d'Ordre : 267

50376
1971
169

50376
1971
169

MEMOIRE PRESENTE

A L'UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE I

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

OPTION : BIOCHIMIE

par

Didier DELAY

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

SYNTHESE ET ETUDE DE QUELQUES DERIVES DE LA SERINE :

-D-GALACTOSIDES ET PEPTIDES

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

Président

Rapporteur

Examinateur

SCD LILLE 1
D 030 302679 3

50376
1971
169

50376
1971
169

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'ORLEANS (Professeur Ch. SADRON).

Que Monsieur M. MONSIGNY, Maître de Conférences, veuille trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour la formation qu'il m'a donnée. Je lui dois, non seulement le sujet de ce travail, mais aussi les nombreux encouragements et conseils qui m'ont permis de le mener à bien. Je suis heureux d'avoir pu profiter du contexte humain particulièrement agréable qu'il a su établir dans son groupe de travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur A. BRACK, Chargé de Recherches au C.N.R.S., qui m'a initié à la chimie des peptides, ainsi que Monsieur G. SPACH, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui a bien voulu m'accueillir dans son service.

030 036094 4

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

"Felix qui potuit rerum cognoscere causas"

(Virgile, Géorgiques, II, 489)

"Heureux celui qui a pu pénétrer les causes
secrètes des choses"

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

SYNTHESE DES GLYCOSIDES D'HYDROXY-AMINO-ACIDES 5

I - GENERALITES

II - DERIVES DE LA SERINE ET DE LA THREONINE 6

A) Blocage de la fonction amine 6
B) Blocage de la fonction acide 7

III - METHODES DE SYNTHESES 11

A) Méthode de FISCHER 11

1) Généralités 11
2) Catalyseurs 11
3) Conclusion 12

B) Méthode de HELFERICH 13

1) Généralités 13
2) Catalyseurs 13
3) Conclusion 13

C) Méthode de KOENIGS et KNORR 14

1) Généralités 14

2) Synthèse des halogéno-per-acétyl-oses 14
a) Nature des substituants 14
b) Nature de l'halogène 19
c) Anomérisation 22

3) Réaction de condensation de KOENIGS et KNORR 23
a) Généralités 23
b) Catalyseurs 23
c) Déshydratants 25
d) $AgClO_4$ et I_2 25
e) Solvants 26
f) Anomérisation 27
g) Modification de KOCHETKOV et al. 28

D) Méthode de KOCHETKOV 28

1) Généralités 28
2) Orthoesters 28
3) Synthèse de glycosides 29

IV - OBTENTION DE L'OSIDE PUR 30

A) Elimination des groupements protecteurs de l'acide aminé 30

B) Elimination des groupements protecteurs de l'ose 31

1) O-désacétylation 31
2) Autres substituants 32

C) Problème de la purification 33

V - CONCLUSIONS 34

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

SYNTHESE ET ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DE GALACTOSIDES DE LA SERINE ET DE LA THREONINE ET DE QUELQUES-UNS DE LEURS DERIVES 38

I - SYNTHESE DU O-SERYL β-D-GALACTOSIDE ET DU O-THREONYL β-D-GALACTOSIDE 38

A) Préparation de l'acétobromogalactose 39

B) Préparation de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide 43

1) Synthèse du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide 44
2) Synthèse de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide 46

C) Synthèse du tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-galactopyrannoside de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide 48

D) Passage au β-D-galactoside de l'hydroxy-amino-acide 51

1) N-débenzyloxycarbonylation et débenzylation de l'acide aminé 52
2) Désacétylation 53

E) Purification du β-D-galactoside d'hydroxy-amino-acide par filtration sur Sephadex G-10 54

F) Dosage du galactose et de l'hydroxy-amino-acide dans le β-D-galactoside de l'hydroxy-amino-acide 58

G) Critères de pureté 60

1) Electrophorèse 60
2) Chromatographie sur papier 60
3) Chromatographie automatique sur colonne de résines échangeuses de cations 61

H) Nature de l'anomérie 61

I) Conclusions 66

II - ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DU O-SERYL β-D-GALACTOSIDE ET DE QUELQUES-UNS DE SES DERIVES 67

A) Action de l'acide chlorhydrique 67

1) Préparation de la N-dinitro-2,4 phényl O-(β-D-galactopyrannosyl) L-sérine 67
2) Préparation de la N-acétyl O(β-D-galactopyrannosyl) L-sérine 69
3) Action de l'acide chlorhydrique sur le O-séryl β-D-galactoside et sur ses dérivés N-dinitrophénylé et N-acétylé 70

B) Action de la soude 75

1) Préparation de β-D-galactosides de la sérinamide 75
2) Action de la soude sur le β-D-galactoside de la sérine et sur son dérivé estérifié et amidé 84

SYNTHESE DE PEPTIDES ET DE GALACTOSIDES DE PEPTIDES (à suivre) 89

I - SYNTHESE DE PEPTIDES DE LA L-SERINE 90

A) Z-Ser-Gly-OBzl 92

1) Principe 92
2) Mode opératoire 92
a) Préparation de CH_3-C_6H_4-SO_3H,H-Gly-OBzl 92
b) Préparation de Z-Ser-OH 95
c) Préparation de Z-Ser-Gly-OBzl 95

B) Z-Ala-Ser-OBzl 96

1) Principe 96
2) Mode opératoire 96
a) Préparation de Z-Ala-OH 96
b) Préparation de HCl,H-Ser-OBzl 97
c) Préparation de Z-Ala-Ser-OBzl 99

C) Z-Ala-Ser-Gly-OBzl 99

1) Principe 99
2) Mode opératoire 100
a) Préparation de Nps-Ser-OH,DCHA 100
b) Préparation de CH_3-C_6H_4-SO_3H,H-Gly-OBzl 102
c) Préparation de Nps-Ser-Gly-OBzl 102
d) Préparation de HCl,H-Ser-Gly-OBzl 103
e) Préparation de Z-Ala-OH 103
f) Préparation de Z-Ala-Ser-Gly-OBzl 103

D) Conclusion 105

C O N C L U S I O N 106

B I B L I O G R A P H I E 109

A P P E N D I C E T E C H N I Q U E 124

I - PREPARATION OU PURIFICATION DES SOLVANTS ET DES MATIERES PREMIERES 124

II - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES 127

III - BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE 130

INTRODUCTION

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre des recherches qui sont entreprises au Laboratoire sur la structure des glycoprotides. Les glycoprotides sont des composés naturels ou synthétiques qui résultent de la conjugaison d'une fraction glucidique appelée glycanne avec une fraction protidique. Suivant la nature de la fraction protidique, on distingue trois classes de glycoprotides :

- les glyco-amino-acides,
- les glycopeptides,
- les glycoprotéines,

qui résultent de l'association d'un glucide avec, respectivement, un acide aminé, un peptide ou une protéine.

La détermination de la structure moléculaire d'un glycoprotide pose donc trois problèmes :

- celui de la structure du glycanne,
- celui de la structure du groupement protidique,
- celui de la liaison du glycanne avec le protide.

C'est à ce dernier problème que nous nous sommes attaché, en nous limitant à la mise au point de la synthèse et à l'étude des propriétés de glycosides (*) dont nous avons précisé la formule dans la figure 1 de la page 3, et qui résulte de la conjugaison, par une liaison β-glycosidique, du galactose et d'un hydroxy-amino-acide : la sérine ou la thréonine.

Il s'agit donc des composés suivants :

- le O-séryl β-D-galactopyrannoside, et
- le O-thréonyl β-D-galactopyrannoside.

Les raisons qui nous ont poussé à synthétiser et à étudier ces composés sont de deux ordres :

En premier lieu, ils ouvrent la porte à une série de synthèses de glycosides faisant intervenir la condensation d'oses neutres avec la sérine ou la thréonine.

En second lieu, il n'est pas exclu a priori que ces β-D-galactosides soient présents dans certaines glycoprotéines. En effet, dans de nombreux glycoprotéides, la fonction réductrice de l'ose terminal du glycanne est conjuguée avec la fonction alcoolique d'un hydroxy-amino-acide de la chaîne peptidique (sérine, thréonine, hydroxylysine ou hydroxyproline). Ce type de liaison a été mis en évidence dans les glycoprotides suivants : mycoside C_2 de *Mycobacterium avium*, mycoside Cb de *Mycobacterium butyricum*, mucines sous-maxillaires, héparine, acides chondroitines sulfuriques, lactotransferrine humaine, substances de groupes sanguins, tropocollagène, glycoprotéines de la membrane basale glomérulaire, globulines Ig A et Ig G, "extensine", paroi cellulaire d'une levure (voir à ce sujet la revue générale, MONSIGNY (1)).

De plus, le composé O-glycosidique de la thréonine présente un intérêt supplémentaire en ce sens que SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (2) ont montré que dans la lactotransferrine humaine, un groupement glycannique est conjugué à la fonction hydroxylée de la thréonine. Il devenait donc nécessaire de synthétiser ces composés de manière à posséder des témoins de référence de propriétés bien définies et de comparer ces dernières à celles du composé obtenu par dégradation des glycoprotéines soit par procédés enzymatiques, soit par procédés chimiques, soit en couplant ces différents procédés (voir les procédés d'exploration de la structure du point d'attache glycanne-protide dans la thèse de MONSIGNY (3)).

(*) Un glycoside résulte de la conjugaison d'un ose, par sa fonction réductrice semi-aldéhydique, avec la fonction alcoolique d'un autre composé.

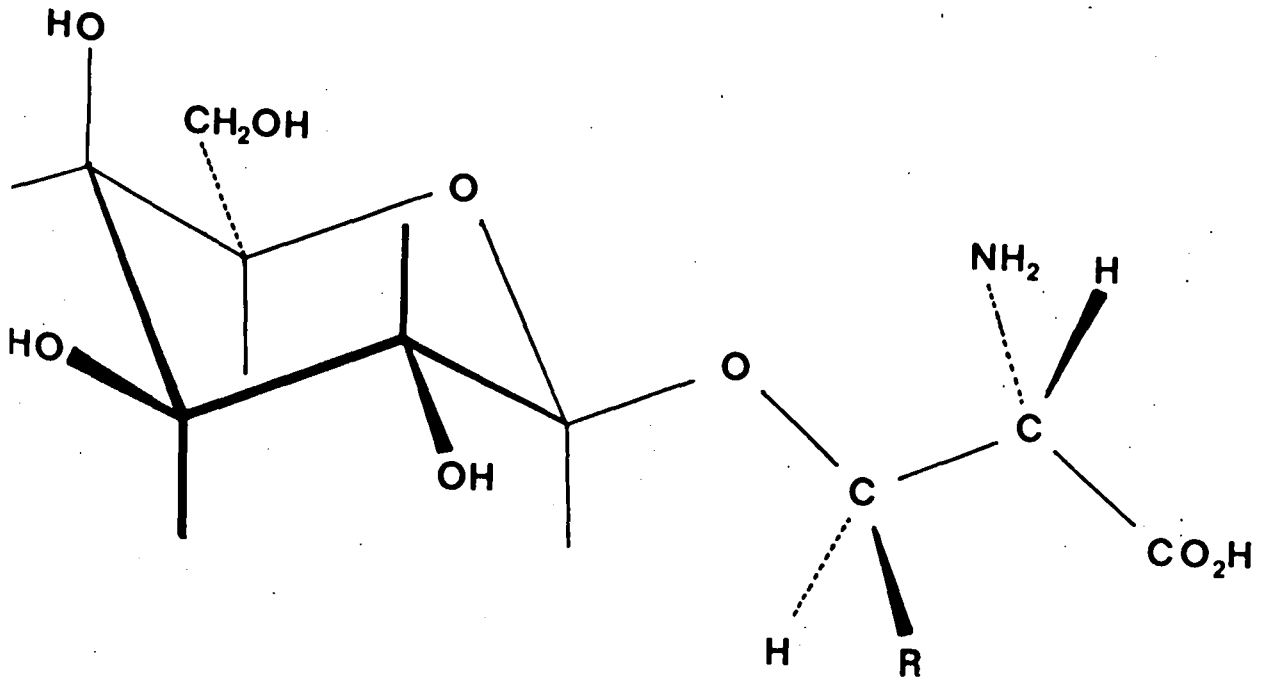


Figure 1

Formule du O-séryl (R=H) et O-thréonyl (R=CH_3) β-D-galactopyrannoside

Cette série de travaux nous a amené à mettre au point un procédé de synthèse du O-séryl β-D-galactopyrannoside qui a pu être utilisé pour la synthèse du O-thréonyl β-D-galactopyrannoside. Nous avons décrit les propriétés physico-chimiques de ces composés en nous attachant plus particulièrement à celles dont la connaissance sera précieuse dans l'exploration de la structure du point d'attache glycanne-protide dans les glycoprotides. Nous étudierons donc successivement le comportement chromatographique et électrophorétique de ces composés ainsi que leur stabilité dans les différentes conditions d'obtention. Pour cela, nous étudierons le comportement du O-séryl β-D-galactopyrannoside, déjà synthétisé par d'autres auteurs (KUM et ROSEMAN (4), DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (5) et RÜDE et MEYER-DELIUS (6)), ainsi que celui de certains de ses dérivés (dérivés N-dinitrophénylé et N-acétylé) en milieu acide et son comportement ou celui de ses dérivés en milieu alcalin.

Afin de posséder des modèles dont la structure se rapproche de celle de glycoprotéines, il devenait intéressant de synthétiser des galactosides de peptides. Pour cette raison, nous nous proposons de condenser le galactose avec des peptides de la sérine. Ces peptides seront choisis de manière à étudier l'influence de la substitution des groupements aminés et carboxyliques de la sérine, par des amino-acides. En polycondensant ces glycopeptides, nous obtiendrons des composés dont la partie peptidique plus importante permettra une étude de l'influence des groupements glycanniques sur la conformation des chaînes peptidiques.

Le plan de notre mémoire sera le suivant :

Dans un premier chapitre, nous donnerons un aperçu de la synthèse des glycosides en nous attachant plus particulièrement aux glycosides de β-hydroxy-amino-acides (sérine ou thréonine).

Dans un deuxième chapitre, nous exposerons les résultats que nous avons obtenus, d'abord à propos de la synthèse, puis à propos des propriétés des β-D-galactosides de β-hydroxy-amino-acide.

Dans un troisième chapitre, nous rapporterons la synthèse de quelques peptides de la sérine.

SYNTHESE DES GLYCOSIDES D'HYDROXY AMINO-ACIDES

I - GENERALITES

Différentes méthodes permettent de synthétiser des liaisons O-glycosidiques, c'est-à-dire des composés dans lesquels la fonction réductrice d'un ose est impliquée dans une liaison éther, ceci par conjugaison avec une fonction alcoolique.

Chronologiquement, la première de ces méthodes fut celle de FISCHER (7) qui, en 1893, condensa directement un sucre avec un alcool.

En 1901, KOENIGS et KNORR (8) proposèrent une nouvelle méthode de synthèse de glycosides. Ils utilisèrent un "acétohalogénose" au lieu d'un ose, lors de la condensation.

En 1933, HELFERICH et SCHMITZ-HILLEBRECHT (9) employèrent un sucre peracétylé et le condensèrent directement avec le phénol.

Plus récemment, en 1967, KOCHETKOV, KHORLIN et BOCHKOV (10) publièrent une nouvelle méthode de glycosylation, utilisant les orthoesters de sucres comme agents glycosylants.

