) Préparation du méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyrannoside :

- *Procédé de ROTH et PIGMAN (119) :*

1. Principe.

Le O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyrannose (voir p. 101) est méthylosidé par l'action du sulfate de méthyle en présence de soude.

2. Mode opératoire.

Le O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyrannose (4,6g) est dissous dans 25 ml d'une lessive de soude à 7,4 %. On additionne ensuite 1,8 ml de diméthyl sulfate. Le mélange réactionnel est maintenu 1 heure sous agitation énergique ; il devient rapidement semi-cristallin (Précipité I).

Le précipité (I) est filtré, lavé à l'eau (1,6 g). Les eaux de lavage sont concentrées, puis laissées 24 h. à +4° C, un précipité floconneux (II) apparaît (1,1 g).

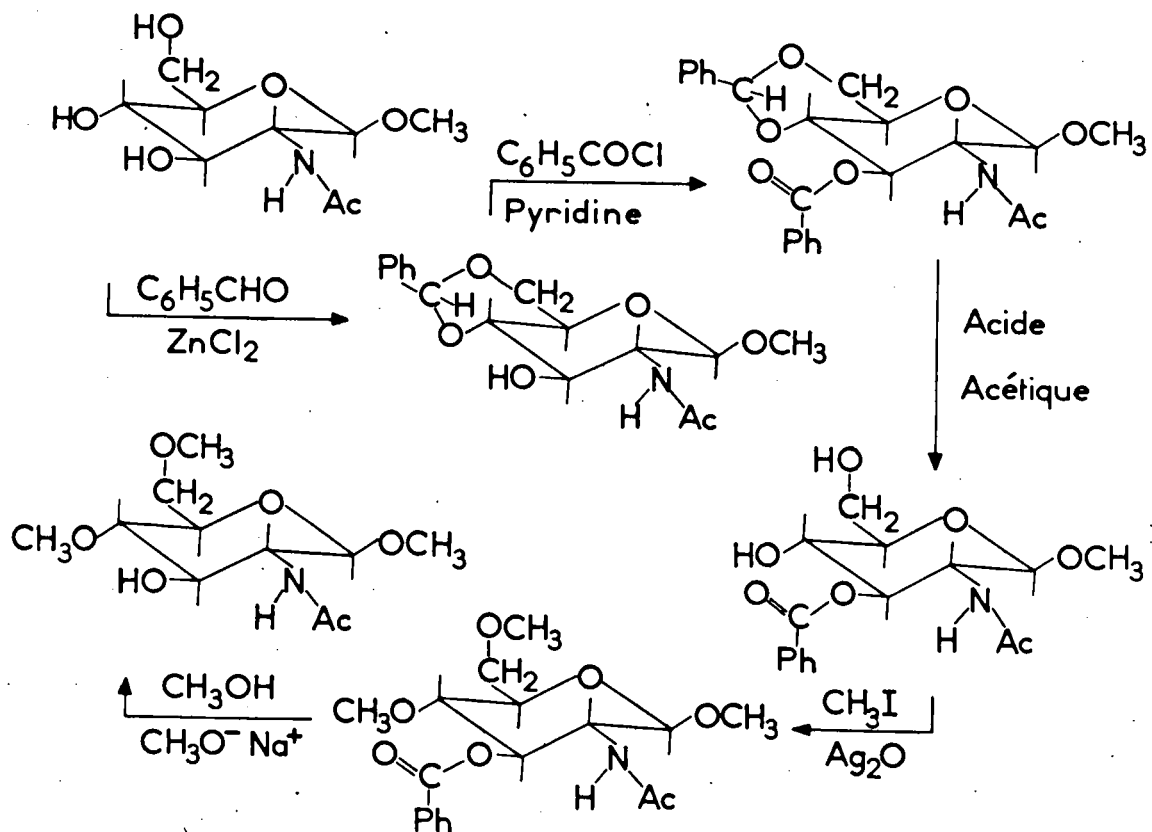


Figure 16

Schéma de synthèse du méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy 2 β-D-glucopyranoside, à partir de dérivés benzoylés.

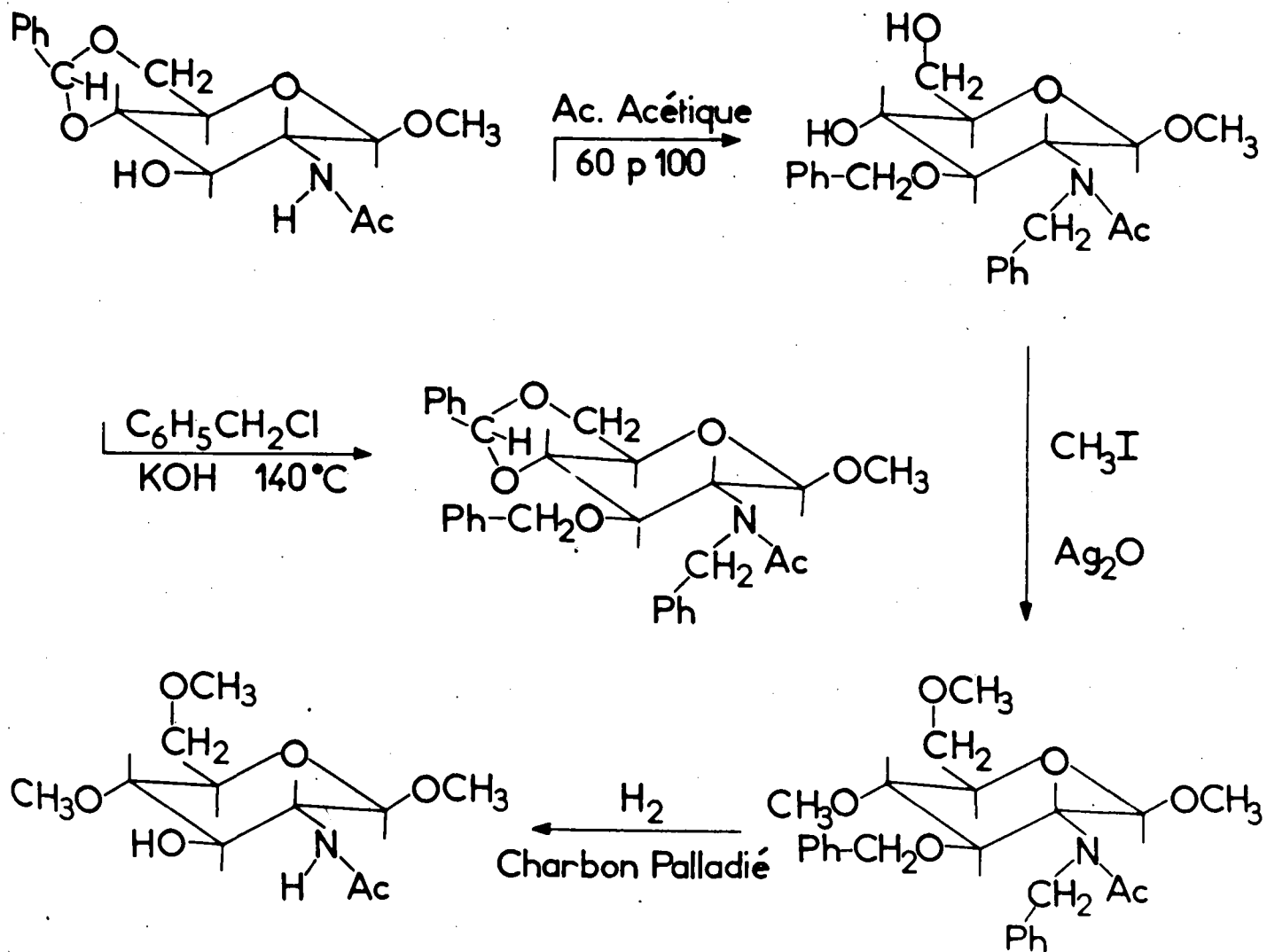


Figure 17

Schéma de synthèse du méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyranoside, à partir de dérivés benzylés.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) nous révèle :

- que le résidu I est constitué d'un mélange d'anomère α et β du méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside, et de méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 α et β -D-glucopyrannosides.

- que le résidu II contient uniquement un mélange d'anomères α et β du méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.

Analyse en I.R dans le nujol :

λ $\begin{matrix} \text{KBr} \\ \text{Max} \end{matrix}$ 3600-3400 (OH), 3290 (N-H), 3080 (C-H, noyau aromatique), 1650 (amide I), 1550 (amide II), 750, 700 (C-H déformation hors du plan, noyau aromatique), 1460, 1370, 1315, 1250, 1190, 1180, 1090, 1030, 975, 955, 930, 870, 850 cm^{-1} .

- *Procédé de NEUBERGER (120) :*

1. Principe.

Le méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside est substitué par les carbones 4 et 6 par un groupement benzylidène, par l'action du benzaldéhyde en présence d'un catalyseur acide tel que le chlorure de zinc.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

Le méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside (3 g) est mis en suspension dans du benzaldéhyde (9 ml) en présence de chlorure de zinc (3 g). Le mélange est laissé 24 h. sous agitation à température ambiante.

β - Extraction et purification :

50 ml d'eau sont additionnés au mélange réactionnel. Il se forme aussitôt un résidu blanc pâteux.

On filtre le mélange sur verre fritté, et le résidu est lavé plusieurs fois avec de l'éther de pétrole (3 x 50 ml).

Le précipité blanc est recristallisé dans le méthanol.

Le mélange réactionnel obtenu est abandonné une nuit à +4° C. Très rapidement des cristaux prismatiques de chlorure de pyridinium se déposent.

β - Extraction et purification :

Le mélange réactionnel est filtré. Le filtrat est repris par 300 ml de chloroforme. Cette phase organique est ensuite lavée par :

- 2 x 100 ml d'eau glacée.
- 3 x 100 ml d'une solution glacée d'acide sulfurique à 5 %.
- 3 x 100 ml d'une solution saturée en bicarbonate de sodium.
- 3 x 100 ml d'eau.

La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, puis concentrée par évaporation sous pression réduite.

Le sirop, repris par un peu de chloroforme, est cristallisé par addition d'éther éthylique.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) du produit isolé nous révèle la présence de deux composés, devant être les anomères α et β du méthyl O-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside (Rf respectifs 0,84 et 0,71).

Analyse en I.R dans le nujol :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3300 (N-H), 3080 (C-H, noyau aromatique), 1720 (C=O, ester), 1650 (amide I), 1560 (amide II), 750, 715, 700 (C-H déformation hors du plan, noyau aromatique), 1450, 1300, 1270, 1180, 1110, 1090, 1060, 1030, 1005, 950 cm^{-1} .

Rendement 60 %.

L'anomère α du méthyl O-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside a été isolé après chromatographie sur colonne de gel de silice dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

F exp 210° C. JEANLOZ (123) propose 212-216° C.

4. Conclusions.

Le spectre en I.R du produit isolé présente une bande d'absorption à 1720 cm^{-1} caractéristique d'une liaison ester. L'action du chlorure de benzoyle n'a pas provoqué une N-benzoylation de la fonction acétamide du

fait de la présence des bandes d'absorption en I.R à 3300 cm^{-1} (N-H) et 1560 cm^{-1} (amide II).

Le méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside soumis à l'action du chlorure de benzoyle mène à la synthèse du méthyl O-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside.

c) Préparation du méthyl O-benzoyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside :

1. Principe.

Le groupement benzylidène du méthyl O-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside est éliminé par une hydrolyse acide sélective.

2. Mode opératoire.

1,6 g de méthyl O-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 α et β -gluco-pyranosides sont dissous dans 60 ml d'acide acétique glacial au bain-marie bouillant. Dès que la solution est limpide, on y ajoute 40ml d'eau goutte à goutte. On poursuit l'hydrolyse pendant 30 minutes.

La solution refroidie est concentrée à un sirop. Les dernières traces d'acide acétique sont éliminées par entraînement azéotropique avec du toluène (3 x 10 ml).

Il n'a pas été possible de cristalliser le sirop obtenu, même après chromatographie sur colonne de silice.

3. Résultats.

Deux produits sont révélés après chromatographie du sirop sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

Analyse en I.R dans le nujol :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3600-3400 (OH), 3300 (N-H), 3080 (C-H, noyau aromatique), 1720 (C=O, ester), 1660 (amide I), 1550 (amide II), 715 (C-H déformation hors du plan, noyau aromatique) cm^{-1} .

4. Conclusions.

L'analyse en I.R. du produit isolé nous confirme la présence de fonctions hydroxyles libres ($3600\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$) et d'une fonction ester (1720 cm^{-1}) ; la fonction amide est préservée au cours de l'hydrolyse (3300 , 1660 et 1550 cm^{-1}).

Le produit obtenu doit être un méthyl mono-O-benzoyl acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.

d) Préparation du méthyl O-benzoyl-3 di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le produit isolé précédemment est méthylé par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent.

2. Mode opératoire.

Le sirop, obtenu après débenzylidénation du méthyl O-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside, dissous dans 2 ml d'acétone, est soumis à l'action de l'iodure de méthyle (20 ml) en présence d'oxyde d'argent (1 g). La réaction se fait sous agitation et à reflux pendant une nuit.

On effectue un deuxième et un troisième cycle de méthylation, en ajoutant, chaque fois, 5 ml d'iodure de méthyle et 1 g d'oxyde d'argent.

Le mélange refroidi est filtré sur verre fritté. Le résidu d'oxyde d'argent est lavé au méthanol (3 x 20 ml).

Les filtrats sont réunis, et la phase organique est concentrée par évaporation sous pression réduite. Les dérivés méthylés sont précipités par addition à la phase organique concentrée d'éther éthylique.

3. Résultats - Conclusion.

L'analyse chromatographique sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) nous révèle la présence de deux constituants, pouvant être deux anomères.

e) Préparation du méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside et de son produit d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique :

1. Principe.

Le dérivé perméthylé est O-débenzoylé par l'action du méthanolate de sodium.

2. Mode opératoire.

α - Débenzoylation :

Le dérivé benzoylé séché sur P_2O_5 est repris par 10 ml de méthanol anhydre. On y ajoute 3 ml de méthanolate de sodium (à 0,5 %).

Après 2 heures on neutralise la solution par addition de Dowex 50x8 ("mesh" 25-50, H^+). Après filtration, la solution est concentrée par évaporation sous pression réduite.

Au sirop obtenu, repris par du méthanol, on additionne un mélange d'éther éthylique et d'éther de pétrole. La solution laissée 24 heures à $+4^\circ C$ abandonne des cristaux en aiguilles.

β - Hydrolyse chlorhydrique :

2 mg de dérivé méthylé sont hydrolysés dans un tube scellé sous vide, par 2 ml d'acide chlorhydrique 4 N pendant 4 heures à $100^\circ C$. La solution obtenue est évaporée plusieurs fois sous pression réduite en présence de méthanol.

3. Résultats.

Les cristaux isolés après débenzoylation sont homogènes en chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $CHCl_3/CH_3OH$ (9:1).

Analyse en I.R dans le nujol :

$\lambda_{\text{KBr}}^{\text{Max}}$ 3440 (OH), 3300 (N-H), 1640 (amide I), 1550 (amide II), 840 (C-H équatorial, anomérie α), 1190, 1155, 1140, 1125, 1100, 1040, 970 cm^{-1} .

F exp $190^\circ C$. JEANLOZ (124) donne respectivement pour le méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside F $192^\circ C$, et pour le méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside F $200^\circ C$.

L'analyse chromatographique à l'auto-analyseur d'acides aminés du hydrolysate obtenu montre la présence d'un constituant unique, identifié au di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

4. Conclusions.

Les constantes physiques et physico-chimiques du dérivé méthylé isolé tentent à prouver qu'il ne s'agit pas du méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside.

L'analyse chromatographique à l'auto-analyseur d'amino-acides de l'hydrolysate chlorhydrique confirme ces résultats, et permet d'identifier le dérivé méthylé isolé au di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-gluco-pyranose.

L'hydrolyse par l'acide acétique du méthyl O-benzyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside a entraîné l'élimination du groupement benzylidène et une migration du radical benzoyl de l'oxygène porté par le carbone 3 sur l'oxygène du carbone 6 (voir Fig. 18 , p. 95).

f) Préparation du méthyl O-benzyl-3 O-benzylidène-4,6 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β-D-gluco-pyranoside :

1. Principe.

L'hydroxyle libre porté par le carbone 3 du méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-gluco-pyranoside est bloqué sous forme d'éther benzylique par le chlorure de benzyle en présence de potasse.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

2 g de méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-gluco-pyranoside sont mis en suspension dans 20 ml de chlorure de benzyle en présence de 10 g de potasse broyée.

La réaction s'effectue sous agitation à reflux à 130° C dans un bain-marie d'huile pendant 3 heures.

β - Extraction :

Au mélange réactionnel refroidi on ajoute 60 ml de chloroforme. On filtre, le résidu est lavé au chloroforme.

Les phases organiques sont réunies, lavées à l'eau puis décantées, ceci jusqu'à neutralité des eaux de lavage.

La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, puis concentrée par évaporation sous pression réduite.

γ - Purification :

Le sirop obtenu est purifié par passage sur colonne de silice dans le système-solvant $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH} / \text{CH}_3\text{COOH}$ (1000:10:1).