De ces quatre méthodes actuellement connues, celle de KOENIGS et KNORR fut la plus largement utilisée, car elle est d'utilisation générale et donne des rendements satisfaisants. De plus, cette méthode s'impose dans notre cas, où l'alcool utilisé lors de la condensation est un alcool complexe (dérivé de la sérine ou de la thréonine), non liquide à la température de la réaction. De ce fait, la méthode de FISCHER (voir page 11), ce qui n'est applicable qu'aux alcools simples, ainsi que celle d'HELFERICH (voir page 13), qui utilise un phénol, sont exclues. Quant à la méthode de KOCHETKOV (voir page 28), elle est moins souhaitable que celle de KOENIGS et KNORR, car elle requiert une étape supplémentaire pour la formation de l'orthoester.

Nous nous attacherons donc principalement à la méthode de KOENIGS et KNORR en insistant plus particulièrement sur les points qui nous ont servi directement lors de la synthèse du O-séryl β-D-galactopyrannoside et du O-thréonyl β-D-galactopyrannoside.

II - DERIVES DE LA SERINE ET DE LA THREONINE

La sérine et la thréonine sont des hydroxy-amino-acides, c'est-à-dire des composés possédant une fonction alcool, une fonction amine et une fonction acide. Etant donné que seul le groupement hydroxyle doit réagir, il faut bloquer les fonctions acide et amine afin de rendre la condensation spécifique. Les substituants des fonctions que l'on veut masquer doivent répondre à certains caractères :

- la substitution doit être relativement facile et le rendement suffisant,
- les substituants doivent être stables dans les conditions de la condensation,
- ils doivent être ensuite facilement éliminés, sans dégrader le composé de synthèse.

A) BLOCAGE DE LA FONCTION AMINE

De nombreux auteurs ont utilisé le groupement benzyloxycarbonyle, car c'est celui qui répond le mieux aux exigences que l'on a nommées ci-dessus.

Le N-benzyloxycarbonyl-β-hydroxy-amino-acide est préparé par la réaction de l'amino-acide avec le chorure de benzyloxycarbonyle dans une solution aqueuse de pH légèrement alcalin.

Les diverses méthodes utilisées pour la synthèse de ces N-benzyloxycarbonyl-β-hydroxy-amino-acides, ainsi que les différents résultats sont rassemblés dans le tableau I (page 8).

Certains auteurs comme GUTTMANN et BOISSONNAS (20) ou CASH (21) proposent une N-acétylation des acides aminés repectivement par l'acide thio acétique et l'anhydride acétique. Mais cette méthode n'est pas applicable à notre cas, car la N-désacétylation s'effectue dans des conditions trop drastiques (par exemple, acide chlorhydrique 1 N à 100°C, pendant 1 h.).

LINDBERG et SILVANDER (22) bloquent la fonction amine par un groupement tosyle mais celui-ci ne peut être éliminé que par une coupure réductive par hydrolyse alcaline. L'utilisation de ces conditions alcalines explique les grandes pertes de produit par β élimination (voir page 85).

B) BLOCAGE DE LA FONCTION ACIDE

En général, la fonction acide est masquée en l'estérifiant. Cette estérification est, dans la majeure partie des cas, effectuée sur la N-benzyloxycarbonyl-sérine ou thréonine. Le méthanol et l'alcool benzylique sont les principaux alcools utilisés lors de cette réaction.

L'ester méthylique présente l'avantage d'une préparation facile mais la libération de la fonction carboxylique (voir page 30) implique des conditions qui conduisent souvent à des destructions importantes du produit de synthèse ; DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (23). JONES, PERRY, SHELTON et WALTON (24) le synthétisent par l'action du diazométhane sur l'acide carboxylique.

La préparation de l'ester benzylique est plus longue, car l'élimination de l'excès d'alcool benzylique requiert de nombreuses distillations azéotropiques avec le benzène en général, BEN-ISHAI et BERGER (25). Les différentes méthodes utilisées pour la préparation de l'ester benzylique de la N-benzyloxycarbonyl-sérine, ainsi que les divers résultats, sont réunis dans le tableau II (page 9).

TABLEAU. I

Méthodes de synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-sérine (Z-Ser-OH)

Méthode	Solvant de cristallisation	F*	$[\alpha]_D$ t°C		R*	Références
NaOH	$CHCl_3$	121	32	+ 5,6 (AcOH,c 6)	70	(A)
NaOH pH stat	AcOEt	117-119	26	+ 5,8 (AcOH,c 6)	78	(B)
MgO		119-120		+ 5,8 (AcOH,c 7)	72	(C)
NaOH pH stat	AcOEt					(D)
	$CHCl_3$	115-117			71	(E)
NaOH pH stat	AcOEt	117-118	32	+ 5,4 (AcOH,c 6)	80	(F)
$NaHCO_3$	AcOEt	119,5	22	+ 5,9 (AcOH,c 2,7) + 3,0 (MeOH,c 2,7) - 1,5 (DMF,c 2,7)	90	(G)
MgO		119		- 5,6 (AcOH,c 7)		(C)
NaOH pH stat	AcOEt					(D)
NaOH		125				(H)
	AcOEt-$CHCl_3$	123-124			65	(E)
MgO		124-125				(C)
NaOH pH stat		123-125			86	(F)
NaOH pH stat	AcOEt	120-122			73	(D)
$NaHCO_3$	AcOEt	125-126			87	(I)

point de fusion en °C ; R : rendement en p. 100.

ences : (A) : FRUTON (11) ; (B) : MOORE et al. (12) ; (C) : BAER et al. (13) ; (D) : SKINNER et al. (14) ; (E) : ADKINS et al. (15) ; (F) : JONES et al.(16); (G) : GUTTMANN et al. (17) ; (H) : BERGMANN et al. (18) ; (I) : RILEY et al. (19).

TABLEAU II

Méthodes de synthèse de l'ester benzylique de la N-benzyloxycarbonyl-sérine (Z-Ser-OBzl).

gu-n	Méthode	solvant de cristallisation	f *	$[\alpha]_D$ t°C		R	Références
	Z-SerO$^-$Na$^+$ + ϕCH_2Br/DMF	CCl_4-éther de pétrole	84-85		+5,7 ($CHCl_3$,c 4)		(A)
	Z-SerO$^-$Ag$^+$ + $\phi CH_2Cl/CH_3CN$		84,0 84,4	32 26	-8,7 (EtOH,c 5) +5,4 ($CHCl_3$,c 4)	48	(B)
	Z-SerOH + ϕCH_2OH + C_6H_6 + $\rho CH_3\phi SO_3H$	C_6H_6/Skelly-solve-éther de pétrole					(C)
	Z-SerOH + ϕCH_2OH + CCl_4 + $\rho CH_3\phi SO_3H$	CCl_4-éther de pétrole	83-84	21	+5,5 ($CHCl_3$,c 4,1)	70 78	(D)
	Z-SerOH + ϕCH_2OH + C_6H_6 + $\rho CH_3\phi SO_3H$	Et_2O	82-83	21	-8,8 (EtOH,c 5)		(E)
			84-85		+ 6,1($CHCl_3$)		(F)
	Z-SerO$^-$Na$^+$ + ϕCH_2Br/DMF	CCl_4- éther de pétrole			-5,5 ($CHCl_3$,c 4)	76	(A)
	Z-SerOH + ϕCH_2OH + C_6H_6 + $\rho CH_3\phi SO_3H$	C_6H_6/Skelly-solve-éther de pétrole					(C)
	Z-SerOH + ϕCH_2OH + CCl_4 + $\rho CH_3\phi SO_3H$	CCl_4-éther de pétrole	84-85		-5,6 ($CHCl_3$,c 4,0)	70-78	(D)

leau II (suite)

i-ion	Méthode	Solvant de cristallisation	f *	t°C	$[\alpha]_D$	R	Références
	Z-SerO$^-$Na$^+$ + ϕCH_2Br/DMF	CCl_4-éther de pétrole	72,5 73,5			70	(A)
	Z-SerO$^-$Ag$^+$ + $\phi CH_2Cl/CH_3CN$		74,0 74,4			68	(B)
	Z-SerOH + ϕCH_2OH + C_6H_6 + $\rho CH_3\phi SO_3H$	C_6H_6/Skelly-solve-éther de pétrole	73-74			85	(C)
	Z-SerOH + ϕCH_2OH + CCl_4 + $\rho CH_3\phi SO_3H$	CCl_4-éther de pétrole	72-73			70-78	(D)
	ϕSO_3H,H-SerOBzl + ϕCH_2OCOCl dans $NaHCO_3$	éther-éther de pétrole	74-75			73	(G)
	Z-SerOH + ϕCH_2OH + C_6H_6 + $\rho CH_3\phi SO_3H$	Et_2O-éther de pétrole	73-74			83	(E)
	Z-SerOH + ϕ-CH=N=N	AcOEt-éther de pétrole	72-74			73	(H)

* f : point de fusion en °C ; Rendement en p. 100 : R.

Références : (A) : BAER et al. (26) ; (B) : JONES et al. (27) ; (C) : SKINNER et al. (28) ; (D) : FÖLSCH et al. (29) ; (E) : BERGEL et al. (30) ; (F) : KUM et al. (31) ; (G) : RILEY et al. (32) ; (H) : SARIN et al. (33).

L'avantage de l'utilisation des groupements benzyle et benzyloxycarbonyle réside dans le fait que ces deux substituants peuvent être éliminés simultanément et sélectivement par hydrogénation catalytique sans toucher à la liaison glycosidique : BERGMANN, ZERVAS et ROSS (34).

Des méthodes de chromatographie sur couche mince de dérivés des N-benzyloxycarbonyl-amino-acides ont été décrites par de nombreux auteurs : WIELAND et BAUER (35) ; WIELAND et HEINKE (36) ; NEUMANN, LEVIN, BERGER et KATCHALSKI (37) ; BOISSONNAS et GUTTMANN (38) ; SCHELLENBERG (39) ; MASKALERIS, SEVEDAL et KIBRICK (40).

III - METHODES DE SYNTHESES

A) METHODE DE FISCHER

1) Généralités

La plus ancienne et la plus simple des méthodes de synthèses des glycosides est la réaction de FISCHER (41) dans laquelle le sucre est condensé directement avec un alcool en présence d'un ion hydrogène. Malheureusement, la méthode n'est applicable qu'aux alcools aliphatiques et aux monosaccharides. Les phénols ne réagissent pas et les disaccharides sont alcoolysés. La réaction n'est pas stéréospécifique mais l'on peut extraire du mélange réactionnel l'un ou l'autre, ou les deux anomères. Quelques sucres, tel le D-mannose, donnent essentiellement l'anomère α du glycoside. Il n'y a pas de méthode pour modifier le rapport α/β dans l'équilibre final, et les mélanges des anomères de glycosides ne sont pas aussi facilement fractionnés que leurs acétates. Aussi est-il quelquefois impossible d'isoler l'anomère désiré, même si celui-ci est formé en quantité suffisante. Cependant, le méthyl-β-D-glucopyrannoside peut être facilement séparé avec un bon rendement : RAYMOND et SCHROEDER (42).

2) Catalyseurs

Nous avons vu que la réaction de FISCHER est catalysée par des protons, aussi différents catalyseurs furent proposés.

a) Acide chlorhydrique

Dans la méthode originale de FISCHER, le sucre est mis à reflux quelques heures dans de l'alcool anhydre contenant de l'acide chlorhydrique sec, puis l'acide est éliminé par de l'oxyde ou du carbonate d'argent avant de concentrer la solution. Dans certains cas, la préparation peut être simplifiée en additionnant un solvant inerte, dissolvant uniquement les glycosides : SMITH et VAN CLEVE (43). En faisant la réaction à température ambiante, il est quelquefois possible de préparer les furannosides : PURVES et HUDSON (44) ; AUGESTAD, BERNER et WEIGNER (45) ; MONTGOMERY et HUDSON (46) ; LEVENE, RAYMOND et DILLON (47).

b) Résines échangeuses de cations

Une élégante amélioration de cette technique fut apportée par CADOTTE, SMITH et SPRIESTERSBACH (48) qui introduisirent les résines échangeuses de cations comme catalyseurs, qui peuvent être simplement éliminées par filtration à la fin de la réaction.

3) Conclusion

Dans notre cas, la méthode de FISCHER n'est pas applicable, car elle s'effectue en milieu acide (acide chlorhydrique ou résines échangeuses de cations) et dans ces conditions, la liaison O-glycosidique du O-séryl β-D-galactopyrannoside est instable (voir page 67). L'alcool utilisé dans la réaction de FISCHER jouant à la fois le rôle de solvant doit être liquide, de plus, étant en forte concentration, l'équilibre est déplacé vers la formation du O-glycoside ce qui ne peut convenir dans notre cas où le dérivé du β-hydroxy-amino-acide utilisé est solide.

De plus, la méthode de FISCHER n'est pas assez spécifique ; elle conduit au mélange des anomères et même au mélange des formes pyranniques et furanniques.

B) METHODE DE HELFERICH

1) Généralités

La réaction de HELFERICH et SCHMITZ-HILLEBRECHT (49) est une méthode générale largement utilisée pour la préparation des arylglycopyrannosides, plus particulièrement pour les α-D-glycosides.

Le sucre est d'abord acétylé comme dans la réaction de KOENIGS et KNORR, mais le sucre poly-O-acétylé est condensé directement avec le phénol fondu en présence de chlorure de zinc anhydre ou d'acide p-toluène-sulfonique servant de catalyseurs ; le premier favorise la formation de l'anomère α et le deuxième du β. On améliore les rendements en éliminant sous pression réduite l'acide acétique produit lors de la réaction, ou en additionnant : MONTGOMERY, RICHTMYER et HUDSON (50).

2) Catalyseurs

Les catalyseurs utilisés lors de la condensation de phénols sur des sucres acétylés sont très variés :

- chlorure de zinc : CONCHIE et LEVVY (51) ; BOLLENBACK, LONG, BENJAMIN et LINDQUIST (52).
- acide p-toluène-sulfonique : HELFERICH et SCHMITZ-HILLEBRECHT (53) ; BOLLENBACK et al. (54).
- chlorure de phosphore : BEMBRY et POWELL (55).
- acide sulfurique : HELFERICH, DEMANT, GOERDELER et BOSSE (56).
- chlorure stannique anhydre : LEMIEUX et SHYLUK (57).
- chlorure d'aluminium anhydre : HURD et BONNER (58).
- trifluorure de bore : BRETSCHNEIDER et BERAN (59).
- cyanure mercurique : FEIER et WESTPHAL (60), JERMYN (61).

3) Conclusion

La réaction de HELFERICH est une bonne méthode pour la préparation des arylglycopyrannosides. Sa faiblesse vient de l'absence d'une stéréospécificité suffisante ; FLOWERS et JEANLOZ (62,63).

Remarque : antérieurement aux travaux de HELFERICH, ZEMPLEN (64) avait relaté une synthèse de glycoside en condensant un sucre acétylé avec un alcool en présence de chlorure ferrique comme catalyseur.

C) METHODE DE KOENIGS ET KNORR

1) Généralités

En 1900, KOENIGS et KNORR (65,66) décrivent la synthèse du méthyl tétra-O-acétyl β-D-glucopyrannoside. Pour ce, ils condensent l'"acétobromoglucose" avec le méthanol à température ambiante, pendant quelques jours, en présence de carbonate ou d'oxyde d'argent pour neutraliser l'acide bromhydrique formé lors de la réaction, et éviter la désacétylation du produit. Il se pose donc deux problèmes :

- synthétiser des "acétohalogénoses",
- bloquer les groupements de l'aglycone pour ne laisser libre que la fonction alcool.