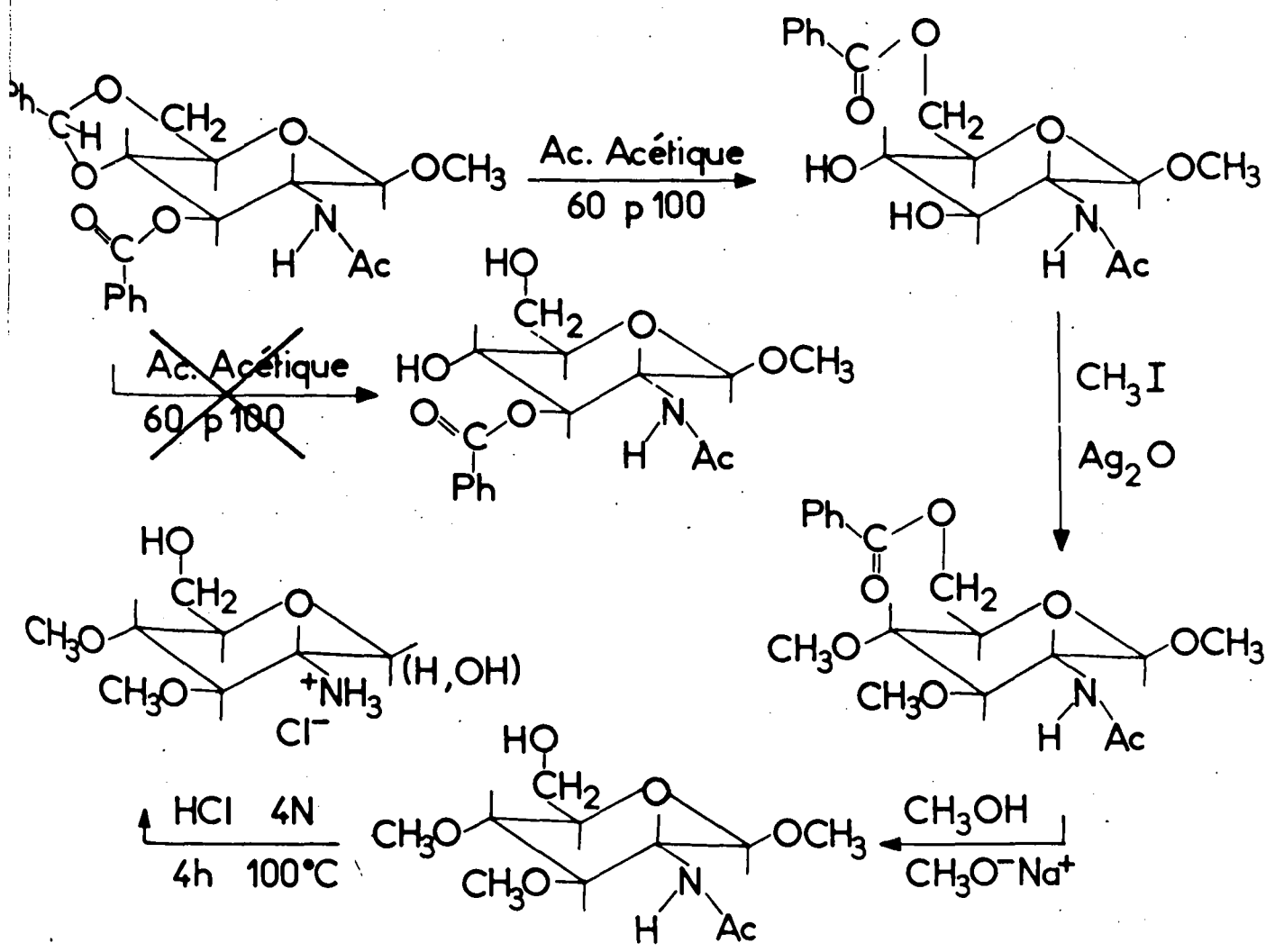


Figure 18

Schéma d'action de l'acide acétique à 60 % sur le méthyl 0-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyranoside.

3. Résultats.

Le sirop obtenu après purification (830mg) est homogène en chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (100:1) (Rf 0,73).

Analyse en I.R :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3080 (C-H, noyau aromatique), 2940, 2860 ($-\text{CH}_2-$), 1650 (amide I), 1190 (C-O), 750, 695 (C-H déformation hors du plan, noyau aromatique), 3060, 3030, 3000, 1500, 1455, 1420, 1385, 1370, 1310, 1275, 1240, 1210, 1170, 1030, 990, 920, 660 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 90 MH_2 , référence TMS, solvant CDCl_3 :

τ 2,71 (1 singulet, 10 protons, 2 noyaux aromatiques), τ 2,82 (1 singulet, 5 protons, 1 noyau aromatique), τ 5,38 (1 doublet $J = 4\text{Hz}$, 1 proton), τ 7,10 (1 singulet, 2 protons, CH_2 benzyl), τ 7,71 (1 singulet, 2 protons, CH_2 benzyl), τ 7,87 et 8,06 (1 singulet, 1 proton, 1 acétamido).

4. Conclusions.

La benzylation du méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D- glucopyrannoside s'accompagne d'une N-benzylation, comme le montre l'absence de la bande (N-H) à 3300 cm^{-1} et de la bande amide II en I.R, et la présence en R.M.N des singulets à τ 2,71 et 2,82 relatifs à trois noyaux aromatiques.

g) Préparation du méthyl O-benzyl-3 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le méthyl O-benzyl-3 O-benzylidène-4,6 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside est soumis à une hydrolyse acide sélective pour libérer les hydroxyles portés par les carbones 4 et 6.

2. Mode opératoire.

600 mg de méthyl O-benzyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside sont dissous dans 15 ml d'acide acétique glacial au bain-marie bouillant. On ajoute ensuite goutte à goutte 10 ml d'eau. L'hydrolyse est poursuivie à chaud 30 minutes.

La solution refroidie est concentrée par évaporation sous pression réduite en sirop.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique, sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) du sirop obtenu, révèle la présence de deux constituants en quantités approximatives égales (Rf : 0,58 et 0,29).

Analyse en I.R. :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3350 (OH), 3080, 3060, 3030 (=C-H, noyau aromatique), 2940 (CH_2), 1720 (C=O, ester), 1630 (amide I), 1500 (C=C, noyau aromatique), 1150 (C-O, éther), 880 (C-H axial, anomérie β), 730, 700 (C-H déformation hors du plan, noyau aromatique), 2985, 1450, 1420, 1380, 1360, 1300, 1270, 1250, 1210, 1030, 990 cm^{-1} .

Ce spectre I.R nous révèle une bande d'absorption inattendue à 1720 cm^{-1} . Cette bande d'absorption pourrait être due à une liaison ester. En effet une fraction aliquote du sirop obtenu après débenzylidénation, soumise à l'action du méthanolate de sodium, n'absorbe plus à 1720 cm^{-1} .

4. Conclusion.

La débenzylidénation du méthyl O-benzyl-3 O-benzylidène-4,6 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside s'accompagne d'une estérification partielle du produit libéré.

h) Préparation du méthyl O-benzyl-3 di-O-méthyl-4,6 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le méthyl O-benzyl-3 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside est soumis à une méthylation totale par iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent.

2. Mode opératoire.

Du méthyl O-benzyl-3 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside est dissous dans 10 ml d'iodure de méthyle en présence de 0,5 g d'oxyde d'argent. Le mélange est maintenu sous agitation à reflux (47° C) pendant une nuit à l'abri de la lumière.

On effectue un deuxième cycle de méthylation en additionnant au mélange réactionnel 10 ml d'iodure de méthyle et 0,5g d'oxyde d'argent.

Le mélange est filtré ; le résidu est lavé au chloroforme.

Les phases organiques sont réunies, puis concentrées par évaporation sous pression réduite.

3. Résultats.

Le sirop obtenu est homogène en chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (100:1) (R_f 0,40).

Analyse en I.R :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3080, 3060, 3030 (=C-H, noyau aromatique), 2940 (C-H aliphatique), 1650 (amide I), 1500 (C=C, noyau aromatique), 1120, 1070 (C-O, éther), 740-730, 700 (C-H déformation hors du plan, noyau aromatique), 1460, 1420, 1390, 1360, 1320, 1280, 1210, 1030, 990, 940, 910 cm^{-1} .

4. Conclusion.

Le diagramme en I.R ne révèle aucune bande d'absorption au niveau des hydroxyles, la méthylation du méthyl O-benzyl-3 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside a donc été complète.

i) Préparation du méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Les groupements benzyliques sont éliminés par hydrogénation catalytique sur charbon palladié.

2. Mode opératoire.

Le dérivé perméthylé est dissous dans 4 ml du système-solvant éthanol/acétate d'éthyle (4:1).

200 mg de charbon palladié à 5 % (MERCK) sont introduits dans la solution, qui est ensuite acidifiée par l'addition de 1 ml d'acide acétique glacial.

Le mélange est agité 24 à 36 h. sous atmosphère d'hydrogène.



Après filtration, le charbon est lavé avec de l'éthanol (3 x 5 ml). Les phases organiques sont réunies puis concentrées à un sirop par évaporation sous pression réduite.

3. Résultats.

Le sirop obtenu est homogène en chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) (R_f : 0,70).

4. Conclusion.

L'hydrogénation catalytique du méthyl O-benzyl-3 di-O-méthyl-4,6 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside provoque une O et N débenzylation.

j) Préparation du chlorhydrate du di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose :

1. Principe.

Le méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside est hydrolysé par l'acide chlorhydrique.

2. Mode opératoire.

Le méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside (\approx 2 mg) est hydrolysé dans un tube scellé sous vide par de l'acide chlorhydrique 4 N (2 ml) pendant 4 heures à 100° C.

L'hydrolysate est évaporé plusieurs fois sous pression réduite en présence de méthanol.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique à l'auto-analyseur d'acides-amino du sirop obtenu montre la présence d'un seul constituant, qui possède le même comportement que le di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

C.- Conclusions.

Il ne nous a pas été possible de synthétiser le méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside à partir du méthyl O-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside. En effet, l'hydrolyse par l'acide acétique du méthyl-O-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-

2 D-glucopyrannoside provoque l'élimination du groupement benzylidène et une migration du groupement benzoyle de l'oxygène porté par le carbone 3 sur l'oxygène porté par le carbone 6. De ce fait, le produit obtenu, perméthylé puis débenzoylé mène à la préparation du méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.

Nous nous sommes proposés d'utiliser un dérivé benzylé plus stable à l'hydrolyse acide qu'un dérivé benzoylé.

L'action du chlorure de benzyle sur le méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside mène à la synthèse du méthyl O-benzyl-3 O-benzylidène-4,6 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside. Ce dérivé benzylé, soumis à une hydrolyse acétique, méthylé, puis hydrogéné catalytiquement, mène à la synthèse du méthyl di-O-méthyl-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.

VII.- SYNTHÈSE DU CHLORHYDRATE DU MONO-O-MÉTHYL-3 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE.

A.- Principe.

La synthèse du chlorhydrate du mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose s'effectue selon le chemin réactionnel suivant (Fig. 19 , p. 101):

- Préparation de la N-acétyl glucosamine (acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose) à partir du chlorhydrate de glucosamine (amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose).
- Substitution de la N-acétyl glucosamine par un groupement benzylidène.
- Méthylation du dérivé benzylidéné de la glucosamine.
- Débenzylidénation du dérivé méthylé.
- Passage au chlorhydrate du mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose par hydrolyse.

B. Procédés.

a) Préparation de la N-acétyl glucosamine :

1. Principe.

La glucosamine (amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose) est N-acétylée, selon un procédé dérivé de celui de LEVY et Mc ALLAN (125), par l'anhydride acétique en présence de soude.

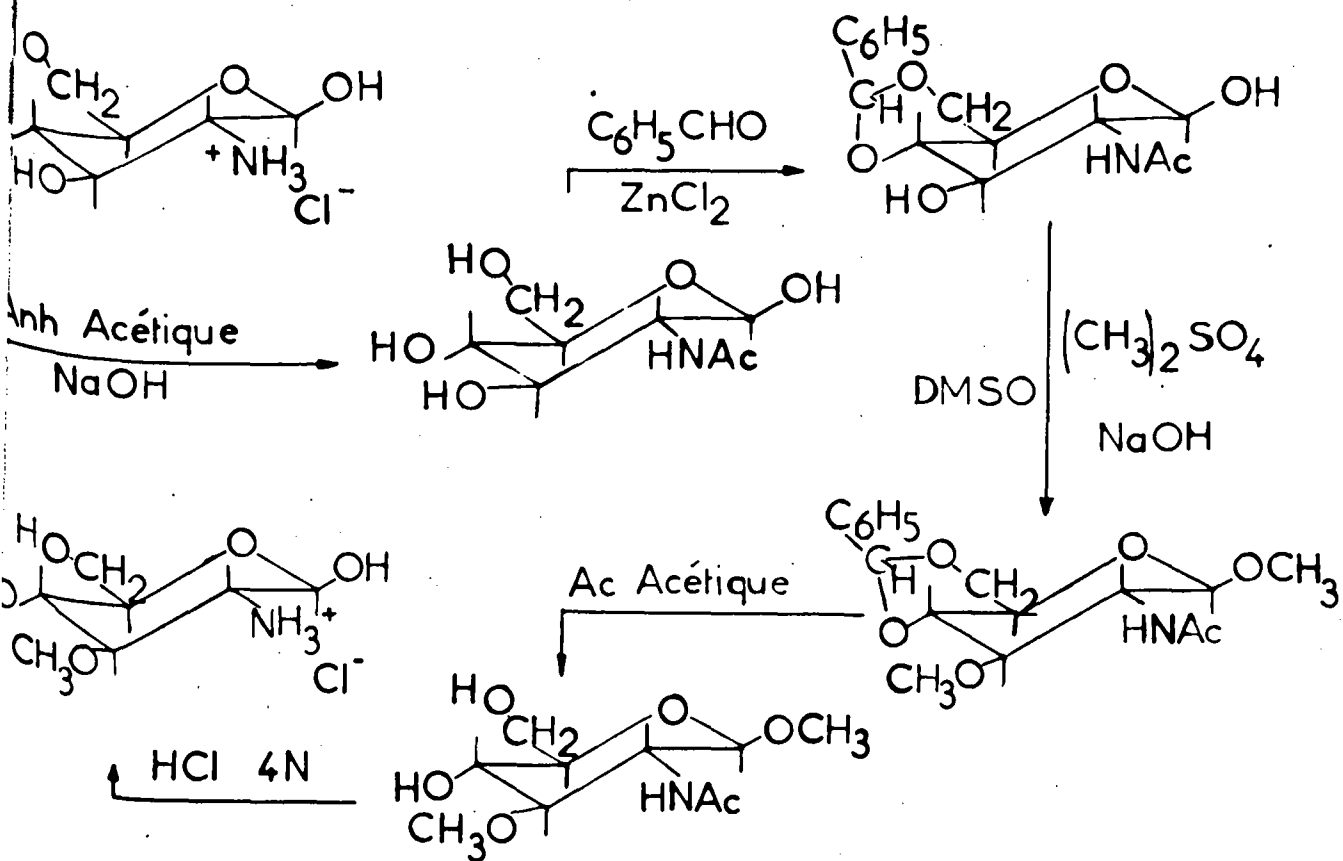


Figure 19

Schéma de synthèse du 0-méthyl-3-amino-2-désoxy-2-D-glucopyranose.

2. Mode opératoire.

Le chlorhydrate de glucosamine (10 g) est dissous dans 60 ml d'eau contenant un équivalent de soude (2 g). On additionne ensuite 7 ml d'anhydride acétique. On laisse le mélange 20 minutes sous agitation énergique. L'évaporation sous pression réduite de la solution nous donne un résidu cristallin blanc, que l'on reprend par 250 ml d'eau. Cette solution est déminéralisée par passage successif sur une colonne (2 x 30 cm) de Dowex 50 x 8 (H⁺), et une colonne (2 x 30 cm) de Duolite A 102 D (HCOO⁻). L'éluat obtenu après rinçage des colonnes avec 500 ml d'eau distillée est évaporé sous pression réduite. Le produit est recristallisé dans l'éthanol.

3. Résultat et discussion.

On obtient ainsi la N-acétyl-glucosamine qui est homogène en chromatographie sur papier Whatman n° 3, dans le système-solvant n-butanol/ acide acétique/eau (4:1:5) après révélation au réactif à l'oxalate d'aniline (Rf : 0,32).

Rendement : 87 % ; F exp : 192° C ; th : 198-200° C ;
(α)_D^{24° C} exp + 63,3° $\xrightarrow{26 \text{ h.}}$ + 37,6° ; th + 37° (c : 1 dans l'eau).

L'utilisation des résines échangeuses d'ion nous a permis d'isoler rapidement la N-acétyl glucosamine. Cette technique est préférable à celle préconisée par LEVY et Mc ALLAN (126), qui réalisaient des extractions méthanoliques, et qui devaient recristalliser plusieurs fois leur produit, pour éliminer les dernières traces de chlorure de sodium.

b) Préparation du O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose :

1. Principe.

Les groupements hydroxyles portés par les carbones 4 et 6 de la N-acétyl glucosamine sont substitués par un groupement benzylidène selon le procédé de ROTH et PIGMAN (127).

2. Mode opératoire.

8 g de N-acétyl glucosamine et 5 g de chlorure de zinc (pur pour analyse) finement pulvérisé sont dissous sous agitation dans 20 ml de benzaldéhyde fraîchement redistillé sous pression réduite. Le mélange est maintenu 12 heures à 20° C, sous agitation constante ; il devient semi-cristallin ; il

est lavé 3 fois par 100 ml d'éther de pétrole (35°-65°), 2 fois par 100 ml d'eau distillée. Le résidu est dissous à reflux dans 500 ml du mélange méthanol/acétone (4:1). La solution limpide est refroidie lentement et laisse déposer de longues aiguilles blanches après un séjour de 24 h. à 4° C.

3. Résultats et discussion.

La réaction s'effectue avec un rendement de 67 %. Les cristaux possèdent un point de fusion mal défini (fusion pâteuse) de 245 à 247° C ROTH et PIGMAN donnent un point de fusion de 247-248° C pour le O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannose.