Ce dernier problème ayant déjà été abordé (voir page 6), nous ne parlerons que de la synthèse des "acétohalogénoses".

2) Synthèse des halogéno-per-acétyl-oses

On transforme l'ose en dérivé halogéné dans le but de rendre possible la condensation. L'halogène sera fixé sur le carbone 1, il est donc indispensable, pour que la condensation soit spécifique, de protéger tous les groupements fonctionnels pouvant réagir, en particulier les fonction alcools et amines.

a) Nature des substituants

Comme nous l'avons vu à la page 6 , les substituants des fonctions que l'on veut masquer doivent répondre à certains caractères. Outre une substitution relativement facile, les substituants doivent être stables dans les conditions de préparation des dérivés halogénés et dans les conditions de la condensation ; de plus, ils doivent être ensuite facilement éliminés, sans dégrader le composé de synthèse.

α) Alcool

Les fonctions alcools sont substituées pour ces raisons par des groupements : -acyl : acétyl, benzoyl ; -alcoyl : benzyl, trityl, isopropylidène.

Les groupements sulfonyl : tosyl, alcoyl : méthyl, ne pouvant être éliminés facilement, n'ont pas été utilisés.

1) acétylation :

La plupart des auteurs ont utilisé les dérivés acétylés. Ils sont assez faciles à préparer en grosse quantité, suffisamment stables dans la majorité des cas, et peuvent être éliminés par hydrolyse alcaline assez douce (voir la désacétylation page 31). Cependant, les groupements acétyles sont labiles vis-à-vis des acides et au moment de la condensation de KOENIGS et KNORR, il est nécessaire d'utiliser un accepteur d'acide. De plus, lorsque le groupe acétyle du carbone C_2 est trans par rapport à l'halogène, le dérivé est souvent instable : il y a formation d'un orthoester ; PACSU (67) (voir page 28). Ces deux inconvénients ne se rencontrent pas avec les dérivés benzoylés (voir page 18).

Un dérivé acétylé peut exister en ses deux configurations 1-C et C-1. La forme C-1, celle où les groupements acétyles occupent les positions équatoriales, est la plus abondante, DURETTE, HORTON et BHACCA (68) ; c'est le cas lors de l'acétylation du D-xylose en tétra-O-acétyl β-D-xylopyrannose par HUDSON et JOHNSON (69).

La forme des acétates cycliques formés par des procédés d'acétylation classiques est normalement la forme pyrannique quoique dans certains cas, comme avec le D-galactose, des structures furanniques peuvent être produites simultanément. L'acétylation du D-galactose conduit à quatre "peracétylgalactoses" : α-D et β-D-pyrannoses ; α-D et β-D-furannoses ; HUDSON (70) et HUDSON et JOHNSON (71).

L'acétylation s'effectue en présence d'anhydride acétique et d'un catalyseur. Une étude de différents catalyseurs a été faite par WOLFROM et THOMPSON (72).

- Pyridine : la pyridine est un solvant largement utilisé pour les sucres, car, lors de l'acétylation, elle sert de catalyseur et, de plus, neutralise l'acide libéré. La mutarotation est lente dans la

pyridine sèche et refroidie, et l'acétylation de l'α-D-glucose et du β-D-glucose avec l'anhydride acétique dans la pyridine se produit sans changement de l'anomérie à 0°C ; BEHREND et ROTH (73), HUDSON et DALE (74). Ce résultat a été confirmé par CONCHIE, LEVVY et MARSH (75) qui recommandent cette méthode pour l'acétylation du mannose. Ils obtiennent ainsi le β-D-penta-acétylmannose. FISCHER et OETKER (76) avaient déjà obtenu ce produit par une méthode identique. En effet, le mannose est un cas particulier. On obtient le penta-O-acétyl β-D-mannose à partir du mélange α-D et β-D d'un mannose commercial ; DALE (77), BONNER (78). Une bonne méthode d'acétylation du D-galactose est celle de JEANLOZ et STOFFYN (79) qui utilise la pyridine (voir les travaux personnels page 39). Si l'on travaille à haute température, on peut obtenir des configurations non classiques, et former occasionnellement des dérivés furanniques. Par exemple, le penta-O-acétyl β-D-galactofurannose est obtenu avec un rendement de 17 p. 100 en faisant réagir du D-galactose avec de l'anhydride acétique dans de la pyridine bouillante ; NESS, FLETCHER et HUDSON (80).

Le mécanisme de l'action de la pyridine s'explique par la formation d'un complexe de la pyridine avec les chlorures d'acides par exemple ; on forme ainsi un chlorure de pyridinium. La haute réactivité de ces sels de pyridinium est responsable de l'activité catalytique de la pyridine ; GOLD et JEFFERSON (81). Ce mécanisme a été repris par BUCK et al. (82).

$$Ac_2O + \text{pyridine} \rightleftharpoons \text{pyridine } Ac^+ + AcO^-$$

$$ROH \rightleftharpoons RO^- + H^+$$

$$\text{pyridine } Ac^+ + RO^- \longrightarrow ROAc + \text{pyridine.}$$

En conclusion, la pyridine est particulièrement conseillée pour ne pas avoir de mutarotation. De plus, les rendements sont souvent très satisfaisants. L'α-D-glucose donne l'α-D-peracétylglucose avec un rendement de 88 p. 100 alors qu'avec l'acide perchlorique comme catalyseur, le rendement est de 83 p. 100 ; WOLFROM et THOMPSON (83).

- Chlorure de zinc : le chlorure de zinc est le premier et le mieux connu des catalyseurs pour obtenir les α-acétyl dérivés des sucres ; ERWIG et KOENIGS (84). Par contre, le chlorhydrate de glucosamine conduit à l'anomère β ; FINDLAY, LEVVY et MARSH (85).

- Acide perchlorique : comme les autres catalyseurs acides, l'acide perchlorique conduit surtout à l'α-acétyl-dérivé. Ce catalyseur ne convient pas pour le galactose et le mannose : NICHOLAS et SMITH (86).

- Acide sulfurique : Ce catalyseur n'est pas plus avantageux que l'acide perchlorique pour la peracétylation des oses neutres ; REDEMANN et NIEMANN (87) bien que MONTGOMERY et HUDSON (88) le recommandent.

- Acétate de sodium : c'est le plus ancien des catalyseurs pour la peracétylation des sucres. Par chauffage du sucre avec l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium anhydre, celui-ci donne préférentiellement la forme β de l'acétyl-dérivé ; LIEBERMANN et HÖRMANN (89), FRANCHIMONT (90), ERWIG et KOENIGS (91), TANRET (92), WOLFROM et THOMPSON (93).

FISCHER (94) a expliqué le mécanisme d'une telle acétylation dans le cas du glucose. Dans ces conditions, l'équilibre entre les anomères du glucose a lieu, mais pas entre les anomères des esters, et l'hydroxyle en position équatoriale de l'anomère β est estérifié plus rapidement que l'hydroxyle en position axiale de l'anomère α.

- Anomérie des dérivés acétylés : L'anomérie du peracétyl-ose dépend de plusieurs facteurs :

- la nature L ou D de l'ose,
- la température à laquelle se produit la réaction,
- le type de catalyseur utilisé,
- enfin, dans certains cas, de l'ose lui-même.

Si l'acétylation s'effectue à basse température, (0°C), avec la pyridine comme catalyseur, il n'y a pas d'anomérisation avec le mélange α-D et β-D du glucose, par contre, on obtient le penta-O-acétyl β-D-mannose à partir du mélange α-D et β-D d'un mannose commercial. Les catalyseurs acides : chlorure de zinc, acide sulfurique ou acide perchlorique, conduisent au dérivé α-D, quel que soit l'anomère initial. Le chlorure stannique dans le chloroforme absolu peut être

utilisé pour anomériser les sucres acétylés et les alcoyl-glycosides ; PACSU (95). En présence d'acétate de sodium, et à température élevée, l'anomère β-D est obtenu préférentiellement sauf dans le cas du D et L-arabinose ; FEIER et WESTPHAL (96).

2) Benzoylation :

Les dérivés benzoylés ont l'avantage d'être plus stables en milieu acide que les dérivés acétylés et de plus, ne conduisent pas à la formation d'orthoesters. Par contre, leur préparation est longue et les rendements assez faibles ; FISCHER et OETKER (97), BRIGL et SCHINLE (98), FLETCHER (99).

3) Benzylation :

AUSTIN, HARDY, BUCHANAN et BADDILEY (100) ont proposé l'utilisation de dérivés benzylés qui sont très stables, et qui peuvent être éliminés facilement par une hydrogénation catalytique douce (voir page 33). L'inconvénient de cette méthode vient d'une préparation longue et du faible rendement.

4) Autres méthodes :

- la tosylation (p-toluène-sulfonylation) est très rarement utilisée ; BERNOULLI et STAUFFER (101).
- le blocage de deux hydroxyles cis et viscinaux peut être réalisé par addition d'acétone, on obtient de cette manière des dérivés isopropylidéniques ou par addition de benzaldéhyde, on forme des dérivés benzylidéniques.

β) Amine

Dans le cas d'une osamine, un problème supplémentaire apparaît, celui du groupement aminé : trois solutions peuvent être envisagées.

1) N-acétylation : La N-acétylation est très aisée. Les groupements N-acyle sont très stables, et ne peuvent généralement être éliminés sélectivement. Cependant, les osamines étant, dans la nature, N-acétylées, la plupart des auteurs ont utilisé ce mode de substitution. SHAPIRO, ACHER et RACHAMAN (102) ont utilisé un groupement dichloroacétyle pour bloquer la fonction amine de la glucosamine.

Malheureusement, ce groupement est éliminé en milieu alcalin, et il ne peut être utilisé pour substituer le groupement aminé d'un hydroxy-amino-acide, à cause de la β élimination en milieu alcalin (voir page 85). Le groupement bloquant la fonction amine des osamines doit être facilement éliminé après la synthèse du glycoside et son remplacement par un groupe acétyle ou lauryle apparaît être intéressant. RÜDE et MEYER-DELIUS (103) utilisent le groupement p-méthoxybenzylidène qui peut être chassé facilement par des conditions acides très douces ; ZERVAS et KONSTAS (104).

2) N-arylation : La N-arylation est également très aisée, par exemple la dinitrophénylation ; LLOYD et ROBERTS (105). Cette méthode conduit à des composés aux propriétés physicochimiques intéressantes, mais le groupement aryle ne peut être éliminé dans des conditions douces.

3) N-phosphorylation : ZERVAS et KONSTAS (106) ont préparé un dérivé N-diphénylphosphorylé de la tétra-O-acétyl glucosamine. Ce composé est très stable et permet la préparation du dérivé acéto-bromé. Le substituant N-diphénylphosphoryle peut être éliminé facilement par réduction à l'aide d'un catalyseur au palladium. L'inconvénient rencontré ici, est la durée de la préparation et le nombre d'étapes élevé.

b) Nature de l'halogène

Seuls les dérivés chlorés et bromés sont utilisés dans ces réactions ; les dérivés fluorés sont trop stables, et ne réagissent que trop peu, les dérivés iodés sont trop instables et trop difficiles à préparer. Les dérivés bromés sont utilisés chaque fois que leur stabilité est suffisante car ils sont plus réactifs que les dérivés chlorés. En effet, l'atome de brome étant plus gros que celui de chlore, les électrons périphériques sont moins retenus par le noyau, ce qui permet une polarisabilité plus importante. Cependant, on préfère parfois utiliser le dérivé chloré ; SCHLUBACH et SCHRÖTER (107) ; LELOIR et CARDINI (108).

Le plus souvent, la préparation du dérivé halogéné est effectuée par traitement du dérivé peracétylé avec une solution d'acide bromhydrique ou chlorhydrique dans l'acide acétique glacial. Il arrive que le dérivé acétohalogéné soit préparé en une étape, sans isoler le peracétate (voir page 21).

α) Dérivés bromés

En général, on traite le per-O-acétyl-ose par l'acide bromhydrique dissous dans l'acide acétique glacial. Le temps de réaction de l'acide bromhydrique est très important, car le traitement pendant des périodes prolongées de sucres peracétylés, conduit souvent au remplacement d'un second groupe acétoxyle par un atome de brome ; HAYNES et NEWTH (109). A la fin de la réaction, on évapore le mélange réactionnel et les dernières traces d'acide bromhydrique et d'acide acétique sont chassées par évaporation avec du toluène et avec du benzène sous pression réduite ; SKRAUP (110) ; LEVENE et TIPSON (111). Le penta-O-acétyl-D-glucopyrannose conduit au bromo-1 désoxy-1 tétra-O-acétyl-2, 3, 4, 6, α-D-glucopyrannose. On obtient l'anomère α, quelle que soit l'anomérie du peracétate ; FISCHER (112), BRAUNS (113), KARJALA et LINK (114), BATES (115), RÜDE et al. (116), BÄCHLI et PERCIVAL (117), DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (118). Il en est de même pour le galactose ; DEREVITSKAYA et al. (119) et pour le mannose ; GORIN et PERLIN (120). Cette méthode a été utilisée pour les osamines ; INOUYE et al. (121) et les disaccharides ; FREUDENBERG et SOFF (122), RÜDE et MEYER-DELIUS (123).

SCHLUBACH et WAGENITZ (124) utilisent l'acide bromhydrique liquide pour préparer le bromo tétra-O-acétyl β-D-galactofurannose à partir du penta-O-acétyl D-galactose. NICHOLAS et SMITH (125) font passer l'acide bromhydrique dans le mélange réactionnel après acétylation complète. La forme anomérique des acétobromo-oses est la forme α, quelle que soit la nature de l'anomérie du peracétyl-ose. Cependant, certains bromo dérivés d'oses benzoylés possèdent les deux anoméries, ceci provenant du fait que l'on n'a pas nécessairement une inversion de WALDEN ; JEANLOZ, FLETCHER et HUDSON (126,127), NESS, FLETCHER et HUDSON (128).

β) Dérivés chlorés

Les dérivés acétochlorés peuvent être préparés par l'action de chlorures sur des dérivés peracétylés. Les chlorures utilisés sont variés et doivent être rigoureusement anhydres car les α-acétochloro-oses sont très labiles et la moindre trace d'eau provoque une solvolyse ; MATTOK et PHILLIPS (129) :

- mélange chlorure d'aluminium et chlorure de phosphore VON ARLT (130) ; SKRAUP et KREMANN (131) ; HUDSON et JOHNSON (132) ; BRAUNS (133, 134) ; HUDSON et KUNZ (135) ; KUNZ et HUDSON (136) ; RICHTMYER et HUDSON (137) ; BONNER (138) ; PACSU et al. (139).

- tétrachlorure de titane ; PACSU (140) ; LEMIEUX (141) ; LEMIEUX et BRICE (142).

- chlorure de thionyle ; BRUNDISH, SHAW et BADDILEY (143).

- acide chlorhydrique ; SKRAUP et KREMANN (144) ; FOX et GOODMAN (145) ; FOX, YUNG, DAVOLL et BROWN (146) ; FISCHER et ARMSTRONG (147) ; KORYTNYK et MILLS (148).