$(\alpha)_{D, 24^{\circ} C}^{1\%}$ dans la pyridine : 34,9° → 37° après 24 h., $t_h = + 38,2^{\circ}$ (ROTH et PIGMAN (128)).

ROTH et PIGMAN (129) cristallisaient le O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose à partir d'une solution aqueuse. Dans nos mains, cette technique ne nous a donné que des quantités insignifiantes de dérivés cristallisés, c'est pourquoi nous avons utilisé le mélange méthanol/acétone (4:1).

Analyse en I.R :

λ_{Max}^{KBr} 3460 (OH), 3280 (N-H), 3080 (C-H, noyau aromatique), 1620 (amide I), 1560 (amide II), 750, 700 (C-H hors du plan, noyau aromatique), 2940, 2900, 2860, 1450, 1430, 1370, 1340, 1320, 1270, 1210, 1160, 1120, 1100, 1060, 1030, 990, 970, 950, 930, 870, 750, 700, 640 cm^{-1} .

4. Conclusions.

L'analyse en I.R du produit isolé nous révèle la présence d'un hydroxyle libre (3460 cm^{-1}) d'un groupement aromatique (3080, 750, 700 cm^{-1}).

La N-acétyl glucosamine a bien été substituée par un groupement benzylidène.

c) Préparation du méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose est méthylé par le diméthylsulfate en présence de soude dans le diméthylsulfoxyde.

2. Mode opératoire.

Le O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucofuranose (5 g) est dissous dans le diméthylsulfoxyde (50 ml), la solution est refroidie dans l'eau glacée jusqu'à l'apparition de cristaux. On ajoute alors 10 ml de diméthylsulfate et 9 g de soude dissous dans 10 ml d'eau distillée. On laisse la température s'élever jusqu'à un maximum de 60° C. La solution, qui devient rapidement blanchâtre est agitée pendant une heure. Le mélange réactionnel est versé dans 1.000 ml d'eau glacée, afin de précipiter le dérivé méthylé. Le précipité est filtré, lavé abondamment à l'eau glacée, puis cristallisé dans le méthanol pour donner le produit (1).

La phase méthanolique ayant servi à la cristallisation est récupérée, puis évaporée à faible volume sous pression réduite. Le sirop obtenu cristallise après un séjour de 24 h. à +4° C, pour donner le produit (2).

3. Résultats et discussion.

Après un séjour de 24 h. à l'étuve sous vide à 50° C, on obtient 9,0 g du produit (1) (soit un rendement de 89 %) et 1,0 g du produit (2).

L'analyse chromatographique en couche mince de Silicagel G dans le système-solvant chloroforme/méthanol (90:10), illustrée par la figure 20, p. 105) nous a révélé :

- que le produit (1) est composé d'un mélange d'anomères α et β du méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucofuranoside.

- que le produit (2) est composé d'un mélange d'anomères α et β du méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucofuranoside et du méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucofuranoside.

L'expérience nous a montré que la température de réaction a beaucoup d'importance. L'utilisation d'une température inférieure à 60° C amène la formation d'une quantité appréciable de méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucofuranoside. En menant la réaction à une température supérieure à 60° C, des produits de décomposition jaune-brun apparaissent, ce qui provoque une diminution du rendement de la réaction de 89 % à 60 %.

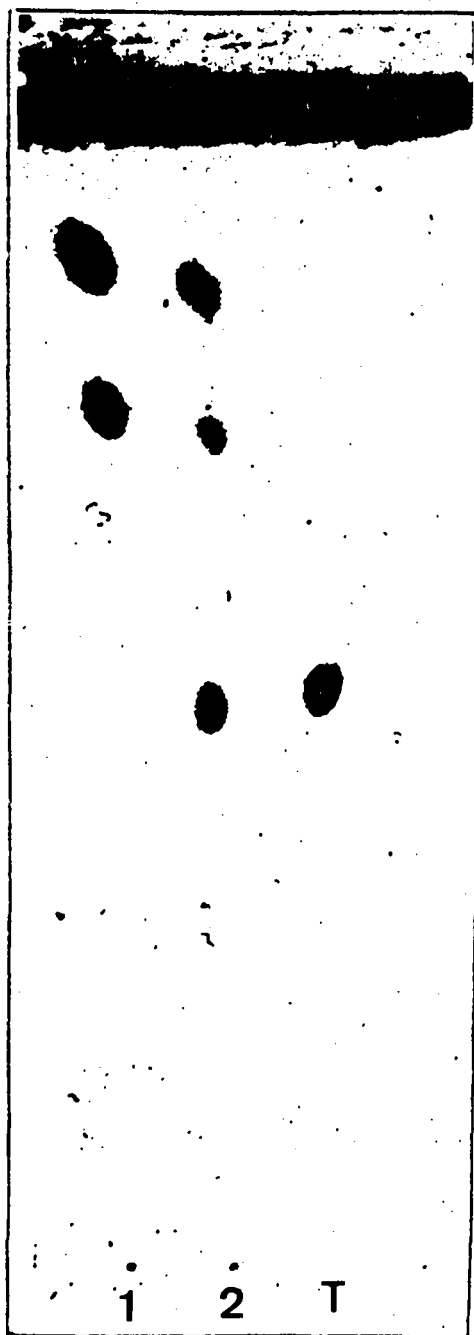


Figure 20

Chromatographie en couche mince de Silicagel G dans le système-solvant chloroforme/méthanol (9:1).

1 : Méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 α et β D-glucopyranoside (produit (1)).

2 : Produit (2).

T : Témoin constitué d'un mélange d'anomères α et β du méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyranoside.

La détermination du pouvoir rotatoire spécifique du produit

(1) : $(\alpha)_D^{24} - 38,8^\circ$ (c : 0,5 dans le diméthylsulfoxyde)

$(\alpha)_D^{24} - 24,3^\circ$ (c : 0,5 dans le chloroforme)

nous permet de préciser qu'il est composé d'une forte proportion d'anomère β du méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside. En effet, ROTH et PIGMAN (130) donnent pour l'anomère α : $(\alpha)_D^{20} + 50,4^\circ$ (c : 0,5 dans le chloroforme) et pour l'anomère β : $(\alpha)_D^{20} - 64,7^\circ$ (c : 0,5 dans le diméthylsulfoxyde).

Analyse en I.R :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3280 (N-H), 3080 (C-H, noyau aromatique), 1650 (amide I), 1550 (amide II) 1080 (C-O, éther), 750, 700 (C-H, hors du plan, noyau aromatique), 3080, 2990, 2940, 2920, 2865, 2840, 1450, 1370, 1320, 1295, 1280, 1230, 1215, 1180, 1150, 1060, 1030, 1000, 975, 950, 930, 870, 650 cm^{-1} .

4. Conclusions.

L'absence de bande d'absorption en I.R vers 3450 cm^{-1} (OH) confirme que la méthylation du O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose a été totale. Les bandes d'absorption à 3280 cm^{-1} (N-H) et à 1550 cm^{-1} (amide II) prouvent que le procédé de méthylation utilisé n'entraîne pas de substitution sur l'azote.

d) Préparation du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le groupement benzylidène du méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside est éliminé par une hydrolyse acide sélective.

2. Mode opératoire.

3 g de méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside sont mis en suspension dans 20 ml d'acide acétique à 60 %. Le mélange devient limpide au cours d'un chauffage à reflux de 30 minutes au bain-marie bouillant. La solution claire obtenue est évaporée à faible volume sous pression réduite. Le sirop obtenu est repris par 20 ml de méthanol. Cette solution méthanolique est décolorée sur charbon actif, filtrée, puis évaporée à siccité sous pression réduite. Le produit obtenu est cristallisé dans l'alcool.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique en couche mince de Silicagel G dans les système-solvants chloroforme/méthanol (9:1) et acétate d'éthyle/méthanol (3:1) montre la présence d'un mélange d'anomères α et β du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside.

La détermination du pouvoir rotatoire spécifique de ce mélange nous permet de préciser qu'il est constitué par 52,5 % d'anomère β du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside : $(\alpha)_D^{24} \text{ exp} + 32^\circ$ (c 1 dans l'eau). ROTH et PIGMAN (131) donnent pour l'anomère α , $(\alpha)_D^{20} + 118^\circ$ (c 1 dans l'eau), et pour l'anomère β , $(\alpha)_D^{20} - 45,0^\circ$ (c 2 dans l'eau). Le rendement est de 61 %.

Les anomères α et β ont pu être isolés du mélange par chromatographie sur silice dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{OH}$ (18:5).

4. Propriétés physiques et physico-chimiques du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-gluco-pyranoside.

F 221° C. NEUBERGER (132) propose F = 211° C pour le méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 α -D-gluco-pyranoside.

Analyse en I.R :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3500-3350 (OH), 3300 (N-H), 2820 (C-H, méthoxyl), 1640 (amide I), 1550 (amide II), 1060 (C-O, éther), 3060, 3000, 2985, 2665, 2200, 1470, 1450, 1415, 1370, 1350, 1330, 1300, 1280, 1230, 1180, 1160, 1120, 1090, 1050, 1040, 1025, 970, 950, 915, 900, 855, 760, 680 cm^{-1}).

Analyse en R.M.N à 90 MHz ; référence externe HMS, solvant D_2O :

- Anomère α :

τ 4,97 (1 doublet J = 4 Hz, 1 proton équatorial, anomérie α), τ 6,18 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,29 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 7,67 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

- Anomère β :

τ 5,29 (1 doublet J = 8 Hz, 1 proton axial, anomérie β), τ 6,24 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,23 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 7,71 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

5. Conclusions.

Les spectres en R.M.N des produits isolés confirment la présence de deux groupements méthoxyles et d'un groupement acétamido. L'anomère α du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside est caractérisé par le doublet du proton anomérique à τ 4,97 ($J = 4$ Hz), et l'anomère β par le doublet à τ 5,29 ($J = 8$ Hz).

e) Préparation du chlorhydrate du mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose :

1. Principe.

Le méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside est hydrolysé par l'acide chlorhydrique.

2. Mode opératoire.

Le méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside (2 mg) est hydrolysé dans un tube scellé sous vide par de l'acide chlorhydrique 4 N (2 ml) pendant 4 h.

La solution obtenue est évaporée plusieurs fois sous pression réduite en présence de méthanol.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique à l'auto-analyseur d'acides du sirop obtenu montre la présence d'un seul constituant qui possède le même comportement que le O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

C.- Conclusions.

Les dérivés du O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside nous ont permis de synthétiser le méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside avec un rendement de 47 %, par rapport au chlorhydrate de glucosamine utilisé comme substrat de départ. Nous avons isolé les anomères α et β du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside.

VIII.- SYNTHÈSE DU CHLORHYDRATE DU MONO-O-MÉTHYL-6 AMINO-2 DESOXY-2 D-GLUCO-PYRANNOSE.

A.- Principe.

Nous nous sommes proposés de suivre le chemin réactionnel suivant (Fig. 21 , p. 110) pour préparer le chlorhydrate du mono-O-méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose :

- L'hydroxyle porté par le carbone 6 du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside est bloqué sous forme d'éther par l'action du chlorure de trityle.
- Le dérivé tritylé est estérifié par le chlorure de benzoyle.
- On procède ensuite à la détritylation du méthyl di-O-benzoyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside par une hydrolyse acide sélective.
- Le dérivé benzoylé obtenu est méthylé.
- Le produit perméthylé est débénylé par l'action d'une base.
- Une hydrolyse chlorhydrique du dérivé méthylé obtenu libère le chlorhydrate du mono-O-méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

B.- Procédés.

a) Préparation du méthyl O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le chlorure de trityle en présence de pyridine réagit sélectivement sur la fonction alcool primaire du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

Le méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside (2 g) est dissous dans de la pyridine anhydre (20 ml). A la solution obtenue on ajoute du chlorure de trityle (3,2 g).

Le mélange réactionnel est maintenu 24 heures à la température ambiante. On achève la réaction en portant le mélange au bain-marie bouillant pendant 1 heure.

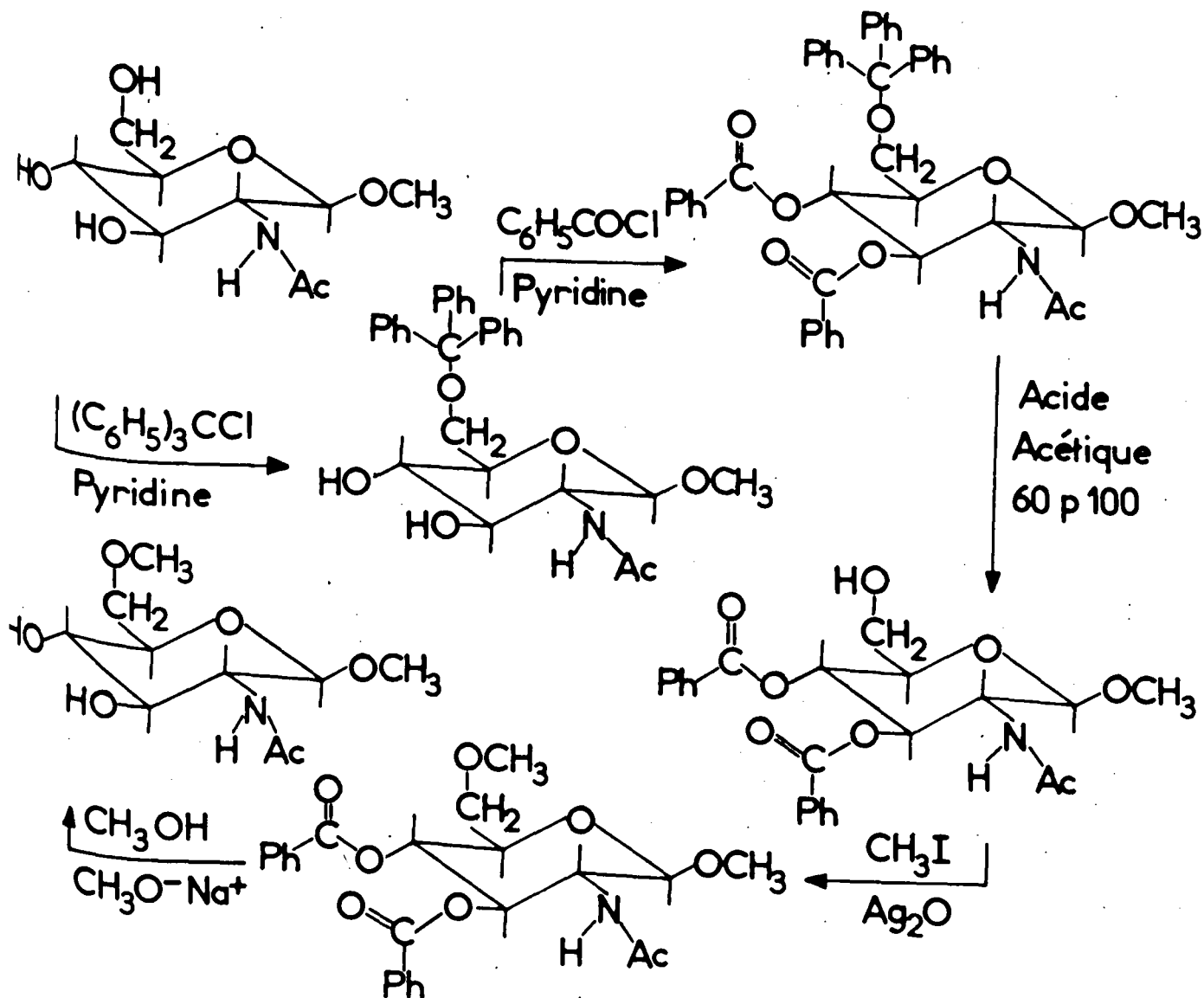


Figure 21

Schéma de synthèse du méthyl mono-O-méthyl-6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyranoside.

β - Extraction :

Le mélange réactionnel est repris par du chloroforme (70 ml). La phase organique est lavée à l'eau (2 x 30 ml), décantée, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre avant d'être concentrée. Les dernières traces de pyridine sont éliminées par entraînement azéotropique avec du toluène anhydre.

γ - Purification :

Le sirop est repris par 20 ml de méthanol chaud, cette solution en refroidissant laisse déposer des cristaux prismatiques (2,5 g).

3. Résultats.

Le produit isolé est homogène en chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:2) (R_f : 0,58).

Rendement : 75 % ; F 136° C, $(\alpha)_D^{25}$ - 51,4° (c 2 dans le chloroforme).

Analyse en I.R :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3600-3400 (OH), 3300 (N-H), 3080, 3060 (C-H, noyau aromatique), 2830 (C-H, méthoxyl), 1650 (amide I), 1555 (amide II), 1600, 1490, 1450 (C=C, noyau aromatique), 1060 (C-O, éther), 760, 700 (C-H hors du plan, noyau aromatique).

Analyse en R.M.N à 90 MHz , référence TMS, solvant CDCl_3 :

τ 2,71 (massif, 15 protons, 3 noyaux aromatiques), τ 5,64 (doublet $J = 8$ Hz, 1 proton axial, anomérie β), τ 6,48 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 8,06 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

L'analyse en I.R du produit obtenu nous révèle la présence d'hydroxyles libres ($3600-3400 \text{ cm}^{-1}$) et d'un groupement aromatique (3080, 3060, 1600, 1490, 1450, 760 et 700 cm^{-1}). Le spectre en R.M.N à 90 MHz nous précise que l'osamine est substituée par un groupement comportant trois noyaux aromatiques (τ 2,71) et par un groupement méthoxyle (τ 6,48) ; l'anomérie β est définie par la présence d'un doublet à τ 5,64 ($J = 8$ Hz).

L'action du chlorure de trityle sur le méthyl acétamido-2 désoxy β -D-glucopyrannoside mène à la synthèse du méthyl O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside, dont nous décrivons pour la première fois les propriétés physiques.

b) Préparation du méthyl di-O-benzoyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyranoside :

1. Principe.

Le méthyl O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyranoside est estérifié par le chlorure de benzoyle.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

Le méthyl O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyranoside (2 g) est dissous dans de la pyridine anhydre (20 ml). La solution obtenue est refroidie à -20° C. On additionne goutte à goutte du chlorure de benzoyle (1,5 ml) préalablement refroidi à 0° C. Le mélange réactionnel est maintenu 24 heures à 4° C.

β - Extraction :

On reprend le mélange réactionnel par du chloroforme (100 ml). La phase organique est lavée puis décantée avec :

- une solution de bisulfate de sodium saturée à +4° C (3 x 50 ml),
- une solution de bicarbonate de sodium saturée à +4° C (3 x 50 ml),
- puis avec de l'eau glacée (3 x 50 ml).

La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis concentrée en sirop par évaporation sous pression réduite.

γ - Purification :

Le sirop obtenu est purifié par fractionnement sur colonne de silice dans le système-solvant acétate d'éthyle/éther de pétrole (3:1).

3. Résultats.

Le produit isolé est homogène en chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans les système-solvants suivants : acétate d'éthyle /éther de pétrole (3:1) (Rf : 0,58), chloroforme/méthanol (9:1) (Rf : 0,77).

F 116° C, $(\alpha)_D^{25}$ - 56,1° (c 2 dans le chloroforme).

Analyse en I.R dans le nujol :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3280 (N-H), 3060 (C-H, noyau aromatique), 1735 (C=O, ester), 1660 (amide I), 1600 (C=C, noyau aromatique), 1560 (amide II), 760, 740, 725, 710, 700 (C-H hors du plan, noyau aromatique), 1310, 1280, 1260, 1220, 1175, 1150, 1120, 1090, 1070, 1045, 1000, 940, 900, 850, 640 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 90 MHz, référence TMS, solvant CDCl_3 :

τ 2,62 (massif, 25 protons, 5 noyaux aromatiques), τ 5,30 (1 doublet $J = 8$ Hz, 1 proton axial, anomérie β), τ 6,42 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 8,14 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

L'analyse en I.R du produit isolé nous confirme :

- que tous les hydroxyles sont bloqués par l'absence de bande d'absorption vers 3450 cm^{-1} .
- la présence de liaisons esters par une bande d'absorption caractéristique à 1735 cm^{-1} .
- la présence d'un groupement aromatique ($3060, 760-700 \text{ cm}^{-1}$).
- que la fonction acétamide est préservée au cours de la benzylation par la présence des bandes à 3280 cm^{-1} (NH), 1660 cm^{-1} (amide I) et 1560 cm^{-1} (amide II).

Le spectre en R.M.N à 90 MHz nous précise la présence de 5 noyaux aromatiques (τ 2,62), d'un groupement méthoxyle (τ 6,42) et d'un groupement acétamido (τ 8,14). Le doublet à τ 5,30 ($J = 8$ Hz) nous confirme l'anomérisation β .

Le chlorure de benzyle réagit sur le méthyl O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranoside pour donner le méthyl di-O-benzoyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranoside dont nous décrivons les propriétés physiques pour la première fois.

c) Préparation du méthyl di-O-benzoyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranoside :

1. Principe.

Le dérivé tritylé est soumis à une hydrolyse acide sélective.

2. Mode opératoire.

Le méthyl di-O-benzoyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2

β -D-glucopyrannoside (800 mg) est dissous dans l'acide acétique glacial (17 ml) au bain-marie bouillant. On additionne de l'eau (10 ml) goutte à goutte. La solution est maintenue 30 minutes au bain-marie bouillant. Le mélange réactionnel refroidi, puis additionné d'eau (20 ml) laisse déposer des cristaux de triphénylcarbinol. Ces cristaux sont filtrés, lavés à l'eau. Le filtrat et les eaux de lavage sont réunis puis concentrés par évaporation sous pression réduite. Les dernières traces d'acide acétique sont éliminées par évaporation avec du toluène anhydre.

Le sirop est purifié par chromatographie sur colonne de silice dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

3. Résultats.

Le produit isolé (400 mg) est homogène en chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans les système-solvants $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) (Rf 0,69) et acétate d'éthyle/éther de pétrole (3:1) (Rf : 0,26).

Rendement : 30 %. F 82°C , $(\alpha)_D^{25} - 83,3^\circ$ (c 2 dans le chloroforme).

Analyse en I.R dans le nujol :

$\lambda_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3600-3400 (OH), 3280 (N-H), 3060 (C-H, noyau aromatique), 1730 (C=O, ester) 1665 (amide I), 1600 (C=C, noyau aromatique), 1550 (amide II), 1500 (C=C, noyau aromatique), 1270, 1100 (C-O, ester d'acide benzoïque), 700 (C-H hors du plan), 1070, 1023 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 90 MHz , référence TMS, solvant CDCl_3 :

τ 2,70 (massif, 10 protons, 2 noyaux aromatiques), τ 5,15 (1 doublet $J = 8 \text{ Hz}$, 1 proton axial, anomérie β), τ 6,44 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 8,15 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

4. Conclusions.

La présence d'une bande d'absorption en I.R à 3500 cm^{-1} confirme la présence d'un groupement hydroxyle libre. La bande d'absorption à 1730 cm^{-1} nous assure que des liaisons esters sont toujours présentes dans le composé isolé.

L'analyse en R.M.N à 90 MHz nous précise la présence de deux groupements aromatiques (τ 2,70), d'un groupement méthoxyl (τ 6,44) et d'un groupement acétamido (τ 8,15). Le doublet à τ 5,15 ($J = 8 \text{ Hz}$) nous confirme l'anomérie β du composé isolé.

La détritylation du méthyl di-O-benzoyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside libère le méthyl di-O-benzoyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside avec un rendement de 30 %. Nous décrivons les propriétés physiques de ce composé nouveau.

d) Préparation du méthyl O-méthyl-6 di-O-benzoyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside :

1. Principe.

Le dérivé dibenzoylé est soumis à une méthylation totale par l'action de l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent.

2. Mode opératoire.

Le dérivé benzoylé (120 mg) est méthylé par l'action de l'iodure de méthyle (10 ml) en présence d'oxyde d'argent (500 mg) sous agitation à reflux (47° C) pendant 24 h.

On effectue un second cycle de méthylation en additionnant de l'iodure de méthyle (10 ml) et de l'oxyde d'argent (500 mg) au mélange réactionnel ; l'agitation est maintenue 8 h. sous reflux ascendant.

Le mélange refroidi est repris par du chloroforme (30 ml), puis filtré. Le résidu est lavé par du chloroforme (3 x 10 ml) ; les phases organiques sont réunies, puis concentrées par évaporation sous pression réduite.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique du sirop obtenu sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) montre la présence de deux constituants.

Analyse en I.R :

^{KBr}
^{Max} 3060 (C-H, noyau aromatique), 2830 (C-H, méthoxyl), 1730 (C=O, ester), 1685 (amide I), 1600 (C=C, noyau aromatique), 1270 (C-O, ester d'acide benzoïque), 755, 710 (C-H hors du plan, noyau aromatique), 2940, 2900, 1585, 1490, 1450, 1375, 1315, 1220, 1180, 1110, 1080, 1030, 1000, 830, 800, 665 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 90 MHz, référence TMS, solvant CDCl₃ :

L'interprétation du diagramme R.M.N du sirop isolé est difficile ; la complexité de ce spectre est due à la présence simultanée de deux composés en quantités différentes. On peut néanmoins distinguer :

- τ 1,99 et τ 2,56 : deux massifs relatifs à des groupements aromatiques.
- τ 4,45 et τ 5,47 : massifs dus aux protons de l'hétérocycle.
- τ 6,48 et τ 6,66 : singulets relatifs aux protons des groupements méthoxyles.
- τ 7,81 : un singulet probablement du aux protons d'un groupement méthylamino.
- τ 8,17 : un singulet relatif aux protons du groupement acétamido.

4. Conclusions.

L'analyse en I.R du produit méthylé nous assure que la méthylation a été totale, en effet l'absorption de la liaison OH est absente. Par contre, elle nous révèle une substitution sur l'azote, car il n'y a pas d'absorption à 3280 cm⁻¹ (N-H), ni à 1550 cm⁻¹ (amide II), tandis que la bande d'absorption à 1685 cm⁻¹ (amide I) subsiste. On peut donc indiquer une N méthylation sur l'azote, se confirmant par l'apparition d'un singulet à τ 7,86 en R.M.N à 90 MHz.

e) Préparation du méthyl mono-O- méthyl-6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside et de son hydrolysate chlorhydrique :

1. Principe.

Le produit perméthylé est débenzoylé par l'action du méthanolate de sodium (voir p. 30).

2. Mode opératoire.

Le sirop blanc obtenu précédemment est repris par du méthanol anhydre (2 ml), on additionne ensuite du méthanolate de sodium (500 µl) ; le mélange réactionnel ainsi formé est maintenu 4 heures à température ambiante.

On neutralise la solution par addition de Dowex 50 x 8 ('mesh' 25-50, H⁺). On filtre, on rince la résine au méthanol, puis le filtrat est concentré par évaporation sous pression réduite. Une partie aliquote du sirop obtenu est hydrolysée par l'acide chlorhydrique 4 N pendant 4 heures à 100° C.

3. Résultats.

Le sirop obtenu est hétérogène en chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) (R_f : 0,86 et 0,51).

L'hydrolysât chlorhydrique étudié par chromatographie sur échangeurs d'ions à l'auto-analyseur d'amino-acides présente deux pics dont l'un a pu être identifié au mono-O-méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose, l'autre pic se situant au niveau de la glucosamine mais pouvant être celui du mono-O-méthyl-6 méthylamino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.

C.- Conclusions.

Le méthyl O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside et le méthyl di-O-benzoyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 O-trityl-6 β -D-glucopyrannoside, composés nouveaux dont nous décrivons les propriétés physiques, nous ont permis de préparer le méthyl O-méthyl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside.

La détritylation par l'acide acétique du méthyl di-O-benzoyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside ne semble pas provoquer une transposition des groupements benzoyles.

La méthylation du méthyl di-O-benzoyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside s'accompagne d'une substitution sur l'azote comme le montrent le spectre I.R par l'absence des bandes à 3280 cm^{-1} (N-H) et à 1550 cm^{-1} (amide II), et le spectre R.M.N par la présence d'un singulet vers τ 7,86.

ETUDE CRITIQUE DU PROCEDE DE METHYLATION
SELON LA METHODE D' HAKOMORI

1. INTRODUCTION.

La méthylation selon la méthode d'HAKOMORI (133) permet une méthylation totale et rapide d'un oside, comme l'a montré MONSIGNY (134) en appliquant ce procédé au méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-gluco-pyranoside.

Un comportement anormal en chromatographie des dérivés méthylés de la glucosamine obtenus par la méthode d'HAKOMORI, par rapport à ceux obtenus par d'autres méthodes, nous a amené à étudier de plus près la structure de ces dérivés méthylés. Dans ce but nous avons préparé deux dérivés méthylés de la glucosamine par différentes méthodes : le tri-O-méthyl-3,4,6 par les procédés d'HAKOMORI, de KUHN *et al.* (135) et de JEANLOZ (136), le di-O-méthyl-3,6 par les procédés d'HAKOMORI et de KUHN *et al.*

2. PROCEDES.

I.- METHYLATION DU METHYL O-METHYL-3 ACETAMIDO-2 DESOXY-2 D-GLUCOPYRANNOSE
SELON LE PROCEDE DE JEANLOZ.

(voir p. 58)

II.- METHYLATION DU METHYL ACETAMIDO-2 DESOXY-2 β -D-GLUCOPYRANNOSE PAR LA METHODE D'HAKOMORI.

1. Principe.

Le méthyl N-acétyl glucosaminide, dissous dans le diméthylsulfoxyde, est ionisé par addition de méthyl sulfinyl carbanion, puis méthylé par l'iodure de méthyle.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

1 g de β 0-méthyl N-acétyl glucosaminide est dissous dans 10 ml de diméthylsulfoxyde sous agitation et sous courant d'azote. On ajoute 20 ml de solution renfermant le méthyl-sulfinyl-carbanion (1 g d'hydrure de sodium sans huile est dissous, une demi-heure avant l'emploi, dans 20 ml de diméthylsulfoxyde). Après 2 h.30 de réaction, on ajoute lentement 5 ml d'iodure de méthyle et on agite cette solution pendant 24 h.

β - Extraction :

Au mélange réactionnel, on ajoute 50 ml d'une solution renfermant 1 % de thiosulfate de sodium et on l'extrait 6 fois par 20 ml de chloroforme. Les phases organiques sont réunies, lavées une fois par 50 ml d'eau, puis concentrées à un sirop par évaporation sous air sec.

γ - Purification :

Le sirop est purifié par fractionnement après passage sur colonne de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

3. Résultats.

Plusieurs tentatives de cristallisation du sirop purifié se sont traduites par un échec. De ce fait, il ne nous a pas été possible d'identifier le produit obtenu par les méthodes physico-chimiques courantes (point de fusion, pouvoir rotatoire).

Par contre le produit isolé est homogène en chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

Analyse en I.R dans le nujol (Fig. 23 , p. 123) :

λ $\begin{matrix} \text{KBr} \\ \text{Max} \end{matrix}$ 1640 (amide I), 1410, 1330, 1295, 1260, 1220, 1190, 1140, 1110, 1055, 990, 950, 930, 890, 810, 700, 630 cm^{-1} .

Analyse en R.M.N à 90 MHz , référence TMS, solvant CDCl_3 (Fig. 22 , p. 121).

τ 5,62 (1 doublet, $J = 8$ Hz, 1 proton axial, anomérie β), τ 6,24 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,29 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,34 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,37 (1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl), τ 6,95 (1 singulet, 1 N-méthyl), τ 7,64 (1 singulet, 3 protons, 1 acétamido).

Analyse chromatographique à l'auto-analyseur d'amino-acides :

Un hydrolysats chlorhydrique du produit isolé est homogène en chromatographie par échangeurs d'ions à l'auto-analyseur d'amino-acides mais le pic n'est pas symétrique.

III.- METHYLATION DE LA CHITINE SELON LE PROCÉDE DE KUHN.

(voir p. 69)

IV.- METHYLATION DE LA CHITINE SELON LE PROCÉDE D'HAKOMORI.

1. Principe.

De la chitine perméthylée par le procédé de KUHN est soumise à un deuxième cycle de méthylation par la méthode d'HAKOMORI.

2. Mode opératoire.

α - Réaction :

100 mg de chitine perméthylée (voir p. 69), sont dissous dans 1,5 ml de diméthylsulfoxyde. On y ajoute 2 ml de la solution contenant le méthyl-sulfinyl-carbanion (200 mg d'hydrure de sodium sans huile sont dissous, une demi-heure avant l'emploi dans 2 ml de diméthylsulfoxyde). Après 2 h.30 de réaction, on ajoute goutte à goutte 1 ml d'iodure de méthyle. L'agitation est maintenue 24 heures.

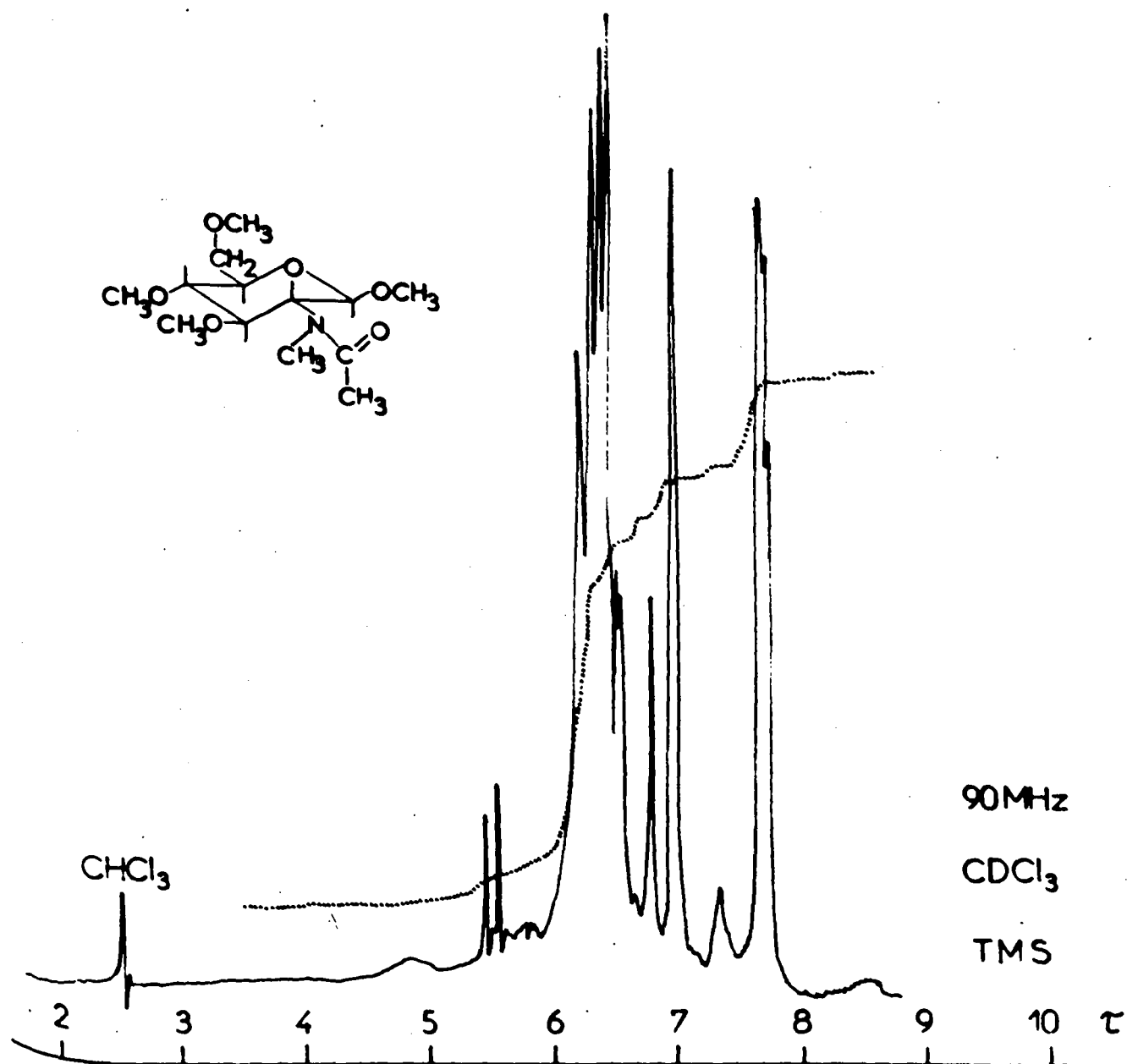


Figure 22

Spectre R.M.N du produit de méthylation du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyranoside par le procédé d'HAKOMORI.