γ) Réaction en une étape

Comme nous l'avons vu à la page 20 , l'action de l'acide bromhydrique dissous dans l'acide acétique sur un ose peracétylé de la série D conduit à l'anomère α de cet "acétobromo-ose", quelle que soit l'anomérie du peracétate. Ceci a conduit les auteurs à ne plus isoler l'un ou l'autre des anomères, mais à préparer le dérivé bromé sur le mélange des deux anomères peracetylés. En général, on utilise une solution saturée d'acide halohydrique dans l'acide acétique contenant 5 p. 100 d'anhydride acétique, celui-ci servant à capter les dernières molécules d'eau au cas où l'acide bromhydrique ne serait pas rigoureusement anhydre ; DALE (149, 150) ; HUDSON et SAYRE (151) ; HUDSON et DALE (152) ; GEHRKE et AICHNER (153) ; JEANLOZ et STOFFYN (154) (voir page 39) ; BRENDEL et DAVIDSON (155). CONCHIE et LEVVY (156) préparent, à partir du galactose, l'acétobromogalactose par action de l'anhydride acétique en présence d'acide perchlorique, et de l'acide bromhydrique sec. REDEMANN et NIEMANN (157) utilisent l'acide sulfurique comme catalyseur d'acétylation et ajoutent ensuite l'acide bromhydrique.

La méthode la plus caractéristique de synthèse d'"acétobromo-ose" en une étape est celle de BÅRCZAI-MARTOS et KÖRÖSY (158), qui utilisent une variante de la méthode de NICHOLAS et SMITH (159) où l'acide bromhydrique est engendré in situ. BÅRCZAI-MARTOS et KÖRÖSY partent d'un ose neutre (glucose, galactose ou xylose) et le traitent par l'anhydride acétique en présence d'acide perchlorique et de phosphore amorphe. Ensuite, ils ajoutent progressivement du brome puis 90 p. 100 de la quantité d'eau théorique pour

transformer ce brome en acide bromhydrique. Cette méthode a été reprise par SCHEURER et SMITH (160), WEYGAND (161) et LEMIEUX (162).

Une autre méthode de conversion directe d'un ose en son dérivé acétobromé ou acétochloré consiste à le traiter par l'halogénure d'acétyle approprié ; COLLEY (163), RYAN (164), VON CHARANTE (165). Mais ceci n'a plus qu'un intérêt historique en ce sens que la méthode fut la première à fournir du chlorure de tétra-O-acétyl α-D-glucopyrannosyle par action du chlorure d'acétyle sur le D-glucose ; COLLEY (166). Cependant, cette méthode a été utilisée par HORTON et WOLFROM (167) ainsi que par VERCELLOTTI et LUETZOW (168).

c) Anomérisation

Théoriquement, chaque formule cyclique des sucres réducteurs peut exister sous forme de deux diastéréoisomères, les anomères, qui diffèrent seulement par la position des substituants de l'atome de carbone hémiacétalique. Les modifications anomériques des dérivés O-acétylés des oses, des halogénures de glycosyle et des glycosides montrent des stabilités différentes, permettant le réarrangement d'une forme en l'autre sous des conditions expérimentales convenables.Quoique de telles anomérisations, souvent apportées par des catalyseurs "acides de LEWIS" et rarement par une base, soient des réactions fondamentalement réversibles, l'équilibre vrai est probablement rarement atteint à cause de nombreuses réactions secondaires ayant lieu dans ces molécules complexes ; PACSU, JANSON et LINDBERG (169). L'une des formes est généralement considérablement plus stable que l'autre. Pour la plupart des halogénures, la forme stable est la forme α, à l'exception toutefois des dérivés de l'arabinopyrannose, du ribopyrannose et du fructopyrannose ; HAYNES et NEWTH (170). La prédominance de la forme α des halogéno-oses est due à une répulsion de l'halogène par l'oxygène du cycle. EDWARD (171) a étudié ce phénomène ; la différence d'énergie libre entre des acétoxyles ou des méthoxyles axiaux et équatoriaux sur un cycle cyclohexanique est de 0,7 Kcal/mole en faveur de la position équatoriale. Par contre, le penta-O-acétyl α-D-glucopyrannose avec l'acétyle α axial, a une énergie inférieure de 1,1 Kcal/mole par rapport à l'anomère β équatorial. Ceci implique que la position α est préférentielle. L'anomère β serait formé mais se transformerait réversiblement en l'anomère α, thermodynamiquement plus stable ; LEMIEUX et BRICE (172) ; KORYTNYK et MILLS (173). Des mécanismes possibles de réactions d'anomérisation ont été proposés par PAINTER (174).

3) Réaction de condensation de KOENIGS et KNORR

a) Généralités

Comme nous l'avons vu à la page 14, KOENIGS et KNORR (175) décrivent la synthèse du O-méthyl-1 tétra-O-acétyl-2, 3, 4, 6 β-D-glucopyrannoside. La synthèse d'un O-séryl ou O-thréonyl-glycoside s'apparente aux synthèses osidiques classiques, c'est-à-dire à la réaction de KOENIGS et KNORR.

Un halogénure de poly-O-acyl-glycosyle, dissous dans un solvant approprié, réagit avec un alcool, la réaction étant accélérée par un catalyseur approprié. Nous étudierons donc les différents catalyseurs utilisés ainsi que les différents solvants.

b) Catalyseurs

Les catalyseurs utilisés lors de la réaction de KOENIGS et KNORR sont des accepteurs d'acides, capables de neutraliser l'acide halohydrique libéré lors de la formation de la liaison O-glycosidique. Ce sont souvent des sels d'argent ou de mercure. Cependant, la condensation peut être effectuée en utilisant la pyridine sans addition de sel minéral ; LLOYD et ROBERTS (176) ; LEMIEUX et MORGAN (177).

α) Pyridine en présence de sels d'argent : FISCHER et RASKE (178) ; HELFERICH, DOPPSTADT et GOTTSCHLICH (179) ; SCHLUBACH et SCHRÖTER (180).

β) Quinoléine : FISCHER et VON MECHEL (181) ; FISCHER et BERGMANN (182) ; HELFERICH et BREDERECK (183).

γ) Sels d'argent : dans leurs premières expériences, KOENIGS et KNORR (184, 185) utilisent du carbonate d'argent ou une solution aqueuse concentrée de nitrate d'argent pour éliminer l'acide halohydrique produit lors de la condensation, mais la présence d'eau dans le dernier cas est cause de mauvais rendements (voir page 25).

Ag_2CO_3 : le carbonate d'argent est l'un des catalyseurs les plus employés ; BÄCHLI et PERCIVAL (186) ; BRENDEL et DAVIDSON (187) ; KUM et ROSEMAN (188) ; RÜDE, WESTPHAL, HURWITZ, FUCHS et SELA (189) ; DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (190) ; KOCHETKOV, DEREVITSKAYA et KLIMOV (191).

L'utilisation de carbonate d'argent fraîchement préparé est très conseillée, WOLFROM et LINEBACK (192).

Ag_2O : oxyde d'argent utilisé par HELFERICH et KLEIN (193) ; REYNOLDS et EVANS (194) ; CONCHIE, LEVVY et MARSH (195) ; GOLDSTEIN, SMITH et SRIVASTAVA (196) ; JONES, PERRY, SHELTON et WALTON (197) ; GOLDSCHMID et PERLIN (198) ; ANGYAL et SHELTON (199). McCLOSKEY et COLEMAN (200) utilisent un mélange d'oxyde et de carbonate d'argent.

L'inconvénient de ces sels d'argent provient de ce que premièrement, ils sont peu solubles dans les solvants organiques et que, deuxièmement, il y a libération d'une molécule d'eau par action d'une molécule d'acide halohydrique.

$$Ag_2CO_3 + 2\ HX \longrightarrow 2\ AgX + CO_2 + H_2O$$

$$Ag_2O + 2\ HX \longrightarrow 2\ AgX + H_2O$$

Il faut donc ajouter un déshydratant (voir page 25).

$AgClO_4$: le perchlorate d'argent a l'avantage d'être relativement soluble, d'accélérer la réaction et de catalyser la condensation.

CH_3-CHOH-CH_2-CH_2-CO-O-Ag : l'hydroxy-4 valérianate d'argent utilisé par WULFF, RÖHLE et KRÜGER (201) est relativement soluble dans les solvants organiques.

δ) <u>Sels mercuriques</u> : l'utilisation du cyanure mercurique présente l'avantage d'éliminer l'acide halohydrique formé lors de la condensation sans amener d'eau au sein du mélange réactionnel :

$$Hg\ (CN)_2 + 2\ HX \longrightarrow Hg\ X_2 + \underline{2\ HCN}\nearrow$$

Cependant, la réaction produisant de l'acide cyanhydrique très toxique, il est indispensable de respecter certaines règles de sécurité. Ce catalyseur fut utilisé par KUHN et KIRSCHENLOHR (202,203) ;

HELFERICH et JUNG (204) ; HELFERICH et WEIS (205) ; LEHMANN et BECK (206) ; FLOWERS et JEANLOZ (207, 208) ; OSAWA et JEANLOZ (209) ; RÜDE, WESTPHAL, HURWITZ, FUCHS et SELA (210) ; VERCELLOTTI et LUETZOW (211) ; RÜDE et MEYER-DELIUS (212). Parfois, le cyanure mercurique est utilisé en mélange avec le bromure mercurique ; HELFERICH et WEIS (213) ; HELFERICH et ZIRNER (214). Quelquefois, le cyanure agit comme un réactant et non comme un catalyseur ; HELFERICH et WEDEMEYER (215), COXON et FLETCHER (216, 217).

c) Déshydratants

Il est apparu que des traces d'eau sont la cause de mauvais rendements dans la réaction de KOENIGS et KNORR. Aussi, cette réaction est-elle menée à l'abri de l'humidité. En effet, l'eau hydrolyse les dérivés halogénés. On utilisera donc des solvants anhydres (voir page 26). De plus, les acides halohydriques réagissent sur l'oxyde ou le carbonate d'argent et forment de l'eau (voir page 24). Pour éliminer cette eau, on ajoute un déshydratant au milieu réactionnel. HELFERICH, BOHN et WINKLER (218) utilisent le chlorure de calcium mais depuis les travaux de REYNOLDS et EVANS (219), la plupart des auteurs utilisent le sulfate de calcium ou "drierite" ; HASKIN, HANN, et HUDSON (220) ; EVANS, REYNOLDS et TALLEY (221) ; BÄCHLI et PERCIVAL (222) ; WOLFROM, PITTET et GILLAM (223) ; KUM et ROSEMAN (224) ; JONES, PERRY, SHELTON et WALTON (225) ; BRENDEL et DAVIDSON (226).

La vitesse de la réaction de condensation est diminuée par la présence du déshydratant ; aussi additionne-t-on de l'iode, ou du perchlorate d'argent pour accélérer la réaction.

d) $AgClO_4$ et I_2

Comme nous l'avons vu à la page 24, le perchlorate d'argent a l'avantage, en plus de catalyser la condensation, d'accélérer la vitesse de la réaction. Aussi fut-il utilisé par de nombreux auteurs : BREDERECK, WAGNER, FABER, OTT et RAUTHER (227) ; WOLFROM, PITTET et GILLAM (228) ; AUSTIN (229) ; ANGYAL et SHELTON (230) ; KUM et ROSEMAN (231).

L'iode également accroît la vitesse de la réaction de KOENIGS et KNORR ; HELFERICH, BOHN et WINKLER (232) ; REYNOLDS et EVANS (233) ;

BÄCHLI et PERCIVAL (234) ; GOLDSTEIN, SMITH et SRIVASTAVA (235) ; JONES, PERRY, SHELTON et WALTON (236). De plus, l'iode supprime les réactions secondaires entre l'oxyde d'argent et l'acétohalogéno-ose et empêche la formation d'orthoesters ; TALLEY, REYNOLDS et EVANS (237) ; GOLDSCHMID et PERLIN (238). ANGYAL et SHELTON (239) indiquent que le rapport optimum iode/oxyde d'argent est de 1 à 5.

e) Solvants

Les solvants ont une très grande importance. Ils doivent être exempts d'impureté, et particulièrement de traces d'eau (voir page 25) et de composés hydroxylés ou aminés. Aussi, les solvants du commerce seront-ils purifiés et déshydratés avant de les utiliser. Lorsque l'alcool utilisé pour la condensation n'est pas liquide, il est dissous dans un solvant approprié. Le benzène, le nitrométhane ou le chloroforme sans éthanol, sont les solvants les plus couramment utilisés. En général, la réaction est conduite dans le solvant en ébullition.

- le benzène : a été utilisé pour des composés extrêmement divers ; BÄCHLI et PERCIVAL (240) ; KUM et ROSEMAN (241) ; DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (242) ; ZEMPLÉN et GERECS (243) ; KUHN et KIRSCHENLOHR (244) ; VERCELLOTTI et LUETZOW (245) ; FLOWERS, LEVVY et SHARON (246).

- le nitrométhane : HELFERICH et JUNG (247) ; HELFERICH et WEIS (248) ; KUM et ROSEMAN (249) ; RÜDE, WESTPHAL, HURWITZ, FUCHS et SELA (250) ; RÜDE et MEYER-DELIUS (251). Dans certains cas, ce solvant a une influence sur l'anomérie du glycoside formé ; LEHMANN et BECK (252).

- le chloroforme : REYNOLDS et EVANS (253) ; JONES, PERRY, SHELTON et WALTON (254) ; BRENDEL et DAVIDSON (255). Le chloroforme commercial étant stabilisé par 0,5 p. 100 d'éthanol en poids, ce dernier doit être éliminé afin d'éviter les réactions secondaires.

- l'éther : WOLFROM, PITTET et GILLAM (256) ; KUM et ROSEMAN (257) ; WULFF, RÖHLE et KRÜGER (258).

- le chlorure de méthylène : ANGYAL et SHELTON (259).

- le toluène : KOCHETKOV, DEREVITSKAYA et KLIMOV (260).

- des bases tertiaires : HELFERICH, DOPPSTADT et GOTTSCHLICH (261).

f) Anomérisation

Un problème important qui se pose lors de la réaction de condensation de KOENIGS et KNORR est celui de l'anomérisation. La réaction de KOENIGS et KNORR conduit habituellement à l'anomère β, par exemple le bromure de tétra-O-acétyl α-D-galactopyrannosyle donne des β-galactosides ; ANGYAL et SHELTON (262). Cependant cette règle n'est pas absolue. Une certaine proportion, faible cependant, d'anomère α peut être obtenue, même dans les conditions classiques, avec le carbonate d'argent ; BRENDEL et DAVIDSON (263). Par contre, en utilisant le nitrométhane comme solvant et le cyanure mercurique comme catalyseur, et dans le cas particulier du rhamnose ou du mannose, on obtient les α-D-glycosides comme l'ont montré GORIN et PERLIN (264) ; LEHMANN et BECK (265) et ANGYAL et SHELTON (266). Cependant, l'utilisation de cyanure mercurique dans une solution de nitrométhane conduit généralement à la formation de β-D-glycosides et implique l'inversion de la configuration de l'acylhalogénoglycosyle réagissant en C1 ; FLOWERS et JEANLOZ (267).

Les mécanismes possibles des réactions d'anomérisation furent expliqués par LEMIEUX (268) et BONNER (269). Il s'agit du concept général de substitution nucléophile sur le centre glycosidique (C 1).

Il est connu depuis longtemps que certains catalyseurs permettent une anomérisation après condensation ; KAHLENBERG, DAVIS et FOWLER (270). La vitesse d'anomérisation dépend de l'aglycone : LINDBERG (271). Les principaux catalyseurs utilisés sont :

- le tétrachlorure de titane : PACSU (272, 273) ; LINDBERG (274) ; ASP et LINDBERG (275, 276) ; REEVES et MAZZERO (277).

- le chlorure stannique : PACSU (278).

- le fluorure de bore : LINDBERG (279, 280).

- le mélange acide sulfurique, acide acétique et anhydride acétique : LINDBERG (281) ; ASP et LINDBERG (282).

Séparation et détermination des anomères

La séparation des anomères d'un mélange peut être résolue par cristallisation ou par chromatographie séparative ; BRENDEL et DAVIDSON (283). La détermination de l'anomérie des composés de synthèse est faite en comparant les pouvoirs rotatoires avec les méthyl α et β-glycopyrannosides correspondants ; KUM et ROSEMAN (284) ; RÜDE et MEYER-DELIUS (285). Ce problème peut être également résolu grâce à des anomérases.

g) Modification de KOCHETKOV, DEREVITSKAYA et KLIMOV (286)

En étudiant la synthèse de glycosides d'hydroxyamino-acides, ces auteurs ont trouvé que les dérivés O-tert-butyle de la sérine et de la thréonine (dont les groupements aminés et carboxyliques sont substitués), sous certaines conditions sont glycosylés doucement par des acylhalogénoses pour former des O-glycosides avec des rendements supérieurs dans certains cas, à ceux obtenus en glycosylant les composés ayant le groupement hydroxyle libre.

D) METHODE DE KOCHETKOV

1) Généralités

Une nouvelle méthode de glycosylation utilisant les 1,2-O-alcoyl orthoesters des sucres comme agent glycosylant fut décrite par KOCHETKOV, KHORLIN et BOCHKOV (287, 288). Nous étudierons d'abord la synthèse des orthoesters puis la synthèse de glycosides à partir de ces composés.

2) Orthoesters

Il est connu que les composés halogénés, dans lesquels le substituant du carbone 2 et l'halogène sont trans, sont instables et conduisent à un orthoester ; FISCHER, BERGMANN et RABE (289), PACSU (290).

De nombreux auteurs ont décrit des synthèses d'orthoesters de sucre en partant des 1,2-trans-acylhalogéno-oses correspondants ; HAWORTH, HIRST et STACEY (291) ; NESS et FLETCHER (292) ; FLETCHER et NESS (293) ; LEMIEUX et BRICE (294) ; LEMIEUX et CIPERA (295) ; WOLFROM et WEISBLAT (296) ; WOLFROM, McWAIN, PAGNUCCO et THOMPSON (297) ; DALE (298) ; NESS, FLETCHER et HUDSON (299). Ces réactions ont lieu avec les alcools en présence de pyridine ou de carbonate d'argent.

Des méthodes de synthèse d'orthoesters en partant de 1,2-cis-acylhalogéno-oses plus stables que les trans, ont également été décrites ; HELFERICH et WEISS (300) ; SHULZ et STEINMAUS (301). En 1964, KHORLIN, BOCHKOV et KOCHETKOV (302) décrivent une nouvelle méthode de synthèse d'orthoesters fondée sur la condensation de 1,2-cis-acylhalogéno-oses avec des alcools dans l'acétate d'éthyle bouillant en présence de carbonate de plomb et de sulfate de calcium. Il y a probablement une double inversion de configuration en C1 qui implique la participation de l'acétate d'éthyle.

L'inversion de WALDEN est la règle en présence de catalyseur à base d'argent. Parce qu'il y a inversion de WALDEN lors du remplacement de l'halogène, la formation d'un orthoacétate (procédé compétitif de la synthèse des glycosides) est possible dans le cas d'un halogène trans, mais ne l'est pas directement dans le cas d'un halogène cis. Aussi, la méthanolyse de l'orthoacétate donne un mélange des anomères des glycosides ; CONCHIE, LEVVY et MARSH (303).

3) Synthèse de glycosides

Les 1,2-O-alcoyl-orthoesters des sucres sont utilisés comme agents glycosylants. On fait agir l'orthoester sur un alcool en présence de bromure mercurique dans le nitrométhane bouillant. La réaction conduit stéréospécifiquement aux 1,2-trans-glycosides ; KOCHETKOV, KHORLIN et BOCHKOV (304, 305). Il a été montré que la condensation peut donner deux produits : soit le glycoside, soit un nouvel orthoester ; le produit obtenu dépendant des conditions de la réaction ; KHORLIN, BOCHKOV et KOCHETKOV (306). La synthèse de l'ester méthylique de la O-(β-D-galactofurannosyl)-L-sérine donne un rendement de 17 p. 100 ; KOCHETKOV, DEREVITSKAYA, KHORLIN, VAFINA et BOCHKOV (307) ; DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (308) ; c'est la seule méthode qui permet d'obtenir le galactofurannoside car le 1,2-cis-acylhalogéno-

ose correspondant n'est pas connu. Les orthobenzoates sont des agents de glycosylation plus actifs que les orthoacétates ; KOCHETKOV, KHORLIN et BOCHKOV (309).

Le mécanisme de la réaction de KOCHETKOV, KHORLIN et BOCHKOV (310) fut expliqué par ces mêmes auteurs. La première étape de la glycosylation est la formation d'un carbonium. Puis il y a attaque nucléophile soit sur le carbone électrophile de l'orthoester et formation d'un nouvel orthoester, soit sur le centre glycosidique et formation du glycoside.

IV - OBTENTION DE L'OSIDE PUR

A) ELIMINATION DES GROUPEMENTS PROTECTEURS DE L'ACIDE AMINE

Nous avons vu qu'il était commode d'utiliser l'ester benzylique de la N-benzyloxycarbonyl-sérine car la débenzyloxycarbonylation et la débenzylation peuvent être effectuées simultanément par hydrogénolyse. Le produit est dissous soit, généralement, dans un alcool, soit dans du dioxanne aqueux ; KUM et ROSEMAN (311). Puis la solution est réduite par de l'hydrogène en présence de charbon palladié ; JONES, PERRY, SHELTON et WALTON (312) ; BRENDEL et DAVIDSON (313) ; RÜDE, WESTPHAL, HURWITZ, FUCHS et SELA (314) ; RÜDE et MEYER-DELIUS (315). La réduction peut se faire à l'aide du sulfate de baryum palladié ; DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (316).

Lorsque l'on utilise l'ester méthylique de la N-benzyloxycarbonyl-sérine, l'élimination de l'ester méthylique n'est pas réalisée par hydrogénolyse. Le produit débenzyloxycarbonylé peut être saponifié par la soude ; JONES, PERRY, SHELTON et WALTON (317) ; DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (318). Les ions sodium du mélange sont éliminés par un passage sur résines d'échangeurs de cations. Cependant, dans ces conditions, on ne peut éviter les pertes de l'oside par β élimination (voir page 85). Pour cette raison, il est conseillé d'utiliser l'ester benzylique.

B) ELIMINATION DES GROUPEMENTS PROTECTEURS DE L'OSE

1) O-désacétylation

A l'exception de la réaction de FISCHER, les méthodes générales employées pour la formation d'une liaison glycosidique conduisent à des glycosides acétylés (ou benzoylés). La désacétylation est accomplie par un traitement avec un alcali dans des conditions où la liaison glycosidique est stable, mais non les liaisons esters. La méthode classique de désacétylation est une saponification par la soude, la potasse ou la baryte. Il est à noter que, en milieu anhydre, il faut moins d'alcali que la quantité théorique requise ; CONCHIE, LEVVY et MARSH (319). Dans un article général, THOMPSON, WOLFROM et PACSU (320) décrivent les différentes méthodes de désacétylation, mais le procédé de LEABACK (321) au méthoxyde de sodium est recommandé de façon générale.

a) Désacétylation par les alcalis :

ABDERHALDEN et ZEMPLÉN (322) ; HUDSON et BRAUNS (323) ; FISCHER et VON MECHEL (324) ; GOLDSTEIN, SMITH et SRIVASTAVA (325) ; SKRAUP et KÖNIG (326) ; HELFERICH et ILOFF (327).

b) Désacétylation par le méthanolate de sodium :

C'est la méthode de désacétylation la plus utilisée actuellement ; HERZFELD (328) ; HUDSON et JOHNSON (329).

ZEMPLÉN (330) et ZEMPLÉN et KUNZ (331) trouvèrent que seulement des quantités catalytiques de méthanolate de sodium étaient suffisantes pour désacétyler un sucre ou un glycoside dans le méthanol à température du laboratoire. Cette désacétylation peut être complète en quelques minutes au bain-marie bouillant et produit de l'acétate de méthyle ; ZEMPLÉN, GERECS et HADÁCSY (332). Dans certains cas, par exemple lorsqu'il y a un groupement réducteur, il est préférable d'effectuer la réaction à température du laboratoire pendant une période de temps plus longue; ZEMPLÉN et PACSU (333). La réaction doit être conduite en milieu rigoureusement anhydre ; DALE (334) ;

IWATA (335) ; PACSU (336) ; LEVENE (337) ; HELFERICH et WEIS (338). La méthode est très douce ; MICHEEL et LENGSFELS (339) ; REYNOLDS (340). Les ions sodium sont éliminés par passage sur résines échangeuses de cations ; THOMPSON et WOLFROM (341).

c) Désacétylation par le méthanolate de baryum :

WELTZIEN et SINGER (342) ; ISBELL (343) ; MITCHELL (344); BONNER et KOEHLER (345) ; JONES, PERRY, SHELTON et WALTON (346) ; CONCHIE et LEVVY (347). Comme dans le cas précédent, le baryum est éliminé par passage sur résines échangeuses de cations ; WOLFROM, GEORGES et MILLER (348).

d) Désacétylation par d'autres alcoolates :

Méthoxyde de potassium ; BONNER et KOEHLER (349) ; éthanolate de sodium ; FISCHER et BERGMANN (350).

e) Désacétylation par l'ammoniac dans le méthanol :

HELFERICH, LÖWA, NIPPE et RIEDEL (351) ; TSOU et SELIGMAN (352) ; KUHN et KIRSCHENLOHR (353) ; KUHN, ZILLIKEN et GAUHE (354) ; BRENDEL et DAVIDSON (355) ; KUM et ROSEMAN (356) ; RÜDE et MEYER-DELIUS (357) ; DALE (358).

f) Désacétylation par des amines :

Diméthylamine dans l'éthanol ; IRVINE, OLDHAM et SKINNER (359) ; triéthylamine dans le méthanol ; KOCHETKOV, DEREVITSKAYA, KHORLIN, VAFINA et BOCHKOV (360) ; DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (361).

2) Autres substituants

Comme nous l'avons vu à la page 15, les fonctions alcools peuvent être substituées par des groupements acyle ou alcoyle.

a) La débenzoylation est obtenue dans des conditions analogues à celles utilisées pour la désacétylation ; JEANLOZ, FLETCHER et HUDSON (362).

b) La débenzylation est réalisée par hydrogénation catalytique douce ; AUSTIN, HARDY, BUCHANAN et BADDILEY (363).

c) La détritylation s'effectue par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique glacial ; HELFERICH et KLEIN (364) ; REYNOLDS (365).

C) PROBLEME DE LA PURIFICATION

1) Généralités

La condensation n'est jamais quantitative, aussi, reste-t-il des réactants en mélange avec le produit de synthèse attendu. Le problème de l'isolement du glycoside pur peut être résolu de différentes manières. Les différents composants du mélange peuvent être séparés par précipitation sélective mais l'on préférera la chromatographie de partage sur colonne en utilisant différents supports. Plus récemment, une purification sur colonne échangeuse d'ions a permis d'obtenir des résultats satisfaisants ; BRENDEL et DAVIDSON (366). La purification peut être effectuée à différents moments de la synthèse, soit juste après la condensation, soit après l'élimination des groupements protecteurs de l'ose ou de l'acide aminé, soit à la fin de toutes ces opérations.

2) Méthodes

a) Par précipitation sélective des différents composants du mélange après condensation ; BRENDEL et DAVIDSON (367) ; RÜDE et MEYER-DELIUS (368). L'inconvénient de cette méthode est que l'on ne peut précipiter sélectivement un produit sans entraîner partiellement d'autres produits.

b) Par chromatographie sur colonne d'alumine ; AUSTIN, HARDY, BUCHANAN et BADDILEY (369) ; DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (370) ; sur silice : KUM et ROSEMAN (371) ; DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (372) ;

sur magnésol-célite ; Mc NEELY, BINKLEY et WOLFROM (373) ; WOLFROM et LINEBACK (374) ; LLOYD et ROBERTS (375) ; sur célite : ROBBINS, KELLER, WRIGHT et BERNSTEIN (376) ; sur cellulose ; BRENDEL et DAVIDSON (377).

c) Par résines échangeuses d'ions :

BRENDEL et DAVIDSON (378) isolent le O-séryl-xyloside par chromatographie sur une colonne de Dowex 50 x12.

V - CONCLUSIONS

En utilisant les diverses méthodes que nous venons de décrire, divers auteurs ont synthétisé les glycosides de la sérine suivants : O-séryl β-D-xylopyrannoside, O-séryl α-L-rhamnopyrannoside, O-séryl β-D-galactopyrannoside, O-séryl β-D-galactofurannoside, O-séryl β-D-glucopyrannoside, O-séryl α-D-glucopyrannoside, O-séryl β-D-glucosaminopyrannoside. Les conditions de ces différentes préparations sont rassemblées dans le Tableau III (page 35).