β - Extraction :

Le mélange réactionnel jaune clair est repris par 8 ml d'une solution de thiosulfate de sodium à 1 %. Après agitation, la solution se décolore.

Le produit perméthylé est extrait par le chloroforme (6 x 4 ml). Les phases organiques sont réunies, lavées au thiosulfate de sodium à 1 % (4 ml), à l'eau (4 ml), puis elles sont enfin séchées sur sulfate de sodium anhydre.

La phase organique limpide est concentrée en sirop par évaporation sous pression réduite.

3. Résultats.

L'analyse chromatographique à l'auto-analyseur d'acides aminés d'un hydrolysât chlorhydrique de chitine ainsi méthylée nous révèle la présence de deux dérivés méthylés (voir Fig. 26 , p. 128).

3. ETUDE COMPARATIVE DES DERIVES METHYLES PREPARES.

A.- Principe.

Les différents dérivés méthylés préparés sont étudiés comparativement par spectroscopie infra-rouge, par résonance magnétique protonique, et par chromatographie par échangeurs d'ions.

B.- Méthodes.

a) Analyse comparative des produits de méthylation du méthyl 0-méthyl-3-acétamido-2-désoxy-2-D-gluco-pyranoside selon le procédé de JEANLOZ, et du méthyl acétamido-2-désoxy-2-D-gluco-pyranoside selon le procédé d'HAKOMORI:

1. Analyse en I.R dans le nujol :

Les diagrammes obtenus sont illustrés par la figure 23 (p. 123) ; les fréquences d'absorption sont réunies dans le tableau XIII (p. 124).

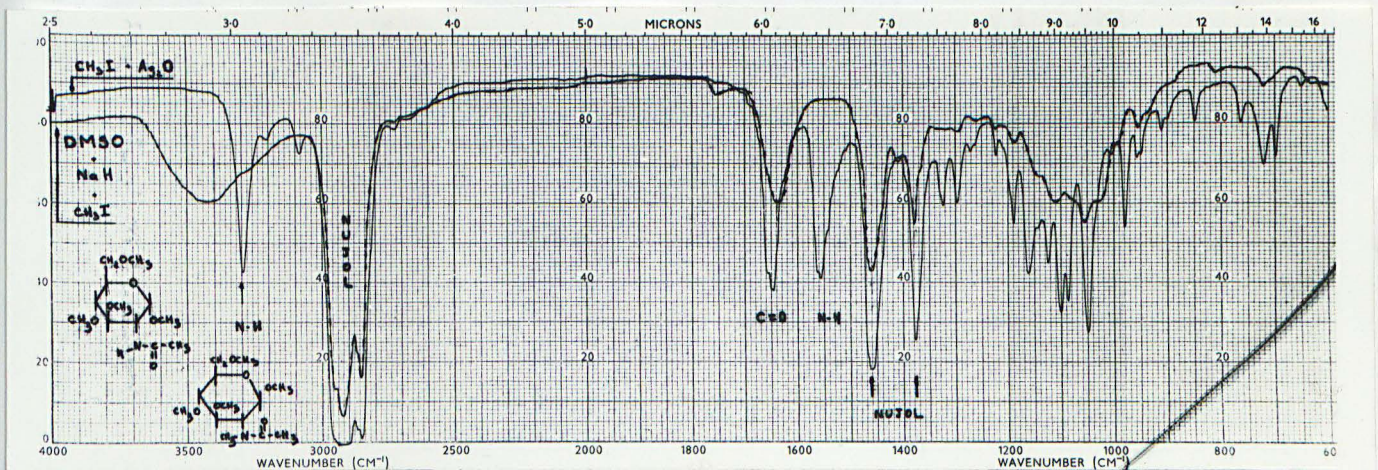


Figure 23

Spectres I.R des produits de méthylation du méthyl 0-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside par le procédé de JEANLOZ et du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside par le procédé d'HAKOMORI.

TABLEAU XIII

Quelques fréquences d'absorption en I.R des produits de méthylation du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside par le procédé de JEANLOZ, et du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside par le procédé d'HAKOMORI.

λ KBr Max	Procédé de JEANLOZ	Procédé d'HAKOMORI
N-H (oscillation de valence)	3300 cm^{-1}	pas de bande d'absorption
C=O (amide I)	1650 cm^{-1}	1630 cm^{-1}
N-H (déformation) et C-N (oscillation de valence), (amide II)	1560 cm^{-1}	pas de bande d'absorption
C-O éther (oscillation de valence)	1150-1050 cm^{-1}	1150-1050 cm^{-1}

L'analyse en I.R nous confirme que la méthode d'HAKOMORI provoque une N substitution du groupement acétamido par l'absence des bandes d'absorption à 3300 cm^{-1} (N-H) et à 1560 cm^{-1} (amide II).

2. Analyse en R.M.N à 90 MHz :

Les spectres en R.M.N des produits préparés sont illustrés par la figure 24 (p. 126), et les déplacements chimiques sont réunis dans le tableau XIV (p. 127).

Le produit méthylé par la méthode d'HAKOMORI présente un singulet à τ 6,95 dû aux protons d'un groupement N-CH_3 . ITO, OHASHI et MIYAGISHIMA (137) attribuent le singulet à τ 7,02 aux hydrogènes du groupement N-CH_3 dans le spectre R.M.N à 60 MHz du méthylamino-2 désoxy-2 D-gulopyrannose.

3. Analyse à l'auto-analyseur d'acides aminés :

La figure 25 (p. 128) illustre les diagrammes chromatographiques d'hydrolysats chlorhydriques des produits de méthylation par le procédé de JEANLOZ et d'HAKOMORI, en présence d'acide aspartique.

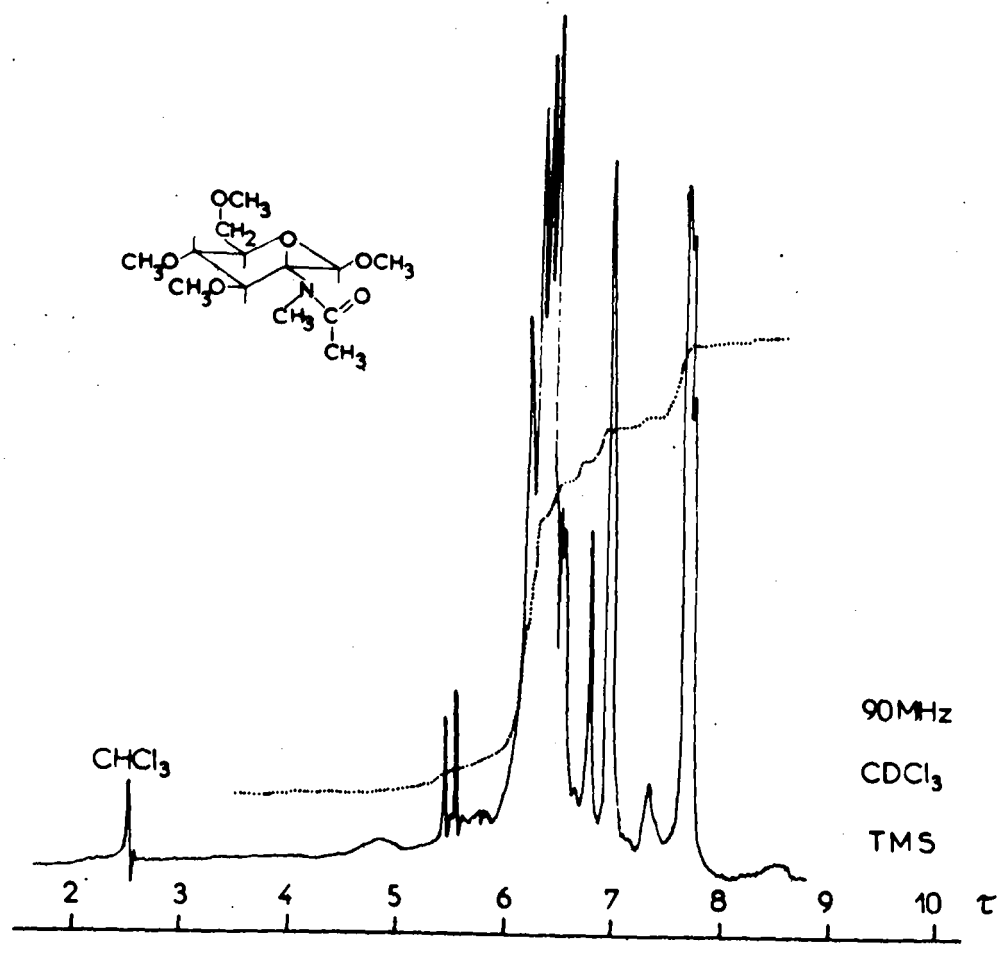
Le mélange des deux hydrolysats fournit deux pics voisins distincts.

b) Analyse chromatographique sur échangeurs d'ions des produits d'hydrolyse de la chitine méthylée par le procédé de KUHN, puis par le procédé de KUHN suivi d'HAKOMORI :

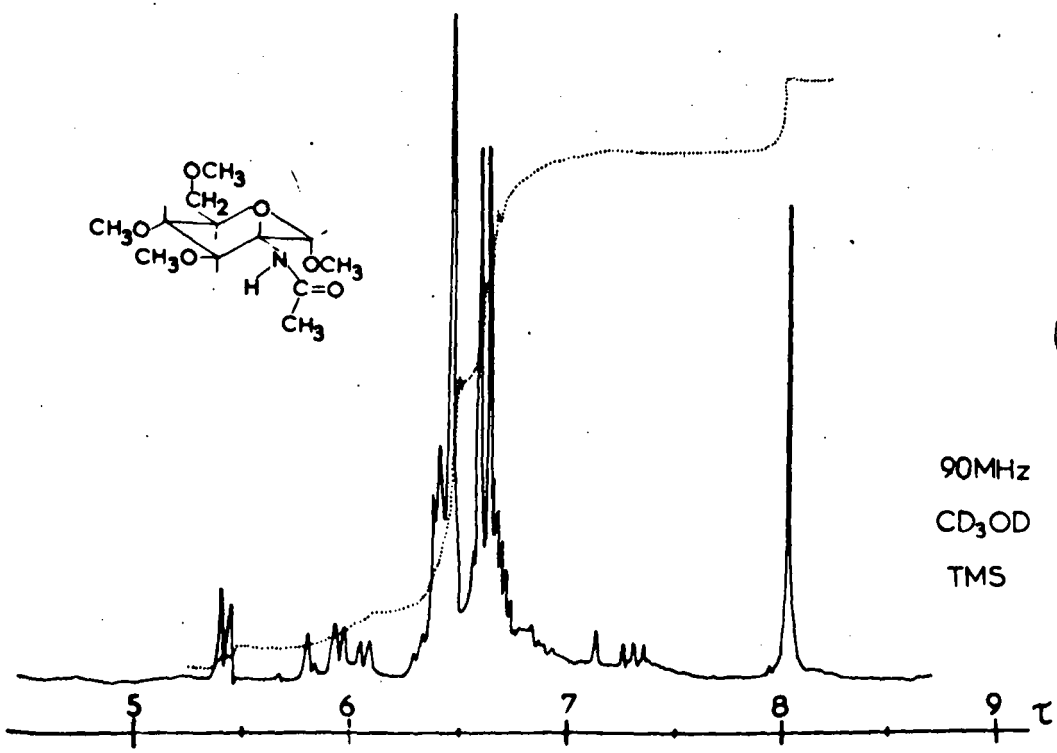
Les diagrammes chromatographiques des hydrolysats de chitine méthylée par le procédé de KUHN, et par le procédé de KUHN suivi d'HAKOMORI sont représentés dans la figure 26 (p. 129).

L'analyse du mélange des deux hydrolysats nous révèle la présence de quatre composés :

- le di-O-méthyl-3,6 méthylamino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.
- le di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.
- le tri-O-méthyl-3,4,6 méthylamino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.
- le tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose.



(a)



(b)

Figure 24

Spectres en R.M.N à 90 MHz (référence TMS) des produits de méthylation du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranoside par le procédé d'HAKOMORI (a), et du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyranoside par le procédé de JEANLOZ (b).

TABEAU XIV

Spectres en R.M.N à 90 MHz (référence TMS).
 Quelques déplacements chimiques des produits de méthylation
 du méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside
 par le procédé de JEANLOZ, et du méthyl acétamido-2 désoxy-2
 β-D-glucopyrannoside par le procédé d'HAKOMORI.

Procédé de JEANLOZ	Valeurs de τ dans le CD ₃ OD	Procédé de HAKOMORI	Valeurs de τ dans le CDCl ₃
1 doublet J = 4 Hz 1 proton équatorial anomérie α	5,46	1 doublet J = 8 Hz 1 proton axial anomérie β	5,62
1 singulet, 6 protons, 2 méthoxyl	6,48	1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl	6,29
		1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl	6,34
1 singulet, 3 protons	6,60	1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl	6,35
1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl	6,64	1 singulet, 3 protons, 1 méthoxyl	6,37
		1 singulet, 3 protons, 1 N-méthyl	6,95
1 singulet, 3 protons, 1 acétamido	8,03	1 singulet, 3 protons, 1 acétamido	7,64

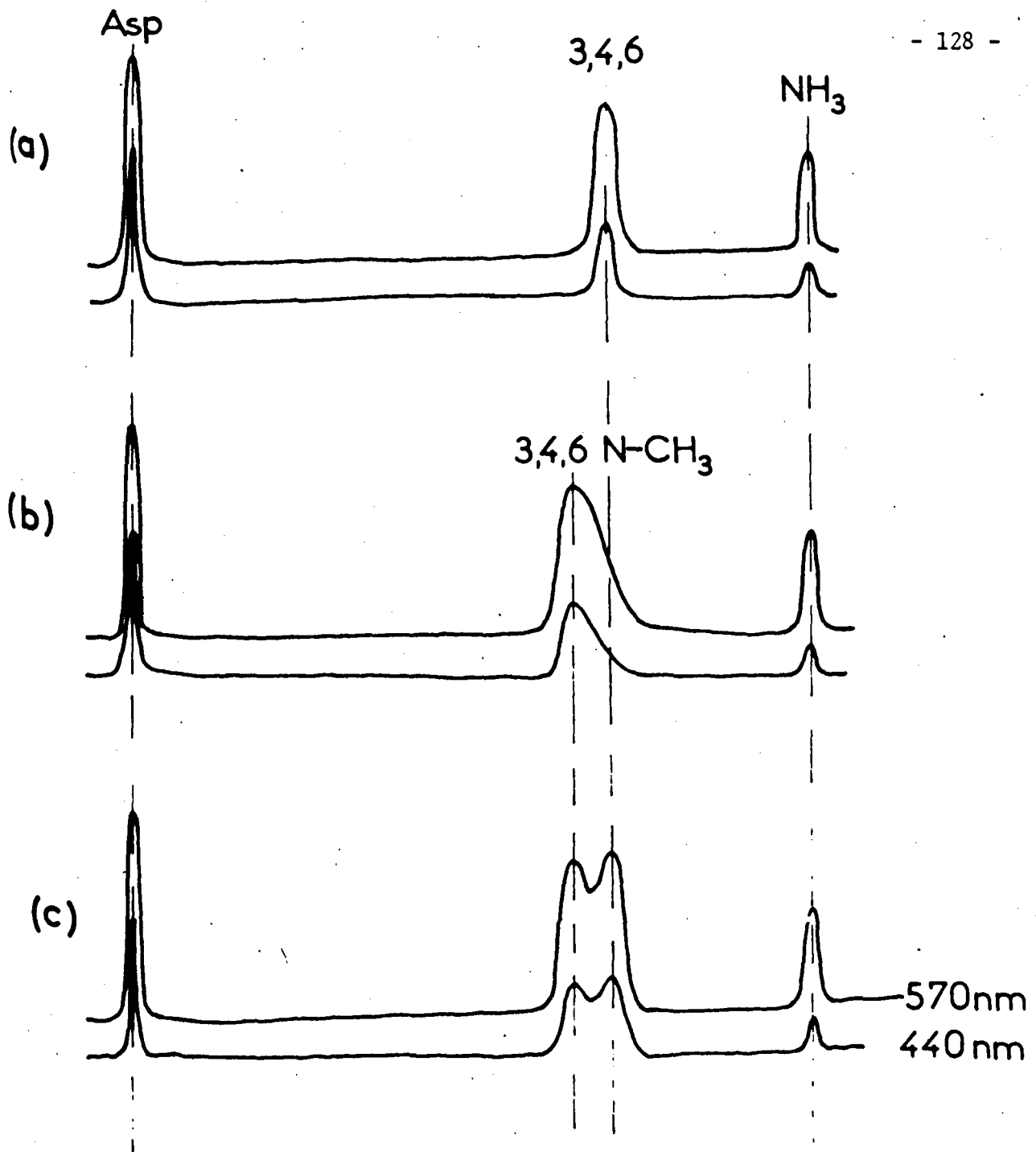


Figure 25

Diagrammes à l'auto-analyseur d'acides-amino.