TABLEAU III

Méthodes de synthèse de glycosides de la sérine.

de l'ose	Forme de l'amino-acide (**)	Condensation Solvant, catalyseur, t°C, durée	Nature du dérivé final	Références(*)
A) O-séryl β-D-xylopyrannoside				
romo	Z-Ser-OBzl	$CHCl_3$ Ag_2CO_3 25° - 16 j.	O-séryl β-D-xylopyrannoside	(A)
romo	Z-Ser-OBzl	C_6H_6 Ag_2CO_3 25° - 48 h.	O-séryl β-D-xylopyrannoside	(B)
	N-tosyl-Ser-OMe			(C)
) O-séryl α-L-rhamnopyrannoside				
romo se	Z-Ser-OBzl	CH_3NO_2 $Hg(CN)_2$ 40°-48 h.	O-séryl α-L-rhamnopyrannoside	(D)
romo se		CH_3NO_2 $Hg(CN)_2$		(E)
) O-séryl β-D-galactopyrannoside				
romo se	Z-Ser-OBzl	Et_2O Ag_2CO_3 25° - 48 h.	O-séryl β-D-galactopyrannoside	(B)
romo se	Z-Ser-OBzl	CH_3NO_2 $Hg(CN)_2$ 40° - 48 h.	O-séryl β-D-galactopyrannoside	(D)
romo se	Z-Ser-OMe	C_6H_6 Ag_2CO_3 80° - 12 h.	O-séryl β-D-galactopyrannoside	(F)

voir page 37, (**) voir page 90.

ne de l'ose	Forme de l'amino-acide	Condensation Solvant, catalyseur, t°C, durée	Nature du dérivé final	Références(*
D) O-séryl β-D-galactofurannoside				
l-méthyl acétate de étyl tofurannose	Z-Ser-OMe			(G)
-méthyl acétate racétyl tofurannose	Z-Ser-OMe	CH_3NO_2 $HgBr_2$ 100° - 4 h.	Ester méthylique du O-séryl β-D-galactofurannoside	(F)
E) O-séryl β-D-glucopyrannoside				
bromo se	Z-Ser-OBzl	CH_3NO_2 Ag_2CO_3 25° - 48 h.	O-séryl β-D-glucopyrannoside	(B)
bromo se	Z-Ser-OMe	C_6H_6 Ag_2CO_3 80° - 12 h.	O-séryl β-D-glucopyrannoside	(F)
bromo se	Z-Ser-OBzl	CH_3NO_2 $Hg(CN)_2$ 40° -48 h.	tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-glucopyrannoside de la sérine	(H)
F) O-séryl α-D-glucopyrannoside				
-2 hloro yrannose	Z-Ser-OBzl	Et_2O Ag_2CO_3 25° - 48 h.	O-séryl α-D-glucopyrannoside	(I)
G) O-séryl β-D-galactosaminopyrannoside				
hloro yl osamine	Z-Ser-OBzl	$CHCl_3$ Ag_2O/I_2 25°- 150h.	N-benzyloxycarbonyl O-β-D-galactosaminidyl sérinamide.	(M)

ir page 37.

de l'ose	Forme de l'amino-acide	Condensation Solvant, catalyseur t°C, durée	Nature du dérivé final	Références(*)
H) O-séryl β-D-glucosaminopyrannoside				
loro l mine	Z-Ser-OMe	$CHCl_3$ Ag_2O/I_2 25, 140h.	O-séryl β-D-N-acétyl glucosamine	(J)
loro l mine	DNP-Ser-OMe	C_6H_6 $Hg(CN)_2$ 80, 2 h.	(N-dinitro-2,4-phényl méthyl ester)-O-séryl β-D-N-acétyl glucosaminide	(K)
omo-N- xy dène mine	Z-Ser-OBzl	CH_2Cl_2 Ag_2CO_3 25, 48h.	O-séryl β-D-tri-O-acétyl N-acétyl glucosaminide	(D)
loro l mine	Z-Ser-OH	$CHCl_3$ Ag_2CO_3 25, 7 j.	O-séryl β-D-N-acétyl glucosaminide	(L)
loro l mine	Z-Ser-OH	$CHCl_3$ $HgCl_2$ HgO 25, 90 h.	O-séryl β-D-N-acétyl glucosaminide	(L)

: BRENDEL et al. (379) ; (B) : KUM et al. (380) ; (C) : LINDBERG et al. (381) ; : RÜDE et al. (382) ; (E) : HELFERICH et al.(383);(F):DEREVITSKAYA et al. (384) ; : KOCHETKOV et al. (385) ; (H) : RÜDE et al. (386) ; (I) : KUM (387) ; (J) : JONES al. (388) ; (K) : VERCELLOTTI et al. (389) ; (L) : BUCHET (390) et MONSIGNY (391) ; : WERRIES et al. (392).

TRAVAUX PERSONNELS

SYNTHESE ET ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DE GALACTOSIDES DE LA SERINE ET DE LA THREONINE ET DE QUELQUES-UNS DE LEURS DERIVES.

I - SYNTHESE DU O-SERYL β-D-GALACTOSIDE ET DU O-THREONYL β-D-GALACTOSIDE

La synthèse du O-séryl β-D-galactopyrannoside et du O-thréonyl β-D-galactopyrannoside, a comporté les 4 étapes suivantes, que nous avons illustrées par les figures 2 (page 40) et 4 (page 49).

Etape I : synthèse du bromo-1 désoxy-1 tétra-O-acétyl 2,3,4,6 α-D-galactopyrannose (acétobromogalactose).

Etape II : synthèse du tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-galactopyrannoside de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide, par condensation de l'acétobromogalactose avec l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide.

Etape III : passage au O-séryl et O-thréonyl tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-galactopyrannoside par "N-débenzyloxycarbonylation" et "débenzylation" simultanées du tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-galactopyrannoside de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide.

Etape IV : passage au β-D-galactopyrannoside par "O-désacétylation" du tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-galactopyrannoside.

A) Préparation de l'acétobromogalactose

A la suite de l'étude bibliographique concernant la préparation de l'"acétobromogalactose", à laquelle nous nous sommes livré, nous avons retenu le procédé de JEANLOZ et STOFFYN (393) qui fournit de bons rendements et un produit pur. De plus, il s'agit d'une réaction en une étape (voir page 21), qui dispense de l'isolement du peracétylgalactose.

1) Mode opératoire

a) Principe

Le galactose est peracétylé par l'anhydride acétique en présence de pyridine à température ambiante. La pyridine, ainsi que l'anhydride en excès, sont éliminés par évaporation sous pression réduite. On obtient dans ces conditions expérimentales un mélange des anomères du O-peracétyl galactose (voir page 42). Celui-ci est transformé en bromo-1 désoxy-1 tétra-O-acétyl-2,3,4,6 α-D-galactopyrannose en le traitant par l'acide bromhydrique en solution dans l'acide acétique à température ambiante. L'excès de réactif est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le sirop, dilué dans un peu d'éther anhydre, est placé à basse température et dans la plupart des cas, le bromo-1 désoxy-1 tétra-O-acétyl-2,3,4,6 α-D-galactopyrannose cristallise spontanément après quelques heures. Les différentes étapes de cette réaction sont rassemblées dans la figure 2 (page 40).

b) Technique

18 g de D-galactose dans un mélange de 90 ml d'anhydride acétique et de 130 ml de pyridine anhydre (*) sont agités 24 heures à la température du laboratoire dans un ballon bouché de 2 l. Après quelques heures d'agitation, le galactose est entièrement dissous. On laisse reposer 12 heures. Ensuite, les solvants sont éliminés complètement par une distillation sous vide. On répète la distillation sous pression réduite (15 mm de mercure) avec le toluène (*) ; la température étant maintenue au-dessous de 60°C. Le sirop obtenu est un mélange des anomères α et β du peracétyl-D-galactose (voir page 42). Les dernières traces de solvant sont éliminées à

(*) Nous avons décrit dans l'Appendice (page 124) la préparation de la pyridine anhydre et la purification du toluène.

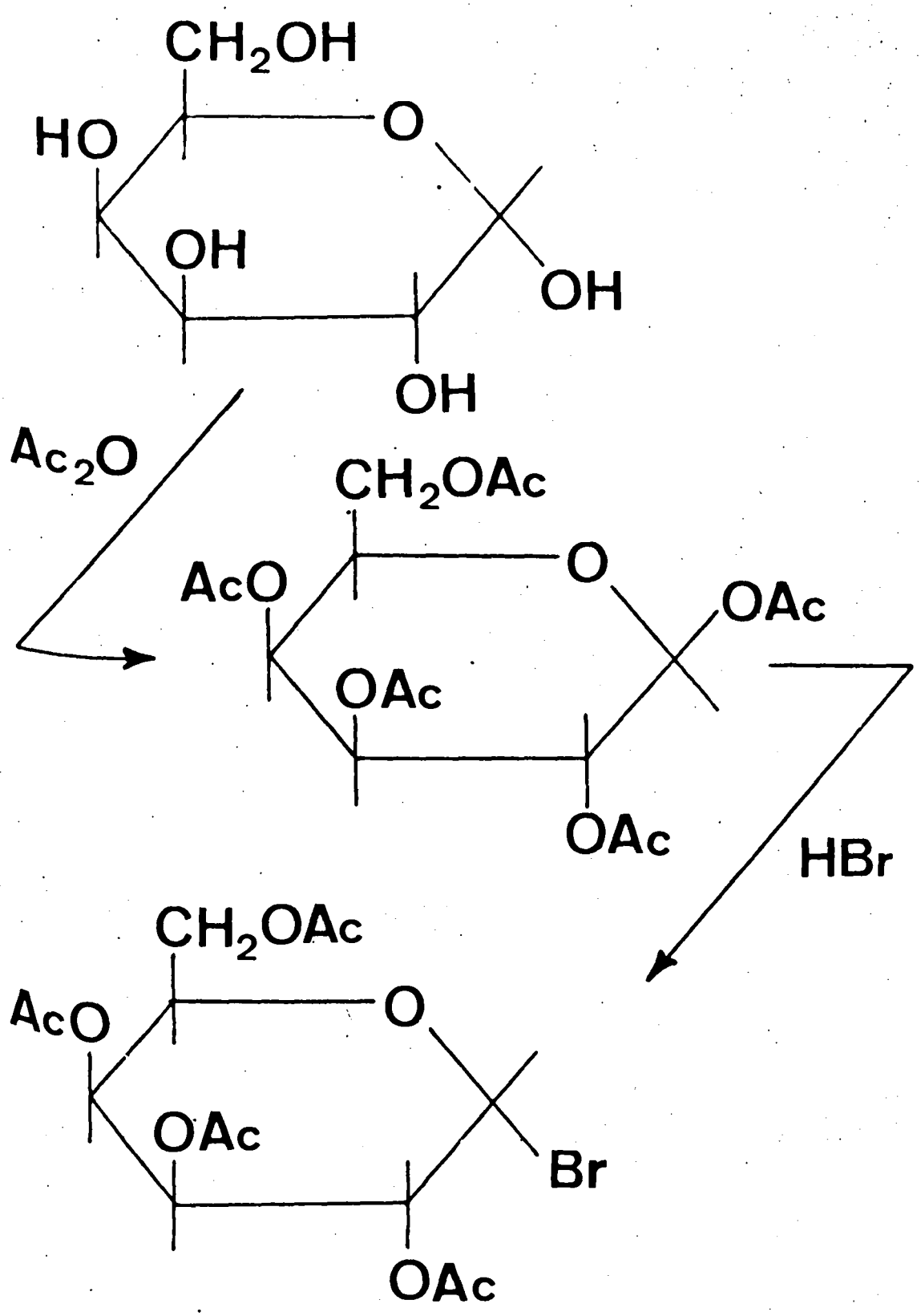


Figure 2

Schéma de la synthèse de l'acétobromogalactose.

basse pression (0,5 - 0,2 mm de mercure). Au cours de cette phase de l'opération, on fait fonctionner l'évaporateur rotatif de façon à ce que le sirop recouvre la paroi du ballon en une mince pellicule.

Au sirop, sont ajoutés 90 ml d'acide acétique glacial saturé, à 0°C, d'acide bromhydrique (*) et l'on agite vigoureusement le ballon bouché, à la température du laboratoire. On obtient une solution sirupeuse en 30 à 60 mn. Le mélange est conservé pendant 2 h. Au delà de ce temps, on obtient de faibles rendements (voir page 20) car il peut y avoir substitution d'un second groupe acétoxyle, principalement sur le carbone 6. L'excès d'acide bromhydrique et d'acide acétique est évaporé sous pression réduite grâce à une trompe à eau et les dernières traces de solvant sont éliminées sous forme d'azéotrope avec le toluène (7 fois avec 100 ml de toluène pur). Le sirop est finalement séché sous pression réduite (0,2 mm de mercure). La température du bain-marie est ensuite portée à 40 - 50°C. Le sirop épais est dilué avec 10 ml d'éther anhydre (*) et la ballon bouché, est placé à - 20°C. Dans la plupart des cas, l'acétobromogalactose cristallise spontanément après quelques heures.

Des traces d'acide bromhydrique empêchent la cristallisation du produit attendu. C'est pour cette raison que les codistillations sont nombreuses. Si le sirop refuse de cristalliser, on ajoute quelques gouttes d'éther de pétrole. En général, 48 h permettent une cristallisation complète. Le produit est réchauffé à 4°C, puis est isolé par filtration sur verre fritté n° 4. On lave avec un peu d'éther.

L'acétobromogalactose est conservé en dessicateur, en présence de chlorure de calcium et de potasse. Le dessicateur, protégé de la lumière, est placé en chambre froide à - 20°C.

2) Résultats

Nous obtenons des rendements de 55 à 65 p. 100. Les auteurs annoncent un rendement de 95 p. 100 ; et CONCHIE et LEVVY (394), 75 p. 100.

(*) Nous avons décrit dans l'Appendice (page 124) la préparation de l'acide bromhydrique.

(*) Voir l'Appendice (page 124).

La pureté de notre produit a été étudiée en chromatographie sur couche mince (*) en utilisant le système-solvant : benzène/méthanol/chloroforme (85:8:7). L'obtention d'une seule tache nous conduit à croire que notre produit est pur et ne contient qu'un anomère.

Point de fusion : 77,5°C - 79°C ; valeurs théoriques : JEANLOZ et STOFFYN (395) : 79 - 81°C ; PACSU, JANSON et LINDBERG (396) : 78 - 79°C ; CONCHIE et LEVVY (397) : 83 - 84°C ; OHLE, MARELEK et BOURJAU (398) : 84 - 85°C ; KUM et ROSEMAN (399) : 84 - 86°C.

Pouvoir rotatoire : $\left[\alpha\right]_D^{20°} = + 183,3°$ ($CHCl_3$)
valeurs théoriques : + 215° ($CHCl_3$) : CONCHIE et LEVVY (400) ; + 177,5° ($CHCl_3$) : PACSU, JANSON et LINDBERG (401) ; + 217° ($CHCl_3$) : OHLE, MARELEK et BOURJAU (402).

Remarques

1°) Lors d'une préparation, le peracétyl galactose a été isolé afin d'en connaître sa composition anomérique. Le sirop obtenu après acétylation est dissous dans un peu d'éther éthylique, puis est placé à - 20°C. Après 24 h. en chambre froide, le sirop prend en masse. Le produit est filtré et l'on obtient une poudre blanche par broyage au mortier. Une pesée du produit obtenu nous permet de conclure que la peracétylation du galactose dans les conditions décrites ci-dessus, est quantitative. Le pourvoir rotatoire de ce mélange de peracétyl galactose est : $\left[\alpha\right]_D^{24} = + 71,5°$ ($CHCl_3$) ; les valeurs proposées par HUDSON et PARKER (403) sont respectivement pour le peracétyl α-D-galactose : + 106,7° ($CHCl_3$) et pour le peracétyl β-D-galactose : + 25° ($CHCl_3$). Soit a le pourcentage en anomère α dans notre mélange, et b, le pourcentage en anomère β. Nous avons :

$$106,7\,a + 25\,b = 71,5$$

$$a + b = 1$$

ce qui implique que a = 0,57 et b = 0,43. Notre produit après acétylation se compose donc approximativement de 57 p. 100 de l'anomère α et de 43 p. 100 de l'anomère β.

(*) Voir la réalisation et la révélation des couches minces dans l'Appendice (page 124).

2°) Le système-solvant : benzène/méthanol/chloroforme (85:8:7) n'est pas idéal pour notre problème, c'est-à-dire pour suivre la réaction de bromation de l'ose peracétylé. En effet, dans ce système-solvant, le peracétyl-galactose ainsi que l'acétobromogalactose migrent sensiblement de la même façon (Rf = 0,90 - 0,95). Nous avons donc mis au point un nouveau système-solvant. Il s'agit du système-solvant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 35-70 (2:3) (v:v). Dans ces conditions, nous obtenons comme Rf, respectivement pour le peracétyl-galactose et pour l'acétobromogalactose : 0,40 et 0,60.

3°) Conclusions : Le peracétylgalactose peut ne pas être isolé car nous avons utilisé une méthode de synthèse de l'acétobromogalactose en une étape (voir page 21).

L'acétobromo-D-galactose se prépare à partir du D-galactose avec de bons rendements et s'obtient dans un état de pureté très satisfaisant, qui peut être aisément défini par l'application de la chromatographie sur couche mince. En outre, la détermination des constantes physiques du composé obtenu nous permet de conclure qu'il s'agit du bromo-1 tétra-O-acétyl-2,3,4,6 α-D-galactopyrannose.

B) Préparation de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide

Nous avons vu à la page 11 , que les radicaux benzyle et benzyloxycarbonyle étaient préférables à d'autres groupements. Aussi, l'hydroxy-amino-acide utilisé lors de la condensation sera sous la forme d'un ester benzylique de N-benzyloxycarbonyl-L-hydroxy-amino-acide.

Dans un premier temps, l'hydroxy-amino-acide sera transformé en son dérivé N-benzyloxycarbonylé. Il sera ensuite estérifié par l'alcool benzylique.

1) Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-L-hydroxy-amino-acide

A la suite de l'étude bibliographique concernant la préparation de la N-benzyloxycarbonyl-sérine, à laquelle nous nous sommes livré (voir page 8), nous avons retenu le procédé de GUTTMANN et BOISSONNAS (404) qui fournit de bons rendements.

a) Mode opératoire

α) Principe : Le N-benzyloxycarbonyl-L-hydroxy-amino-acide est préparé par action du chlorure de benzyloxycarbonyle sur l'acide aminé dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium. Le mélange réactionnel est ensuite acidifié dans le but de libérer de son sel le groupement carboxylique de l'amino-acide. Ceci est illustré par la figure 3 (page 45).

β) Technique : A une solution de 50 mmoles de L-hydroxy-amino-acide (5,25 g de sérine ; 5,95 g de thréonine) dans 200 ml de $NaHCO_3$ molaire, on ajoute à température ambiante sous très forte agitation 12,0 g (70 mmoles) de chloroformiate de benzyle ; l'addition de chlorure de benzyloxycarbonyle se faisant en 5 fractions sur une période d'environ 30 minutes. Après 2 heures d'agitation, le mélange réactionnel est extrait deux fois par 25 ml d'éther. La solution aqueuse, refroidie à 0°C, est amenée à pH 3 par addition d'acide chlorhydrique 5 N, sous forte agitation. A ce stade, le produit précipite partiellement. L'ensemble est extrait trois fois par de l'acétate d'éthyle. Après séchage de celui-ci sur Na_2SO_4, et évaporation, on obtient une masse cristalline. Le produit, dissous dans de l'acétate d'éthyle chaud est reprécipité par addition d'éther de pétrole.

b) Résultats - Conclusions

Les rendements, meilleurs pour le dérivé de la sérine, se sont montrés anormalement faibles (50 p. 100 environ) ; l'utilisation d'un pH_{stat} serait à envisager. L'analyse par chromatographie sur couche mince a montré que les produits obtenus sont purs.

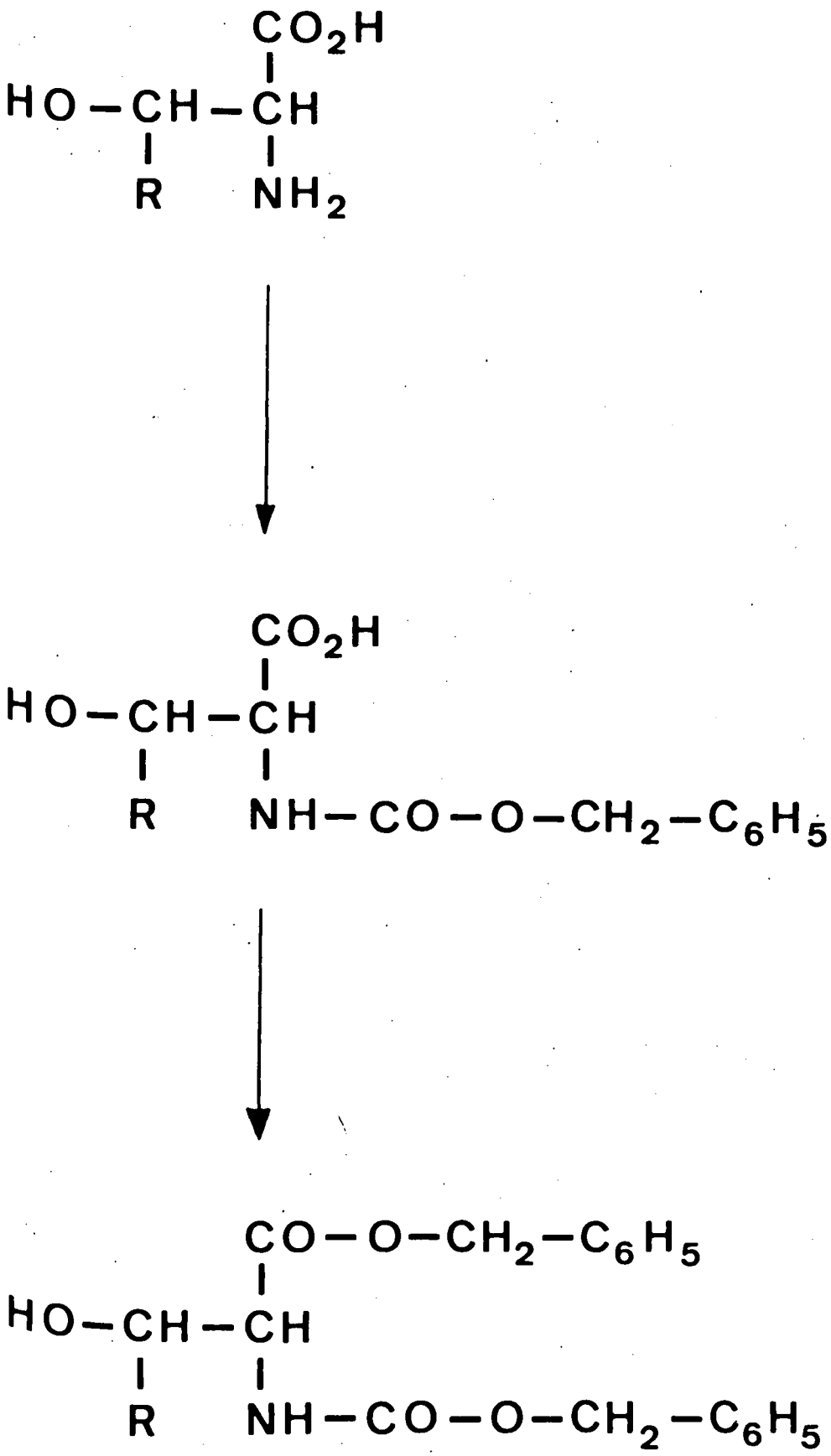


Figure 3

Schéma de la synthèse de l'ester benzylique du N-benzyloxy-carbonyl L-hydroxy-amino-acide.

α) Dérivé de la L-sérine :

F = 117-119°C $\left[\alpha\right]_D^{25}$ = + 5,8° (AcOH,c 6)

Valeurs théoriques : voir tableau I, page .

β) Dérivé de la L-thréonine :

F = 101-102°C $\left[\alpha\right]_D^{25}$ = - 5,6° (AcOH,c 3)

Valeurs théoriques :

$\left[\alpha\right]_D^{20}$ = - 5,8° (AcOH,c 2) = WÜNSCH et JENTSCH (405).

2) Synthèse de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl-L-hydroxy-amino-acide

La méthode de BERGEL et WADE (406) qui fournit de très bons rendements a été retenue. Elle dérive directement de la méthode de BEN-ISHAI et BERGER (407).

a) Mode opératoire

α) Principe : Le N-benzyloxycarbonyl-L-hydroxy-amino-acide est estérifié par l'alcool benzylique dans le benzène en présence d'acide p-toluène sulfonique comme catalyseur. La réaction est conduite à reflux. L'eau formée lors de l'estérification est éliminée azéotropiquement avec le benzène ; on déplace de cette manière l'équilibre vers la formation quantitative de l'ester. Ceci est illustré par la figure 3 (page 45).

β) Technique : Dans un ballon de 250 ml, on introduit 1/30 mole de N-benzyloxycarbonyl-L-hydroxy-amino-acide (8,0 g Z-Ser-OH ; 8,4 g Z-Thr-OH), 9 ml d'alcool benzylique redistillé, 90 ml de benzène (*) et 0,25 g d'acide p-toluène sulfonique. Le ballon est muni d'un réfrigérant ascendant du type DEAN et STARK permettant d'éliminer l'eau formée lors de l'estérification. Le mélange est maintenu à l'ébullition à reflux pendant 8 heures.

(*) Dans l'Appendice (page 124) nous avons donné une méthode de purification du benzène commercial.

Le volume de l'eau récupéré est d'environ 0,5 ml (théoriquement 1/30 mole, c'est-à-dire 0,6 ml). Après refroidissement, la solution est lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis lavée à l'eau trois fois. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium avant d'être évaporée sous vide. Le sirop est repris par du chloroforme puis concentré à l'évaporateur rotatif à 100°C. Cette opération est répétée une dizaine de fois. Cette codistillation sous vide permet d'éliminer l'excès d'alcool benzylique. Le sirop est précipité par de l'éther de pétrole puis placé au froid pour parachever la précipitation. Après essorage, le produit est dissous dans du chloroforme. Après évaporation sous vide, le sirop obtenu est dissous dans un peu d'éther et l'on ajoute à cette solution de l'éther de pétrole. On obtient le produit désiré sous forme de cristaux blancs qui sont essorés sur verre fritté. On laisse sécher plusieurs heures.

Remarque : Parfois, le produit cristallise à température ambiante avant l'addition d'éther de pétrole.

b) Résultats

La pureté des produits a été vérifiée en chromatographie sur couche mince.

α) Dérivé de la sérine :

F = 83 - 84°C $\left[\alpha\right]_D^{25}$ = + 5,5° ($CHCl_3$, c 4)

Valeurs théoriques : voir le tableau II, page 9.
Rdt = 73 à 87 p. 100.

β) Dérivé de la thréonine :

Rdt = 55 p. 100, Valeurs théoriques : F = 63-64°C pour le DL : BERGEL et WADE (408).

Remarque : L'élimination de l'excès d'alcool benzylique est primordiale. En effet, celui-ci pourrait donner des produits secondaires du type O-benzyl galactoside dans la réaction de condensation avec l'acétobromogalactose.

c) Conclusions

L'ester benzylique des N-benzyloxycarbonyl-L-hydroxy-amino-acides se prépare à partir des N-benzyloxycarbonyl-L-hydroxy-amino-acides avec de très bons rendements (notamment dans le cas du dérivé de la sérine), et s'obtient dans un état de pureté très satisfaisant.

C) Synthèse du tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-galactopyrannoside de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide

1) Principe

La synthèse des glycosides est effectuée, comme nous l'avons vu précédemment, par la réaction de condensation, dite de KOENIGS et KNORR, entre un ose acéto-halogéné et un groupe alcoolique porté par un autre composé dont les autres fonctions, susceptibles de réagir, ont été préalablement protégées. Dans le cas particulier de nos recherches, la synthèse a été réalisée en condensant le bromo-1 désoxy-1 tétra-O-acétyl-2,3,4,6 α-D-galactopyrannose avec l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide. Ceci est illustré par la figure 4 (page 49). La réaction de condensation s'accompagne d'une inversion de WALDEN au niveau de la fonction glycosidique. La synthèse d'un β-glycoside sera donc effectuée à partir du dérivé α-bromé (ou chloré) et celle d'un α-glycoside à partir du dérivé β-bromé (ou chloré). Elle nécessite, en outre, l'emploi de catalyseur (voir page 23).

2) Méthode

Plusieurs procédés de synthèse du O-séryl β-D-galactopyrannoside ont été décrits ; KUM et ROSEMAN (409) ; DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (410) ; RÜDE et MEYER-DELIUS (411).

Nous avons appliqué le mode opératoire de DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (412) en améliorant la méthode par la modification suivante : on utilise l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide au lieu de l'ester méthylique. On évite ainsi la saponification

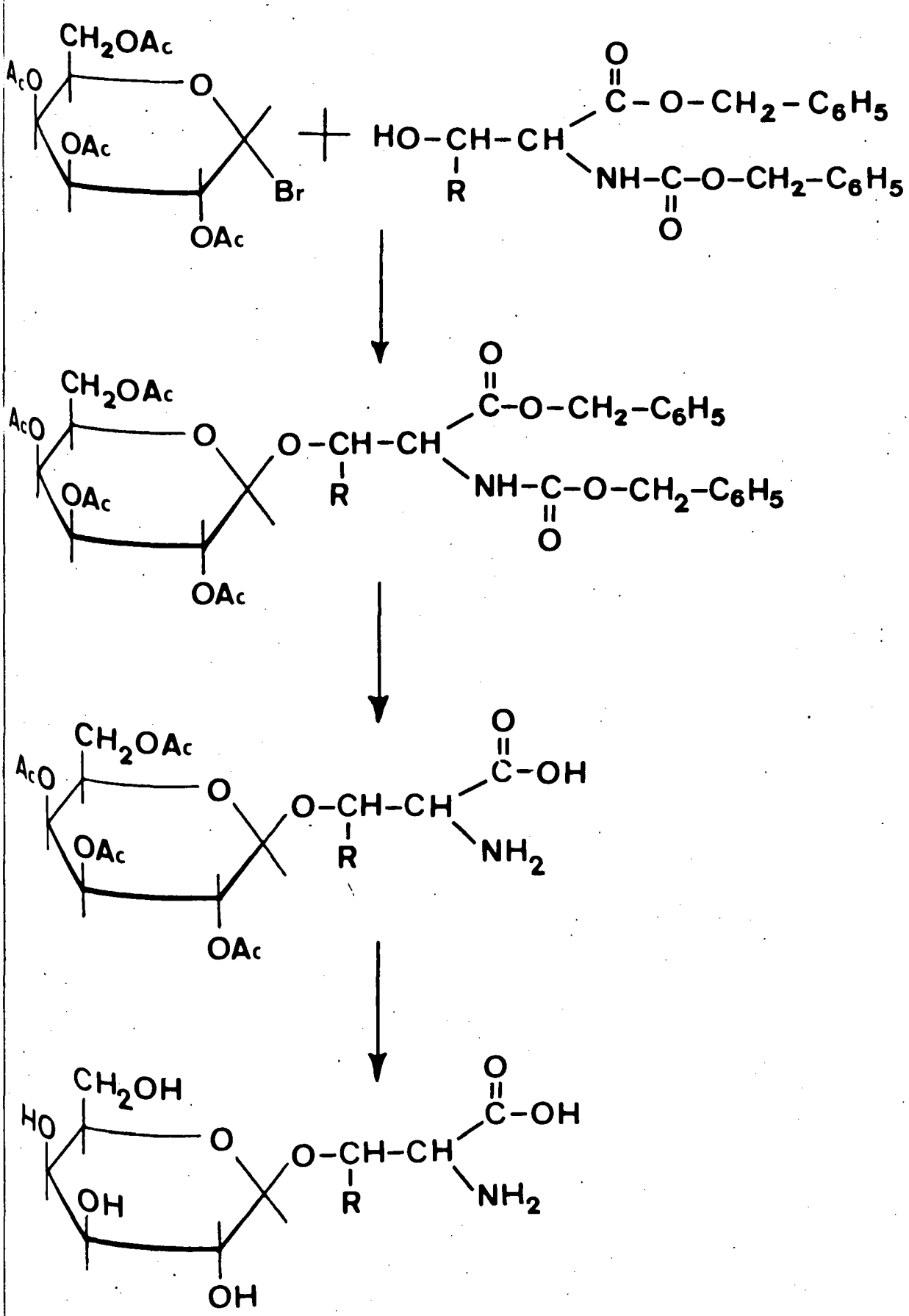


Figure 4

Schéma de la synthèse du galactoside de β-hydroxy-amino-acide

R=H : sérine R=CH_3 : thréonine

qui provoque une importante β-élimination (voir page 85) car la débenzylation s'effectue par hydrogénation catalytique.

a) Principe

L'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide est condensé avec le bromo-1 désoxy-1 tétra-O-acétyl-2,3,4,6 α-D-galactopyrannose dans le benzène bouillant en présence de carbonate d'argent comme catalyseur. Au fur et à mesure que le benzène distille, on ajoute du solvant pour laisser le volume du mélange réactionnel constant. A la fin de la réaction, le mélange est filtré sur verre fritté et le filtrat est concentré.

b) Technique

Dans un ballon de 250 ml, 10 mmoles d'ester benzylique de N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide (3,29 g Z-Ser-OBzl ; 3,43 g Z-Thr-OBzl) et 5,52 g de carbonate d'argent (20 mmoles) (*) dans 60 ml de benzène sec (**), est porté à ébullition avec une distillation lente. Pendant toute la durée de la condensation le ballon réactionnel sera placé à l'obscurité car les sels d'argent sont sensibles à la lumière. Afin déviter des surchauffes, le ballon sera placé dans un bain d'huile de paraffine.