- (a) Hydrolysate du produit méthylé par le procédé de JEANLOZ.
- (b) Hydrolysate du produit méthylé par le procédé d'HAKOMORI.
- (c) Mélange des deux hydrolysats précédents.

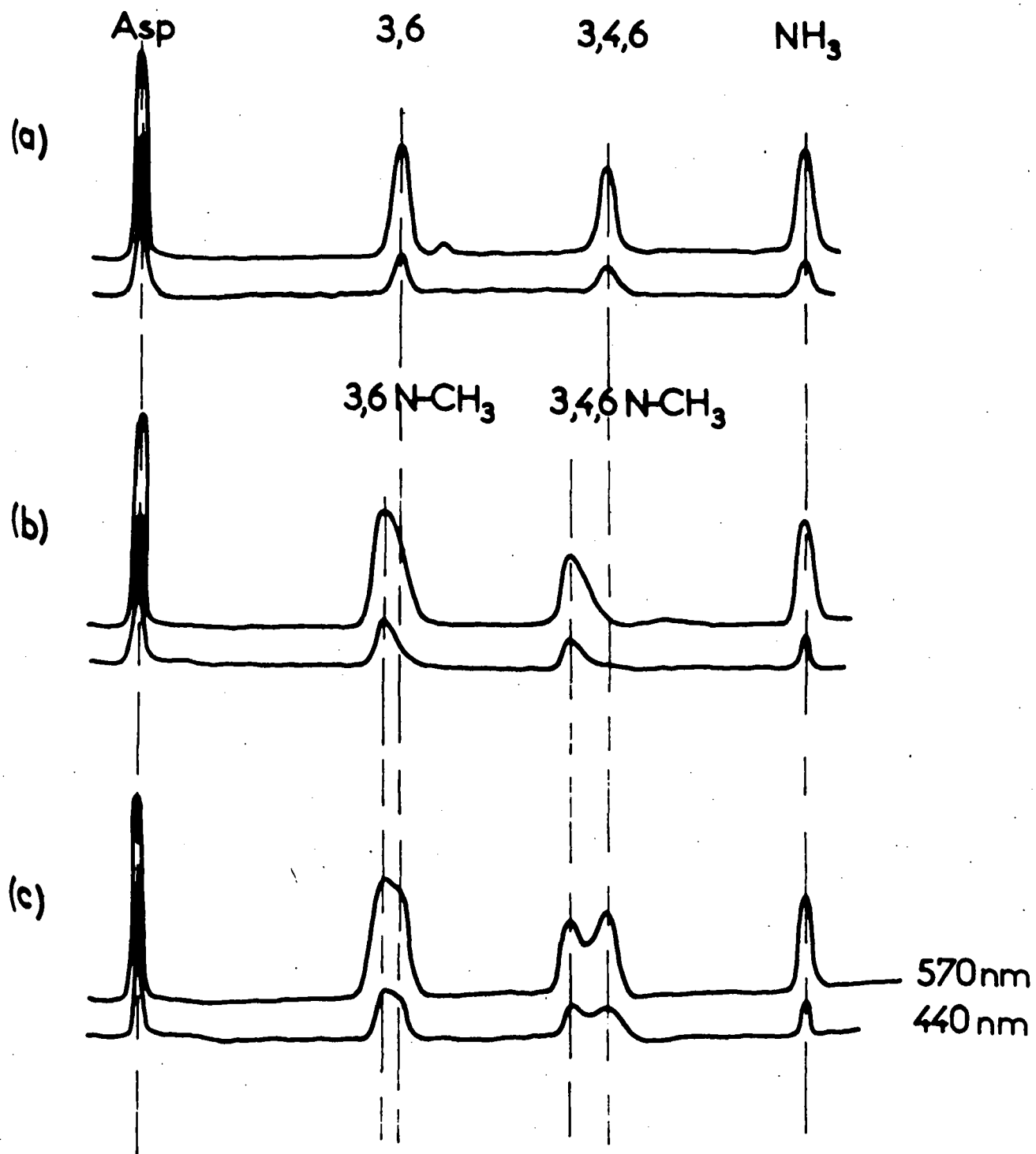


Figure 26

Diagrammes à l'auto-analyseur d'acides-amino.

(a) Hydrolysate de chitine méthylée par le procédé de KUHN.

(b) Hydrolysate de chitine méthylée par le procédé de KUHN,
puis d'HAKOMORI.

(c) Mélange des deux hydrolysats précédents.

4. CONCLUSIONS.

Nous avons vérifié sur un oside de synthèse (le méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyranoside) et sur un oside naturel (la chitine) que la méthylation selon la méthode d'HAKOMORI est rapide et totale, mais qu'elle entraîne une N-méthylation sur l'azote de la glucosamine. En effet le spectre I.R du produit méthylié par le procédé d'HAKOMORI ne présente pas d'absorption à 3300 cm^{-1} (N-H) et à 1560 cm^{-1} (amide II), et le spectre R.M.N à 90 MHz montre la présence d'un singulet à $\tau\ 6,95$ relatif aux protons du groupement N-méthyl. Tous ces résultats confirment les observations de SVENSSON *et al.* (138).

En chromatographie sur échangeurs d'ions à l'auto-analyseur d'acides aminés, les dérivés di-O-méthyl-3,6 et tri-O-méthyl-3,4,6 N-méthylés sont élués plus rapidement que leurs homologues non substitués sur l'azote.

ETUDE CRITIQUE DES METHODES DE SEPARATION DES ETHERS
METHYLIQUES DE LA GLUCOSAMINE

A ce jour plusieurs méthodes de séparation des éthers méthyliques de la glucosamine ou de leurs dérivés ont été proposées. Ce sont essentiellement :

- La chromatographie sur échangeurs de cations des dérivés non substitués selon MONSIGNY (139) en 1968, ou selon ADAMS *et al.* (140) en 1970.
- La chromatographie en phase gazeuse des dérivés réduits et peracétylés selon PERRY et WEBB (141) en 1970.

Nous avons essentiellement utilisé la méthode de chromatographie sur échangeurs de cations, parce qu'elle nous semblait plus simple et surtout la mieux adaptée à l'analyse des hydrolysats de glycanes. En effet, lorsque l'on veut déterminer la structure d'un glycanne en utilisant les méthodes de méthylation, il est nécessaire d'identifier et de doser les différents dérivés méthylés que l'on obtient après hydrolyse. En général le problème est complexe, car dans un grand nombre de cas, à côté de la glucosamine, il existe d'autres oses : le galactose, le mannose et quelquefois le fucose, l'acide neuraminique et la galactosamine.

Par exemple dans la plupart des glycoprotéines, on trouve la glucosamine accompagnée de galactose, de mannose, de fucose et d'acide neuraminique.

Les difficultés majeures rencontrées dans ce type d'analyse sont les suivantes :

1°/ Les conditions d'hydrolyse (HCl 4 N, 4 h. à 100° C), utilisées pour libérer complètement les osamines, détruisent partiellement les oses neutres et les acides sialiques. De ce fait les méthodes générales, comme la chromatographie en phase gazeuse, conduisent à des diagrammes très encombrés et pratiquement ininterprétables.

2°/ L'élimination des oses neutres méthylés d'un mélange contenant des osamines méthylées pourrait être réalisée par fixation des osamines méthylées sur une résine échangeuse de cations, suivie par une élution de ces dérivés. Malheureusement SEGARD et MONTREUIL (142) ont montré qu'il était pratiquement impossible d'éluer les dérivés diméthylés et triméthylé, même en utilisant de l'acide chlorhydrique 3 N comme éluant.

3°/ La substitution de la fonction amine de la glucosamine par le groupement dinitrophényle, d'une part, ne peut se faire qu'à pH alcalin, ce qui provoque des dégradations ; et d'autre part, elle n'est pas quantitative.

C'est pourquoi, nous préférons le protocole expérimental suivant :

- Une partie du produit méthylé est hydrolysé (HCl 2 N, 2 h. à 100° C, puis purifiée sur résine échangeuse d'ions, pour analyser les oses neutres ; dans ces conditions les osamines ne sont pas récupérées.

- Une autre partie est hydrolysée (HCl 4 N, 4 h. à 100° C), puis analysée directement par chromatographie sur résine échangeuse de cations. Les dérivés de la glucosamine sont mis en évidence et dosés par la réaction spécifique à la ninhydrine, ou par la réaction spécifique au réactif modifié d'ELSON et MORGAN (MONSIGNY (143)).

I.- METHODES DE SEPARATION.

A.- Chromatographie sur colonne d'échangeurs de cations.

Au début de notre travail, nous avons utilisé la méthode de chromatographie sur résines échangeuses de cations proposée par MONSIGNY (144), mais avec cette méthode le mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucose a le même temps de rétention que le di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose. Lorsque la note d'ADAMS *et al.* (145) est parue nous avons utilisé leur méthode, puisque d'après ces auteurs, tous les dérivés méthylés de la glucosamine sont séparés. Nous décrivons ci-dessous les résultats que nous avons obtenus en utilisant ces deux méthodes.

a) Principe :

Les osamines, après hydrolyse chlorhydrique des produits de méthylation possèdent une fonction aminée libre. Ces osamines sont susceptibles d'être fixées et éluées sur un échangeur de cations. La position et le nombre des groupements méthylés modifient l'affinité de chacune de ces osamines méthylées vis-à-vis de la résine.

b) Mode opératoire :

1. Méthode de MONSIGNY (146).

A une solution aqueuse d'osamines méthylées (0,05 à 0,5 μ M) on ajoute 0,05 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N et 0,2 ml de glycérol, afin d'ioniser les groupements aminés et d'augmenter la densité de la solution. Cette solution est déposée à la surface de la colonne sans éliminer le tampon. L'élu-tion est réalisée par un gradient de chlorure de sodium dans une solution aqueu-se de citrate de sodium (voir p. 36). L'éluat est analysé en continu en utilisant d'une part la réaction à la ninhydrine et d'autre part (facultativement) la réaction d'ELSON et MORGAN (voir MONSIGNY (147)).

2. Méthode d'ADAMS et al. (148).

La solution d'osamines méthylées préparée comme ci-dessus est déposée au-dessus de la résine. Celle-ci a été, au préalable, stabilisée dans un tampon citrate de sodium à pH 3,10.

- Citrate trisodique, 2 H₂O : 58,84 g.
- Solution 2 M de chlorure de sodium : 100 ml.
- Solution de Brij 35 (100 g dans 300 ml) : 40 ml.
- Acide chlorhydrique 6 N et eau, en quantité suffisante pour obtenir un pH de 3,10 et un volume total de 4 l.

L'élu-tion est réalisée avec un tampon analogue au précédent mais ajusté à pH 4,40 au lieu de pH 3,10.

L'éluat est analysé par la réaction à la ninhydrine.

c) Résultats et discussion :

Nous avons retrouvé les résultats déjà obtenus par MONSIGNY sur la séparation du mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucose, du mono-O-méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucose, du di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucose, du di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose, du di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose et du tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose.

Cette méthode de chromatographie permet l'identification de tous les dérivés méthylés de la glucosamine (voir Fig. 27, p. 135) à l'exception du mono-O-méthyl-3 et du di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucoses qui migrent de concert. L'élution est complète en 2 h.30 mn, avec une reproductibilité parfaite : les temps de rétention sont identiques à 1 mn près d'un diagramme à l'autre.

Avec la méthode d'ADAMS *et al.* (149) la durée de la chromatographie est de 21 heures. Dans leur note les auteurs donnent pour le di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose un temps de rétention de plus de 20 heures ; nous avons trouvé que le di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose a le même temps de rétention que le mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucose.

Ainsi la méthode de ADAMS *et al.* (150) a le même pouvoir séparateur que celle de MONSIGNY (151), mais exige une chromatographie de 16 h. au lieu de 2 h.30 mn.

Par la méthode chromatographique de MONSIGNY (152), nous avons vérifié la pureté des dérivés méthylés que nous avons préparés. Nous avons, en outre, constaté que les dérivés N-méthylés ont un temps de rétention légèrement plus faible que leurs homologues non substitués sur l'azote ; et que ces dérivés donnent une réaction positive à la ninhydrine, ainsi qu'au réactif d'ELSON MORGAN modifié. Cette dernière remarque est en accord avec les résultats d'ITO *et al.* (153). A titre d'exemple les diagrammes de la page 128 (Fig. 25) et de la page 129 (Fig. 26) montrent les temps de rétention du di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose, et du tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose et de leurs dérivés N-méthylés.

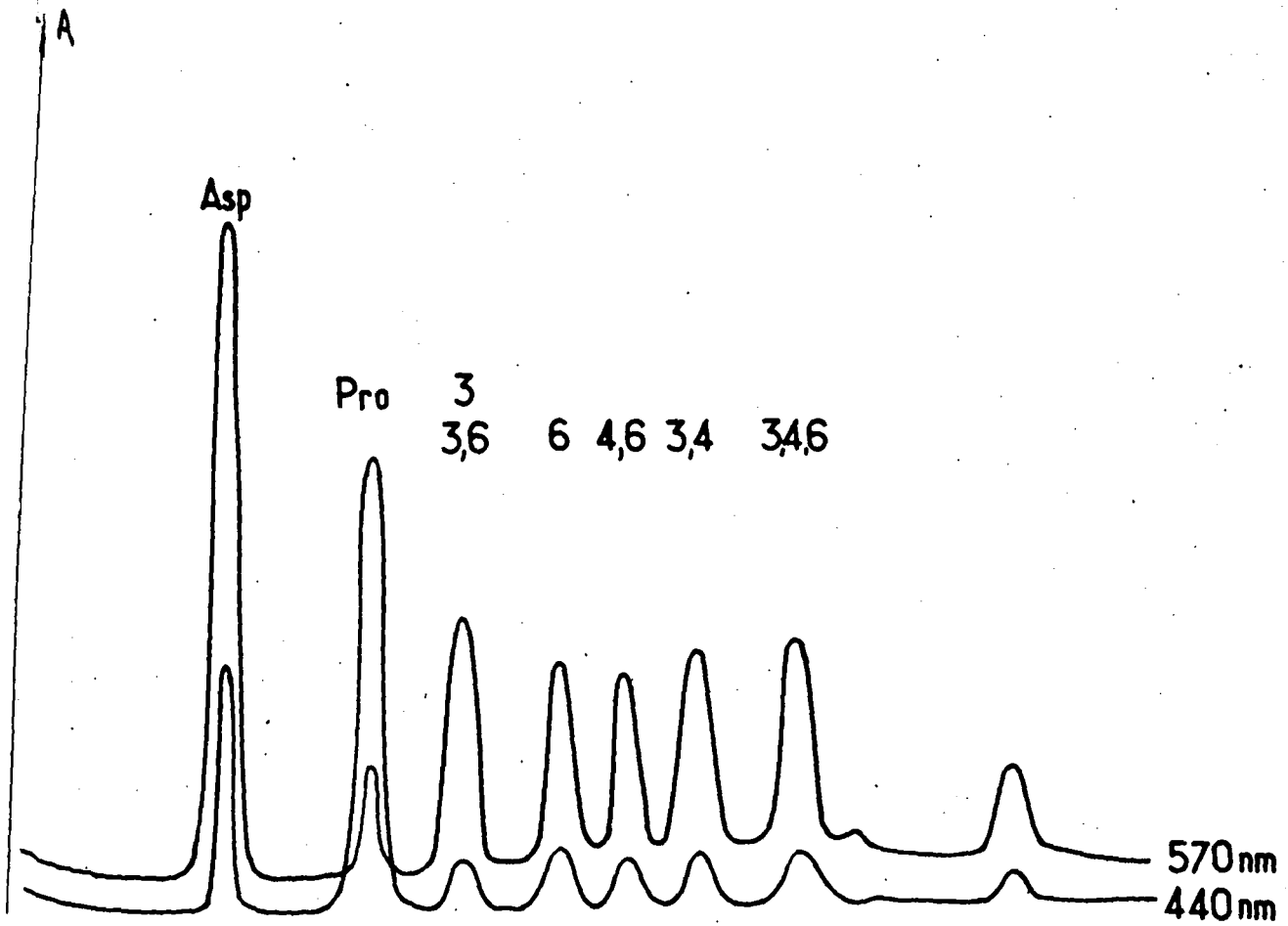


Figure 27

Chromatographie à l'auto-analyseur d'acides-amino (avec le gradient G-OSA-1) des éthers méthyliques de la glucosamine (voir texte). Les chiffres précisent les positions des groupes méthoxyl (réactif à la ninhydrine).

A : densité optique.

d) Conclusions :

Les méthodes d'ADAMS *et al.* (154) et de MONSIGNY (155) présentent le même pouvoir séparateur, puisque dans la méthode d'ADAMS *et al.* (156) le mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucose et le di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose ont le même temps de rétention. Cependant nous préférons utiliser la méthode de MONSIGNY (157) qui permet une séparation en un temps 6 fois plus court.

Les dérivés N-méthylés de la glucosamine ont un temps de rétention légèrement inférieur à leurs homologues non substitués sur l'azote. Les dérivés N-méthylés donnent une coloration avec le réactif à la ninhydrine ainsi qu'avec le réactif d'ELSON et MORGAN.

B.- Chromatographie sur papier.

Après hydrolyse chlorhydrique, les éthers méthyliques de la glucosamine possèdent un groupement chlorhydrate d'amine ; ils peuvent être directement soumis à une chromatographie sur papier, ou être N-acétylés par la méthode de ROSEMAN (158) puis soumis à la chromatographie sur papier.

a) Mode opératoire :

Les différents dérivés méthylés que nous avons préparés ont été analysés par chromatographie descendante sur papier Whatman n° 3 en utilisant le système-solvant de PARTRIDGE (159) n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) préconisé par DANISHEFSKY *et al.* (160) pour séparer les éthers méthyliques de la glucosamine en fonction du nombre de méthoxyle.

b) Résultats et discussion :

Nous donnons dans le Tableau XV (p. 137) les migrations relatives au front du solvant des éthers méthyliques du chlorhydrate de glucosamine et de la N-acétyl glucosamine. Les dérivés du type chlorhydrate migrent plus lentement que les dérivés du type N-acétyl. La vitesse de migration croit proportionnellement au nombre de méthoxyles portés par la molécule conformément aux affirmations de DANISHEFSKY *et al.* (161).

TABLEAU XV

Migrations relatives au front du solvant des éthers méthyliques de la glucosamine en chromatographie sur papier avec le système-solvant de PARTRIDGE.

Position des méthyl	Acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	Chlorhydrate de l' amino-2
	0,32	0,20
Mono-O-méthyl-3	0,50	0,30
Mono-O-méthyl-4
Mono-O-méthyl-6		
Di-O-méthyl-3,4		0,40
Di-O-méthyl-3,6	0,67	0,40
Di-O-méthyl-4,6		
Tri-O-méthyl-3,4,6	0,81	0,55

C.- Conclusions.

La chromatographie sur résine échangeuse de cations permet de séparer six dérivés méthylés sur sept de la glucosamine.

Le mono-O-méthyl-3 et le di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucoses, qui ne sont pas séparés par cette méthode, peuvent être identifiés par chromatographie de partage sur papier.

II.- DOSAGE DES ETHERS METHYLIQUES DE LA GLUCOSAMINE A L'AUTO-ANALYSEUR D'AMINO-ACIDES.

A.- Principe.

La séparation des éthers méthyliques de la glucosamine par chromatographie sur résine échangeuse de cations permet, comme nous venons de le voir, l'identification de ces dérivés. En outre, dans la mesure où l'on peut obtenir une méthylation totale de la glucosamine engagée dans un glycanne sans N-méthyliser le groupement acétamido, cette méthode fournirait des résultats quantitatifs.

Si la N-méthylation n'a pas lieu, il suffit de déterminer l'intensité de la coloration obtenue avec une micromole de chacun des dérivés méthylés, et de calculer un coefficient de correction par rapport à un témoin interne, par exemple l'acide aspartique ou la proline, pour chacun des dérivés méthylés.

B.- Mode opératoire.

Le dérivé méthylé (0,5 μ M) est hydrolysé à 100° C pendant 4 h. par de l'acide chlorhydrique 4 N (0,5 ml contenant 0,5 μ M d'acide aspartique et 0,5 μ M de proline). Cette hydrolyse s'effectue en tube scellé sous pression réduite. Après hydrolyse, la solution est évaporée à siccité sous pression réduite à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris par 0,2 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N. A cette solution, on ajoute 0,2 ml de glycérol et on introduit 0,2 ml de ce dernier mélange au-dessus de la résine dans la colonne de l'auto-analyseur (voir p. 34). La quantité de composé aminé est déterminée par la mesure de la surface des pics obtenus par l'enregistrement de l'absorbance à 440 nm et à 570 nm de l'éluat après réaction avec le réactif à la ninhydrine (voir Fig. 27, p. 135).

On mesure d'une part les surfaces des pics correspondant aux absorbances à 440 nm de la coloration des osamines méthylées (S_i^{440}) et de la proline (S_p^{440}) et, d'autre part, les surfaces des pics correspondant aux absorbances à 570 nm de la coloration des osamines méthylées (S_i^{570}) et de l'acide aspartique (S_A^{570}).

Les rapports $\frac{S_i^{440}}{S_p^{440}}$, $\frac{S_i^{570}}{S_A^{570}}$ et $\frac{S_i^{440}}{S_A^{440}}$ correspondent au rendement colorimétrique molaire de chaque dérivé méthylé par rapport au rendement colorimétrique molaire de la proline et de l'acide aspartique.

Les rapports $\frac{S_p^{440}}{S_i^{440}}$ et $\frac{S_A^{570}}{S_i^{570}}$ correspondent aux coefficients de correction qu'il faut appliquer à un mélange de concentration inconnue, pour établir les rapports molaires des dérivés méthylés.

C.- Résultats et discussion.

Les absorbances relatives aux témoins et les coefficients de correction sont indiqués dans les tableaux XVI (p. 140) et XVII (p. 141) pour l'amino-2 désoxy-2 D-glucose et les dérivés méthylés suivants : mono-O-méthyl-3, di-O-méthyl-3,4, di-O-méthyl-3,6 et tri-O-méthyl-3,4,6.

Cette méthode de dosage ne peut être utilisée que si la méthode de méthylation ne provoque pas de N-substitution partielle de l'azote. En effet, le tri-O-méthyl-3,4,6 méthylamino-2 désoxy-2 D-glucose a une absorbance molaire (0,25) environ 3 fois plus faible que celle obtenue avec l'homologue non substitué (0,71). Cependant la méthode de dosage après chromatographie à l'auto-analyseur peut être utilisée si la méthode de méthylation conduit à une N-méthylation totale de l'azote. Malheureusement, en utilisant la méthode d'HAKO-MORI pour méthyler le méthylsido de la N-acétylglucosamine, on a pu mettre en évidence des produits de réaction secondaire : produits dépourvus de groupement acétamido caractérisés après séparation sur colonne de gel de silice par l'absence des bandes d'absorption en I.R à 1650 cm^{-1} (amide I) et à 1560 cm^{-1} (amide II). En R.M.N ces produits secondaires ne présentent pas de pic vers $\tau 8,1$ relatif à un groupement acétamido.

TABLEAU XVI

Rendement colorimétrique molaire et coefficient de correction
de chaque dérivé méthylé de la glucosamine par rapport
à l'acide aspartique

Nature de l'osamine et du témoin interne	$\frac{S_i^{570}}{S_A^{570}} \times 100$	$k_A^{570} \times 100$	$\frac{S_i^{440}}{S_A^{440}} \times 100$	$k_A^{440} \times 100$
Acide aspartique	100	1,0	100	1,0
Amino-2 désoxy-2 D-glucose	96	1,0	98	1,0
Mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucose	70	1,4	68	1,5
Mono-O-méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucose	-	-	-	-
di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucose	94	1,1	76	1,3
di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose	73	1,4	69	1,4
di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose	-	-	-	-
tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose	77	1,3	71	1,4

TABLEAU XVII

Rendement colorimétrique molaire et coefficient de correction
de chaque dérivé méthylé de la glucosamine par rapport
à la proline

Nature de l'osamine et du témoin interne	$\frac{S_i^{440}}{S_p^{440}} \times 100$	$k_p^{440} \times 100$
Proline	100	1
amino-2 désoxy-2 D-glucose	81	1,2
Mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucose	66	1,5
Mono-O-méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucose	-	-
Di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucose	91	1,1
Di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose	70	1,4
Di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose	-	-
Tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucose	74	1,4

Enfin, la reproductibilité des rapports d'absorption molaire n'est pas très bonne : l'erreur relative est de l'ordre de 10 % comme l'a montré l'analyse des produits de méthylation selon la méthode de KUHN et du méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside préparés au cours de diverses expériences.

D.- Conclusions.

La méthode de dosage après chromatographie à l'auto-analyseur doit être considérée, en fait, comme une méthode semi-quantitative. En effet, si le dosage d'un dérivé méthylé hautement purifié est effectué avec une bonne reproductibilité, le dosage du produit non purifié de perméthylation est entaché d'une erreur par défaut qui peut être due à une N-méthylation partielle. Or s'il est possible de préparer de la N-acétyl glucosamine strictement O-méthylée, il est difficilement possible de séparer un glycanne O-méthylé d'un glycanne O-méthylé et partiellement N-méthylé.

III.- CONCLUSIONS.

La méthode de chromatographie à l'auto-analyseur d'acides aminés décrite par MONSIGNY a le même pouvoir séparateur que celle décrite par ADAMS *et al.*, mais présente l'avantage d'être 6 fois plus rapide.

Cette méthode est utilisable pour identifier les dérivés méthylés de la glucosamine, qu'ils proviennent d'une préparation ne contenant que de la glucosamine ou qu'ils proviennent d'un glycanne renfermant d'autres oses non aminés, puisque les oses neutres n'interfèrent pas.

Cependant, il ne s'agit que d'une méthode semi-quantitative, à moins que le procédé de méthylation employé ne provoque pas de N-méthylation, même partielle.

CONCLUSIONS GENERALES



L'établissement de la structure d'un glycanne (partie glucidique d'une glycoprotéine, par exemple), c'est-à-dire la détermination du mode d'enchaînement des oses, requiert diverses méthodes telles que : l'hydrolyse enzymatique spécifique, l'acétolyse, l'oxydation par l'acide periodique, ou la perméthylation. Cette dernière méthode permet de connaître pour chaque ose la position des hydroxyles qui ne sont pas substitués, puisqu'au niveau du glycanne, seuls ces hydroxyles pourront être méthylés ; cela suppose une méthylation complète des hydroxyles libres du glycanne, et l'identification et le dosage des oses méthylés libérés après hydrolyse du glycanne perméthylé.

Les résultats que nous avons rapportés plus haut ont trait à l'étude de la méthylation de la glucosamine et à l'identification de ses dérivés méthylés (la glucosamine est en effet l'un des oses les plus fréquemment rencontrés dans les glycoprotéines).

Préparation des éthers méthyliques de la N-acétyl glucosamine.

Les éthers méthyliques de la N-acétyl glucosamine ont été préparés par méthylation de produits de substitution synthétiques, ou de produits naturels de structure connue comme par exemple la chitine. Les agents de méthylation généralement employés sont les suivants : sulfate de méthyle et soude, ou iodure de méthyle et oxyde d'argent, ou l'iodure de méthyle et les sels de baryum. Les produits de méthylation ont été purifiés par chromatographie d'adsorption sur charbon-célite, ou sur gel de silice.

Les constantes physiques et les données spectrales des dérivés méthylés de la glucosamine ou des intermédiaires de synthèse ont été déterminées chaque fois que cela a été possible (*) (Tableau XVIII, p. 145 et Tableau XIX, p. 147). Les pouvoirs rotatoires et les points de fusion nous ont permis de vérifier l'état de pureté des produits que nous avons préparés. Les bandes d'absorption en Infra-rouge nous ont permis de vérifier la structure des composés intermédiaires ou des dérivés méthylés eux-mêmes, en identifiant les grou-

(*) Pour un certain nombre de composés tels les dérivés du O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucose, il ne nous a pas été possible de préparer une solution suffisamment concentrée pour obtenir un résultat interprétable en R.M.N.

TABLEAU XVIII

Constantes physiques des produits isolés : Point de Fusion et Pouvoir Rotatoire.

Produits	F _{exp} °C	[α] _D exp	F _{th} °C	[α] _D th.	Auteurs
para-0-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside	147	+ 12,0° c 1 CHCl ₃	187	+ 1,0° c 1 CHCl ₃	LEABACK <u>et al.</u> (162)
			192	+ 3,0° c 1 CHCl ₃	JONES <u>et al.</u> (163)
para-0-1 tri-0-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside	133	+ 119,0° c 1 CHCl ₃	133- 134	+ 118,0° c 1 CHCl ₃	LEABACK <u>et al.</u> (164)
para-0-1 tri-0-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside	150	- 4,4° c 1 CHCl ₃	163	- 22,2° c 1 CH ₃ OH	LEABACK <u>et al.</u> (165)
para-0-1 tri-0-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside	194	- 90,0° c 1 CH ₃ OH	190- 191	- 42,0° c 2 H ₂ O	ROTH <u>et al.</u> (166)
			204	- 47,1° c 1,5 H ₂ O	LEABACK <u>et al.</u> (167)
			235	- 43,0° H ₂ O	KUHN (168)
para-0-1 tri-0-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside	154	- 38,0° c 1 CHCl ₃	163	- 38,3° c 0,63 CHCl ₃	CUTLER <u>et al.</u> (169) KUHN <u>et al.</u> (170)
para-0-1 tri-0-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β-D-glucopyrannoside	217	- 49,0° eau	205	- 48,0° eau	KUHN <u>et al.</u> (171)
para-0-1 tri-0-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α-D-glucopyrannoside	152	+ 135,0° c 1 CH ₃ OH	151	+ 102,0° H ₂ O	NEUBERGER (172)
			150	+ 104,3° H ₂ O	CUTLER <u>et al.</u> (173)
			153	+ 135,0°	JEANLOZ (174)
	230	+ 43,5° H ₂ O	234	+ 45,0° H ₂ O	JEANLOZ (175)
			224	+ 48,5°	KUHN <u>et al.</u> (176)
para-0-1 tri-0-méthyl-3,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucose	220	+ 37,3° H ₂ O	232	+ 45,0° H ₂ O	JEANLOZ (177)

Produits	F _{exp} °C	[α] _D exp	F _{th} °C	[α] _D th.	Auteurs
yl 0-méthyl-3 O-trityl-6 amido-2 désoxy-2 opyrannoside					
anomère α	206	+ 53,0° c 1 CHCl ₃	206	+ 53,0° c 1 CHCl ₃	JEANLOZ (178)
anomère β	240	- 30,0° c 1 CHCl ₃			
yl di-O-méthyl-3,4 O-trityl-6 amido-2 désoxy-2 D-glucopyran- side					
anomère α	233		230- 233		JEANLOZ (179)
anomère β	229				
yl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 xy-2 α-D-glucopyrannoside	192	+ 151,0° c 1 CH ₃ OH	192	+ 152,0° c 0,5 CH ₃ OH	JEANLOZ (180)
yl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 xy-2 β-D-glucopyrannoside	270	- 63,0° c 5 DMSO	279	- 63,8° c 0,5 DMSO	ROTH <u>et al.</u> (181)
yl O-benzoyl-3 O-benzylidène-4,6 amido-2 désoxy-2 α-D-glucopyran- side	210		212- 216	+ 8,0° c 1 CHCl ₃	JEANLOZ (182)
nylidène-4,6 acétamido-2 xy-2 β-D-glucose	245- 247	+ 37,0° c 1 pyridine	247- 248	+ 38,2° c 1 pyridine	ROTH <u>et al.</u> (183)
yl 0-méthyl-3 acétamido-2 xy-2 α-D-glucopyrannoside	221	+ 119,0°	213	+ 118,0° c 1 H ₂ O	ROTH <u>et al.</u> (184)
			211	+ 116 H ₂ O	NEUBERGER (185)
yl 0-trityl-6 acétamido-2 xy-2 β-D-glucopyrannoside	136	- 51,4° c 2 CHCl ₃			
yl di-O-benzoyl-3,4 O-trityl-6 amido-2 désoxy-2 β-D-glucopyran- de	116	- 56,1° c 2 CHCl ₃			
yl di-O-benzoyl-3,4 acétamido-2 xy-2 β-D-glucopyrannoside	82	- 83,3° c 2 CHCl ₃			

TABLEAU XIX

Propriétés physico-chimiques des produits isolés. Analyses en Infra-rouge et en Résonance Magnétique Nucléaire

Produits	I. R. cm^{-1}	R. M. N.
Tetra-O-acétyl-1,3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	3260 (N-H); 1745 (C=O); 1660 (amide I); 1550 (amide II); 890 (anomérie β)	τ 4,25 (1d $J=8,5$, β)*; τ 7,90 7,93 7,98 (3s, 4 acétyl); τ 8,10 (1s, 1 acétamido)**
Aloro-1 tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannose.	3240 (N-H); 1730 (C=O); 1645 (amide I); 1545 (amide II); 821 (anomérie α)	
Méthyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	3260 (N-H); 1750 (C=O); 1650 (amide I); 1565 (amide II); 890 (anomérie β)	τ 6,50 (1s, 1 méthyl); τ 7,93 7,99 (2s, 3 acétyl); τ 8,06 (1s, 1 acétamido)
Méthyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	3480, 3360 (O-H); 3270 (N-H); 1660, 1640 (amide I); 1560, 1540 (amide II) 890 (anomérie β)	τ 5,25 (1d, $J=8$, β) τ 6,19 (1s, 1 méthyl) τ 7,64 (1s, 1 acétamido)
Benzyl tri-O-acétyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	3340 (N-H); 1740 (C=O); 1660 (amide I); 1535 (amide II); 740-695 (C-H, noyau ϕ)	τ 2,68 (1s, noyau ϕ) τ 3,80 (1d, $J=9$, β) τ 7,92 8,01 (2s, 3 acétyl) τ 8,14 (1s, 1 acétamido)
Benzyl acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	3450, 3350 (O-H); 3310 (N-H); 1640 (amide I); 1550 (amide II) 899 (anomérie β); 755, 735, 700 (C-H, noyau ϕ)	τ 2,69 (1s, noyau ϕ); τ 8,10 (1s, 1 acétamido)
Méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 α -D-glucopyrannoside	3300 (N-H); 1650 (amide I); 1560 (amide II); 1150-1050 (C-O); 850 (anomérie α)	τ 5,46 (1d, $J=4$, α); τ 6,48 6,60 6,64 (3s, 4 méthoxyl); τ 8,03 (1s, 1 acétamido)
Méthyl tri-O-méthyl-3,4,6 N-méthyl-2 N-acétyl-2 β -D-glucopyrannoside	1630 (amide I); 1150-1050 (C-O)	τ 5,62 (1d, $J=8$, β); τ 6,29 6,34 6,35 6,37 (4s, 4 méthoxyl); τ 6,95 (1s, 1 N-méthyl); τ 7,64 (1s, 1 acétamido)
Di-O-méthyl-3,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	3370 (O-H); 3310 (N-H); 1630 (amide I); 1560 (amide II); 1120 (C-O); 850 (anomérie α)	
Tri-O-méthyl-3,4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucose	3345 (O-H); 3280 (N-H); 1650 (amide I); 1560 (amide II); 1130 (C-O); 850 (anomérie α)	

* τ 4,25 (1d, $J=8,5$ β) : un doublet à τ 4,25, constante de couplage $J=8,5$ Hz, anomérie β

** τ 8,10 (1s, 1 acétamido): un singulet à τ 8,10, relatif aux protons d'un groupement acétamido.

Produits	I. R. cm^{-1}	R. M. N.
Méthyl O-méthyl-3 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside anomère α	3600, 3400 (O-H); 3240 (N-H); 3060 (C-H, noyaux ϕ); 840 (anomérie α); 770, 760, 750, 710, 700 (C-H, noyaux ϕ)	τ 2,68 (massif, 3 noyaux ϕ); τ 5,31 (ld, J=4, α); τ 6,52 6,61 (2s, 2 méthoxyl); τ 8,00 (ls, 1 acétamido)
anomère β	3640 (O-H); 3300 (N-H); 3060 (C-H, noyaux ϕ); 1650 (amide I); 1550 (amide II); 900 (ano- mérie β); 780, 765, 750, 710, 700 (C-H, noyaux ϕ)	τ 2,68 (massif, 3 noyaux ϕ) τ 5,25 (ld, J=9, anomérie β) τ 6,45 6,51 (2s, 2 méthoxyl) τ 8,00 (ls, 1 acétamido)
Méthyl di-O-méthyl-3,4 trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside anomère α	3250 (N-H); 3060 (C-H, noyau ϕ); 1630 (amide I); 1550 (amide II); 855 (anomérie α); 780, 760, 750, 730, 710, 700 (C-H, noyau ϕ)	τ 2,70 (massif, 3 noyaux ϕ) τ 5,25 (ld, J=4, anomérie α) τ 6,50 6,62 6,74 (3s, 3 métho- xyl); τ 8,00 (ls, 1 acétamido)
anomère β	3300 (N-H); 3060 (C-H, noyau ϕ) 1660 (amide I); 1550 (amide II); 898 (anomérie β); 790, 770, 750, 740, 710, 700 (C-H, noyau ϕ)	τ 2,70 (massif, 3 noyaux ϕ); τ 6,48 6,70 (2s, 3 méthoxyl); τ 8,00 (ls, 1 acétamido)
Méthyl di-O-méthyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside	3500-3350 (O-H); 3300 (N-H); 1640 (amide I); 1550 (amide II); 840 (anomérie α)	τ 5,52 (ld, J=4, anomérie α); τ 6,56 6,58 6,75 (3s, 3 métho- xyl); τ 8,12 (ls, 1 acétamido)
Méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside	3470 (O-H); 3290 (N-H); 3080 (C-H, noyau ϕ); 1660 (amide I); 1550 (amide II); 760, 700 (C-H, noyau ϕ)	
Méthyl O-benzoyl-3 O-benzy- lidène-4,6 acétamido-2 désoxy- 2 D-glucopyrannoside	3300 (N-H); 3080 (C-H, noyau ϕ); 1720 (C=O); 1650 (amide I); 1560 (amide II); 750, 715, 700 (C-H, noyau ϕ)	
Méthyl O-benzoyl acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside	3600-3400 (O-H); 3300 (N-H); 3080 (C-H, noyau ϕ); 1720 (C=O); 1660 (amide I); 1550 (amide II); 715 (C-H, noyau ϕ)	
Méthyl O-benzyl-3 O-benzy- lidène-4,6 N-benzyl-2 N- acétyl-2 D-glucopyranno- side	3080 (C-H, noyau ϕ); 1650 (ami- de I); 750, 695 (C-H, noyau ϕ)	τ 2,71 (ls, 2 noyaux ϕ); τ 2,82 (ls, 1 noyau ϕ); τ 5,38 (ld, J=4, anomérie α); τ 8,0 (ls, 1 acétamido)
Méthyl O-benzyl-3 N-benzyl-2 N-acétyl-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside	3350 (O-H); 3080, 3060, 3030 (C-H, noyau ϕ); 2940 (CH ₂); 1630 (amide I); 1500 (C=C, noyau ϕ) 1150 (C-O); 880 (C-H, anomérie β); 730, 700 (C-H, noyau ϕ)	
Méthyl O-benzyl-3 di-O- méthyl-4,6 N-benzyl-2 N-acétyl-2 D-glucopyran- noside	3080, 3060, 3030 (=C-H, noyau ϕ) 2940 (C-H aliphatique); 1650 (amide I); 1500 (C=C, noyau ϕ); 1120, 1070 (C-O); 740, 730, 700 (C-H, noyau ϕ)	

Produit	I. R. cm^{-1}	R. M. N.
benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannose	3460 (O-H); 3280 (N-H); 3080 (C-H, noyau ϕ); 1620 (amide I); 1560 (amide II); 750, 700 (C-H, noyau ϕ)	
Méthyl O-méthyl-3 O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside	3280 (N-H); 3080 (C-H, noyau ϕ); 1650 (amide I); 1550 (amide II); 1080 (C-O); 750, 700 (C-H, noyau ϕ)	
Méthyl O-méthyl-3 acétamido-2 désoxy-2 D-glucopyrannoside anomère α anomère β	3500-3350 (O-H); 3300 (N-H); 1640 (amide I); 1550 (amide II); 1060 (C-O)	τ 4,97 (ld, J=4 anomérie α); τ 6,18 (ls, 1 méthoxyl); τ 6,29 (ls, 1 méthoxyl); τ 7,67 (ls, 1 acétamido) τ 5,29 (ld, J=8 anomérie β); τ 6,24 (ls, 1 méthoxyl); τ 6,23 (ls, 1 méthoxyl); τ 7,71 (ls, 1 acétamido)
Méthyl O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	3600-3400 (O-H); 3300 (N-H); 3080 (C-H, noyau ϕ); 2830 (C-H, méthoxyl); 1650 (amide I); 1555 (amide II); 1600, 1490, 1450 (C=C, noyau ϕ); 1060 (C-O); 760, 700 (C-H, noyau ϕ)	τ 2,71 (massif, 3 noyaux ϕ); τ 5,64 (ld, J=8, anomérie β); τ 6,48 (ls, 1 méthoxyl); τ 8,06 (ls, 1 acétamido)
Méthyl di-O-benzoyl-3,4 O-trityl-6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	3280 (N-H); 3060 (C-H, noyau ϕ); 1735 (C=O, ester); 1660 (amide I); 1600 (C=C, noyau ϕ); 1560 (amide II); 760, 740, 725, 710, 700 (C-H, noyau ϕ)	τ 2,62 (massif, 5 noyaux ϕ); τ 5,30 (ld, J=8, anomérie β); τ 6,42 (ls, 1 méthoxyl); τ 8,14 (ls, 1 acétamido)
Méthyl di-O-benzoyl-3,4 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside	3600-3400 (O-H); 3280 (N-H); 3060 (C-H, noyau ϕ); 1730 (C=O, ester); 1665 (amide I); 1600 (C=C, noyau ϕ); 1550 (amide II); 1500 (C=C, noyau ϕ); 1270-1100 (C-O, ester d'acide benzoïque); 700 (C-H, noyau ϕ)	τ 2,70 (massif, 2 noyaux ϕ); τ 5,15 (ld, J=8, anomérie β); τ 6,44 (ls, 1 méthoxyl); τ 8,15 (ls, 1 acétamido)

pements fonctionnels tels que : les hydroxyles, les esters, les amides, les éthers, les noyaux aromatiques...

Les spectres en Résonance Magnétique Nucléaire nous ont permis d'identifier et de doser les différents groupements sur la base des déplacements chimiques (τ) et des constantes de couplage correspondant à la résonance des protons.

L'utilisation de ces techniques spectroscopiques nous ont permis entre autre de constater que la benzylation par le chlorure de benzyle du méthyl O-benzylidène-4,6 acétamido-2 désoxy-2 β -D-glucopyrannoside conduit à un dérivé O et N benzylé.

Les dérivés méthylés suivants ont été préparés et caractérisés par chromatographie :

tri-O-méthyl-3,4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose
di-O-méthyl-3,4 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose
di-O-méthyl-3,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose
di-O-méthyl-4,6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose
mono-O-méthyl-3 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose
mono-O-méthyl-6 amino-2 désoxy-2 D-glucopyrannose

Mise en évidence d'une N-méthylation.

La méthode d'HAKOMORI (méthyl sulfinyl carbanion et iodure de méthyle) qui est utilisée couramment pour méthyler les glycannes conduit effectivement à une substitution complète des hydroxyles de la N-acétyl glucosamine ou de ces dérivés, mais l'atome d'azote du groupement acétamido est N-méthylé.

En outre, des produits secondaires ont pu être mis en évidence ; ces résultats ont été obtenus sur la base de la spectroscopie Infra-rouge et de la Résonance Magnétique Nucléaire.

Analyse chromatographique des dérivés méthylés.

Les produits d'hydrolyse des dérivés méthylés de la N-acétyl glucosamine ou des méthylosides correspondants ont été analysés par chromatographie sur résine échangeuse de cations, et par chromatographie sur papier.

Après chromatographie sur résine échangeuse de cations, les rendements colorimétriques molaires (au réactif à la ninhydrine) de chaque dérivé méthylé de la glucosamine séparé, sont donnés par rapport à l'acide aspartique et à la proline.

Les valeurs des Rf en chromatographie sur papier des dérivés méthylés de la N-acétyl glucosamine et de son chlorhydrate sont donnés pour le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5). Ces valeurs sont proportionnelles en première approximation au nombre de groupements méthyles portés par la glucosamine.

L'identification et le dosage approximatif des éthers méthyliques de la glucosamine par chromatographie sur résine échangeuse de cations semblent bien adaptés à l'analyse d'un glycanne méthylé, comme le montrent les résultats obtenus avec les témoins que nous avons préparés. Toutefois le dosage précis ne peut être envisagé que si la méthode de méthylation conduit à une O-méthylation totale sans provoquer une N-méthylation qui est difficilement réalisable.

Toutefois on peut envisager le dosage des éthers méthyliques de la N-méthyl glucosamine, obtenus après méthylation selon la méthode d'HAKOMORI (méthode de méthylation la plus efficace), à condition de préparer les témoins correspondants afin d'en déterminer les rendements colorimétriques molaires.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS G.A., YAGUCHI M., PERRY M.B., Carbohyd. Res., 1970, 12, 267, (70, 140
145, 148, 149, 150, 154, 156).
- BAYARD B., Thèse Doct. 3e Cycle, Lille, 1969 (86,104).
- COREY E., CHAYKOVSKY M. J. Am. Chem., 1962, 28, 866 (11).
- CUTLER W.O., HAWORTH W.N., PEAT S., J. Chem. Soc., 1937, 1979, (29, 30, 33, 34,
103, 173).
- CUTLER W.O., PEAT S., J. Chem. Soc., 1939, 271, (100, 169).
- DANISHEFSKY I., EIBER M.B., WILLIAMS A.M.,
J. Biol. Chem., 1963, 238, 2895 (64, 160,
161).
- FISCHER E., Ber., 1893, 26, 2400, (24).
- FLOWERS H.M., JEANLOZ R.W., J. Org. Chem., 1963, 28, 1565, (20).
- GRIMONPREZ L., C. R. Acad. Sci., 1966, 263, 1269, (53).
- HAKOMORI S., J. Biochem., 1964, 55, 205, (4, 9, 10, 14,
43, 133).
- HAWORTH W.N., J. Chem.Soc., 1915, 107, 8, (2, 3, 28, 32,
39).
- HAY G.W., LEWIS B.A., SMITH F., J. Chromatog., 1963, 11, 479, (62, 72).
- IRVINE J.C., Mc NICOLL D., HYND A., J. Chem. Soc., 1911, 99, 250, (18).

- ITO Y., OHASHI Y., MIYAGISHIMA T., Carbohyd. Res., 1969, 9, 125, (137, 153).
- JEANLOZ W., J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 4497, (50, 115, 116, 117, 118, 124, 136, 178, 179, 180).
- JEANLOZ W., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 555, (51, 123, 124, 182).
- JEANLOZ W., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 558, (56).
- JEANLOZ W., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 303, (114, 174, 175).
- JEANLOZ W., J. Org. Chem., 1961, 26, 905 (46, 177).
- JEANLOZ W., GANSSER C., J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 2583, (57, 60).
- JONES J.K.N., PERRY M.B., SHELTON B., WALTON D.J., Can. J. Chem., 1961, 39, 1005, (87, 90, 163)
- KAWEREAU E., WIELAND T., Nature, 1951, 168, 77, (78).
- KOENIGS W., KNORR E., Ber., 1901, 34, 957, (15, 99).
- KUHN R., BAER H., GAUHE A., Chem. Ber., 1954, 87, 1138, (176).
- KUHN R., BAER H., GAUHE A., Chem. Ber., 1956, 89, 2519, (6, 12, 36, 42, 45).
- KUHN R., EKONG D., Chem. Ber., 1963, 96, 683, (105, 107, 109).
- KUHN R., KIRSCHENLOHR W., Chem. Ber., 1953, 86, 1331, (101, 170, 171)
- KUHN R., KRUGER G., Chem. Ber., 1956, 89, 1473, et 1957, 90, 264, (82).
- KUHN R., TRISCHMANN H., Chem. Ber., 1961, 94, 2258, (8, 12, 37, 40, 49, 111, 135).

- KUHN R., ZILLIKEN F., GAUHE A., Chem. Ber., 1953, 4, 466, (98, 168).
- LEABACK D.H., WALKER P.G., J. Chem. Soc., 1957, 78, 4754, (16, 89, 92, 93, 97, 162, 164, 165, 167).
- LEDERER E., Communication personnelle (44).
- LEVY G.A., Mc ALLAN A., Biochem. J., 1959, 73, 127, (27, 125, 126).
- LLOYD K.O., BEYCHOK S., KARAT E.A., Biochem., 1967, 6, 1448, (61, 68).
- LLOYD P.F., EVANS B., FIELDER R.J., Carbohyd. Res., 1969, 9, 471, (63).
- MATSUSHIMA Y., MIYAZAKI T., Bull. Chem. Soc., Japan, 1965, 38, 1325, (25).
- MATSUSHIMA Y., MIYAZAKI T., PARK J.T., J. Biochem., 1963, 54, 109, (26).
- MICHL H., Monatsh Chem., 1951, 82, 489, (74).
- MOGGRIDGE R.C.G., NEUBERGER A., J. Chem. Soc., 1938, 745, (17, 19).
- MONSIGNY M., Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 1263, (143, 147).
- MONSIGNY M., Thèse Doct. Sci., Lille, 1968, (88).
- MONSIGNY M., 2e Thèse Doct. Sci., Lille, 1968, (38, 65, 69, 71, 84, 85, 134, 139, 144, 146, 151, 152, 155, 157).
- MONTGOMERY R., WU Y.C., J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547, (79, 95).

- MONTREUIL J., GRIMONPREZ L., TAKERKART G., MONSIGNY M.,
C. R. Acad. Sci., 1967, 265, 2124, (52).
- NEUBERGER A.,
J. Chem. Soc., 1940, 29, (31, 35, 102, 172).
- NEUBERGER A.,
J. Chem. Soc., 1941, 50, (54, 120, 122,
132, 185).
- NEUBERGER A., RIVERS R.P.,
J. Chem. Soc., (London), 1939, 122, (21,
22, 106, 108, 110).
- OSAWA,
Carb. Res., 1966, 1, 435, (106, 108, 110)
- PARTRIDGE S.M.,
Biochem. J., 1948, 42, 238, (73, 80, 159).
- PARTRIDGE S.M.,
Biochem. Soc. Symp., 3, 52, Cambridge
University Pres Ed., London,
1949, (75, 77).
- PERRY M.B., WEBB A.C.,
Can. J. Chem., 1969, 47, 4091, (59, 67,
141).
- PURDIE T., IRVINE J.C.,
J. Chem. Soc., 1903, 83, 1012, (1, 5, 47).
- ROSEMAN S., DAFFNER I.,
An. Chem., 1956, 28, 1743, (112, 158).
- ROTH W., PIGMAN W.,
J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 4608, (23, 55,
96, 119, 121, 127, 128, 129,
130, 131, 166, 181, 183, 184).
- RYDON H.N., SMITH P.W.G.,
Nature, 1952, 169, 922, (76, 83, 94).
- SEGARD E., MONTREUIL J.,
Communication personnelle (142).
- SRIVASTAVA H.C., HARSHE S.N., SINGH P.P.,
Indian. J. Chem., 1963, 1, 304, (7, 13,41).

- STANLEY P.G., Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1953, 31,
187 (81).
- SVENSSON S., BJORNDAL H., HELLERQUIST C.G., LINDBERG B.,
Angew. Chem. Internat. Edit., 1970, 9, 610
(138).
- WALLENFELDS K., BECHTLER G., KUHN R., TRISCHMANN H., EGGE H.,
Angew. Chem. Internat. Edit., 1963, 2, 515,
(58, 66).
- WHISTLER R.C., DURSO D.F., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 677, (113).
- WOLFROM M.L., VERCELLOTTI J.R., HORTON D.,
J. Org. Chem., 1964, 29, 547, (48).