Lorsque 20 ml de benzène ont distillé, 8,82 g de bromo-1 tétra-O-acétyl-2,3,4,6 α-D-galactopyrannose (21,5 mmoles) dans 100 ml de benzène anhydre sont additionnés et l'on continue à distiller le benzène. L'addition de solvant est prolongée jusqu'à ce que le volume de distillat soit de 350 à 450 ml, le volume du mélange réactionnel étant de 50-60 ml. Les additions de solvant se font par fractions de 20 ml environ. La condensation demande une dizaine d'heures. Le mélange est ensuite filtré sur verre fritté afin d'éliminer le catalyseur. Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif.

(*) Le carbonate d'argent utilisé dans les réactions de condensation de KOENIGS et KNORR est préparé de façon extemporanée, à l'obscurité, suivant le procédé de WOLFROM et LINEBACK (voir Appendice page 124).

(**) Le benzène utilisé est purifié suivant la méthode décrite dans l'Appendice (page 124).

Le sirop obtenu contient du tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-galactopyrannoside de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl-L-hydroxy-amino-acide, ainsi que de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl-L-hydroxy-amino-acide et du bromo-1 désoxy-1 tétra-O-acétyl-2,3,4,6 α-D-galactopyrannose n'ayant pas réagi.

Afin d'isoler le produit de condensation du mélange réactionnel, DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (413) chromatographient ce sirop sur colonne d'alumine, la phase fixe étant du benzène et l'élution étant réalisée par de l'éther de pétrole puis du benzène puis de l'éther. Nous avons également essayé d'isoler le produit de condensation par chromatographie sur colonne d'alumine en l'éluant par un gradient d'éthanol dans le benzène. L'analyse des différentes fractions après concentration et hydrolyse ne nous a pas permis d'observer des résultats satisfaisants. Aussi, la purification sera-t-elle réalisée sur le produit final (voir page 54).

3) Résultats- Conclusions

Une détermination approximative par électrophorèse après élimination des groupements protecteurs permet d'espérer un rendement de l'ordre de 50 p. 100.

L'application du procédé de DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (414) modifié par l'utilisation de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide, nous a permis de réaliser la synthèse du tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-galactopyrannoside de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide dans un état de pureté suffisant pour préparer, à partir de ce composé, le β-D-galactopyrannoside de l'hydroxy-amino-acide.

D) Passage au β-D-galactoside de l'hydroxy-amino-acide

Le passage du tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-galactopyrannoside de l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide au β-D-galactopyrannoside de l'hydroxy-amino-acide nécessite deux étapes (voir la figure page 49).

1) La débenzylation et la N-débenzyloxycarbonylation de l'acide aminé qui sont réalisées simultanément par hydrogénation catalytique.

2) La O-désacétylation de la fraction glucidique qui est effectuée par saponification sans provoquer de rupture de liaisons O-glycosidiques car le groupement carboxylique et le groupement aminé de la sérine sont libres (voir page 85).

1°) N-débenzyloxycarbonylation et débenzylation de l'acide aminé

a) Mode opératoire

α) Principe : Nous avons appliqué le procédé décrit par JONES et al. (415), dérivant de celui de SMITH et BERGMANN (416), de N-débenzyloxycarbonylation et de débenzylation simultanées par réduction catalysée par le charbon palladié.

β) Technique : 250 mg d'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl amino-acide O-peracétyl glycoside sont dissous dans 4 ml d'un mélange d'éthanol et d'acétate d'éthyle (4:1) (v:v). 200 mg de charbon palladié à 5 p. 100 MERCK sont introduits dans la solution qui est ensuite acidifiée par l'addition de 1 ml d'acide acétique glacial. Le mélange est agité pendant 24 à 48 heures sous une faible pression d'hydrogène (quelques cm de mercure) puis le catalyseur est éliminé par filtration. Le filtrat, auquel on ajoute les solutions éthanoliques provenant du lavage du charbon, est concentré à siccité sous pression réduite, à la température du laboratoire.

Nota : Le procédé de JONES avait été décrit par les auteurs pour effectuer la N-débenzyloxycarbonylation et la O-désacétylation simultanée des composés. Cette dernière était incomplète et s'achevait au cours de la déméthylation du carbonyle de l'amino-acide par saponification, mais cette dernière entraînait naturellement, la rupture de nombreuses liaisons glycosidiques par β-élimination et une baisse importante du rendement.

Remarque : Le charbon palladié, étant le catalyseur, peut être utilisé en quantité beaucoup plus faible. Par exemple, 8 g du sirop obtenu après condensation (voir page 50), dissous dans 50 ml EtOH/AcOEt (4=1) sont traités par 300 mg de charbon palladié à 5 p. 100.

b) Résultats - Conclusions

Nous avons tenté d'isoler le tétra-O-acétyl-2,3,4,6 β-D-galactopyrannoside de l'hydroxy-amino-acide, du mélange réactionnel, après cette hydrogénation. Malheureusement, le procédé de purification, par précipitation sélective des différents constituants du mélange, n'est pas intéressant car il ne conduit pas à un produit pur. De plus, le nombre élevé de manipulations, entraîne une diminution du rendement en produit de synthèse. La désacétylation sera donc réalisée directement sur le sirop obtenu après hydrogénation catalytique.

2°) Désacétylation

a) Mode opératoire

α) Principe : La saponification des fonctions O-acétylées peut être spécifiquement réalisée essentiellement de deux manières (voir page 31).

- par la soude diluée 0,1 N à 20°C pendant 30 à 60 mn, la purification de l'hydrolysat étant ensuite effectuée par un passage sur échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; forme acide).

- par le méthanolate de sodium, à 0-4° C, pendant 15 à 24 h, les ions sodium étant ensuite éliminés par un passage sur échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; forme acide).

Dans les deux cas, les solutions d'élution des résines par une solution ammoniacale à 5 p. 100 (v:v) sont évaporées sous vide à siccité.

β) Technique : 50 mg de substance acétylée (poudre ou sirop) sont dissous dans 1 ml de méthanol anhydre. On ajoute 65 µl de méthanolate de sodium 0,4 N (voir Appendice page 124). La fiole est laissée 24 h à 4°C. Les ions sodium sont ensuite éliminés par un passage sur échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; forme acide) La colonne est ensuite éluée premièrement par de l'eau distillée. On obtient un éluat contenant la fraction neutre (essentiellement

du galactose). Le volume d'eau pour l'élution doit représenter 3 à 4 fois le volume de la colonne. Deuxièmement, la colonne est éluée par une solution ammoniacale à 5 p. 100 (v:v). Celle-ci va déplacer les amines fixées sur la colonne (galactoside de l'hydroxy-amino-acide et hydroxy-amino-acide) (fraction basique). Les éluats sont concentrés sous pression réduite puis sont étudiés électrophorétiquement.

b) Résultats- Conclusions

Les résultats sont illustrés par la figure 5 (page 55). La fraction neutre contient essentiellement du galactose. Par contre la fraction basique contenant le β-D-galactoside de l'hydroxy-amino-acide est encore très riche en acide aminé libre. Une purification supplémentaire s'impose ; elle sera réalisée sur gel de dextranne de type Sephadex G-10.

E) Purification du β-D-galactoside d'hydroxy-amino-acide par filtration sur Sephadex G-10.

Nous avons vu précédemment que les tentatives de purification du produit de synthèse, soit par chromatographie sur colonne d'alumine, soit par précipitation sélective, n'apportaient pas un résultat satisfaisant. Le produit est donc purifié après élimination des groupements protecteurs, c'est-à-dire après débenzyloxycarbonylation et débenzylation par hydrogénation catalytique, ainsi qu'après désacétylation par le méthanolate de sodium. Après cette dernière opération, la fraction contenant le produit de synthèse ne contient plus de galactose libre, celui-ci se trouvant dans la fraction neutre obtenue par élution à l'eau distillée de la résine échangeuse de cations de type Dowex 50x8. Le produit de synthèse est donc souillé par l'acide aminé hydroxylé, et c'est celui-ci que nous nous proposons d'éliminer par filtration sur tamis moléculaire. Les masses moléculaires du O-séryl-β-D-galactoside et de la sérine étant respectivement 267 et 105, et celles du O-thréonyl-β-D-galactoside et de la thréonine étant respectivement 281, et 119, seul le gel de type Sephadex G-10 nous permettait d'espérer une séparation de ces deux produits.

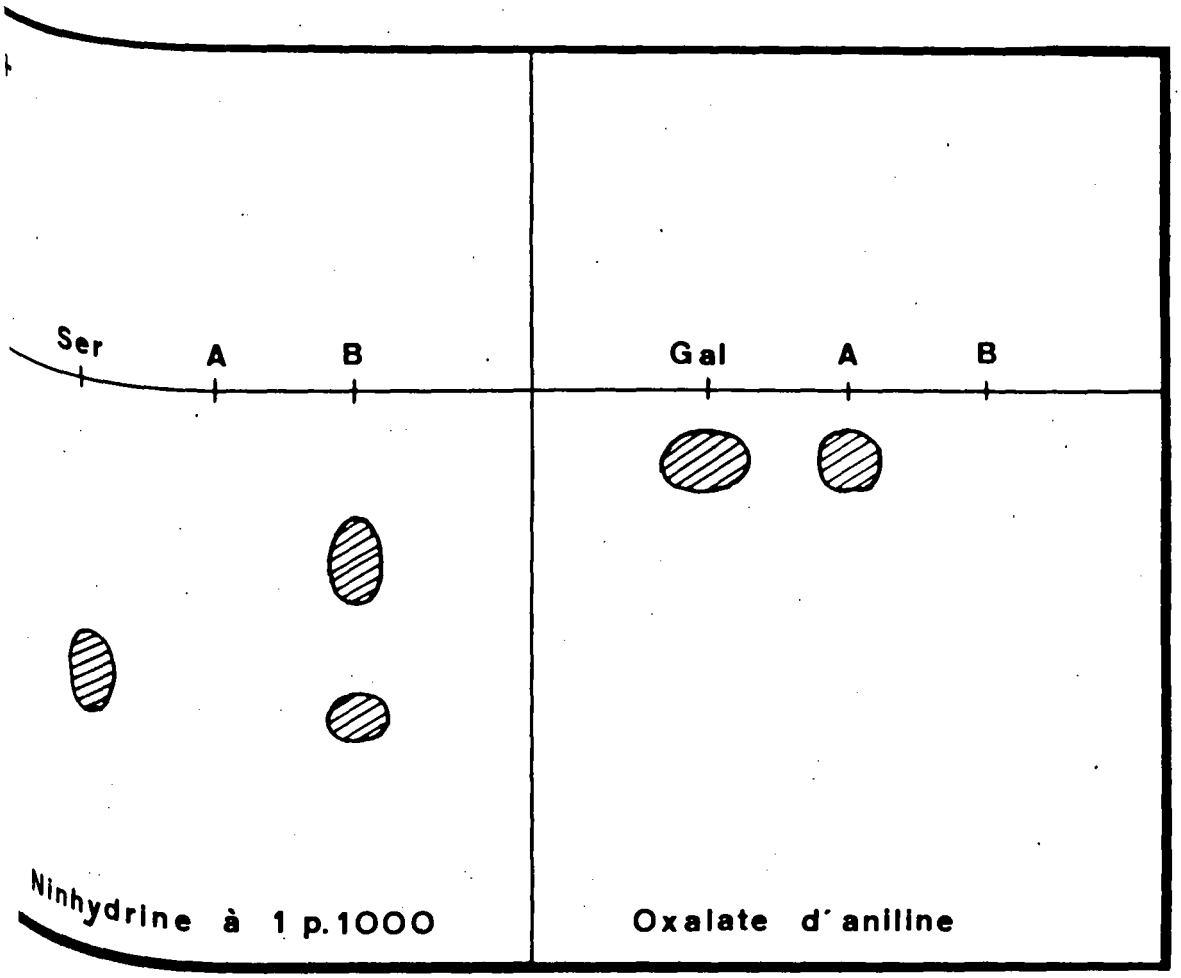


Figure 5

Electrophorèse à pH 2,4 de l'éluat de la colonne échangeuse de cations (Dowex 50x8 ; forme acide) après désacétylation par le méthanolate de sodium.

A : fraction neutre (galactose)

B : fraction basique (ß-D-galactoside de l'hydroxy-amino-acide et hydroxy-amino-acide).

1) Mode opératoire

a) Principe

Le Sephadex G-10 est un gel de dextranne jouant le rôle d'un tamis moléculaire. Un mélange de produits de masses moléculaires différentes est injecté en haut d'une colonne de ce gel. La colonne est ensuite éluée par de l'eau distillée. Les différents composants du mélange sont élués dans l'ordre inverse de leur masse moléculaire.

b) Technique

100 mg du mélange β-D-galactoside de l'hydroxy-amino-acide et acide aminé hydroxylé dans 3 ml d'eau distillée sont injectés à l'aide d'une seringue en haut d'une colonne (1x120 cm) de Sephadex G-10. La colonne est ensuite éluée par de l'eau distillée et l'éluat est récupéré dans des tubes à essais, par fractions de 1 ml.

Le repérage des produits, contenant une fonction amine primaire libre, est réalisée par une réaction spécifique grâce au révélateur à la ninhydrine à 1 p. 1000. Lorsque les tubes contenant le produit sont identifiés, une étude électrophorétique permet de préciser la nature des composés.

2) Résultats

Le β-D-galactoside est élué avant l'hydroxy-amino-acide, cependant il y a un chevauchement des pics. Ce résultat est illustré, pour le cas du composé de la sérine, par la figure 6 (page 57). Les fractions contenant uniquement du β-D-galactoside sont rassemblées et évaporées sous vide à siccité. Le produit refuse de cristalliser aussi, est-il lyophilisé. Les fractions contenant le produit de synthèse ainsi que de l'hydroxy-amino-acide sont concentrées sous vide et recyclées sur la même colonne de Sephadex G-10.

3) Conclusions

Le β-D-galactoside de l'hydroxy-amino-acide est obtenu dans un état de pureté très satisfaisant. L'inconvénient de la purification sur Sephadex G-10 est que la quantité de produit injecté doit être faible pour permettre une séparation convenable.

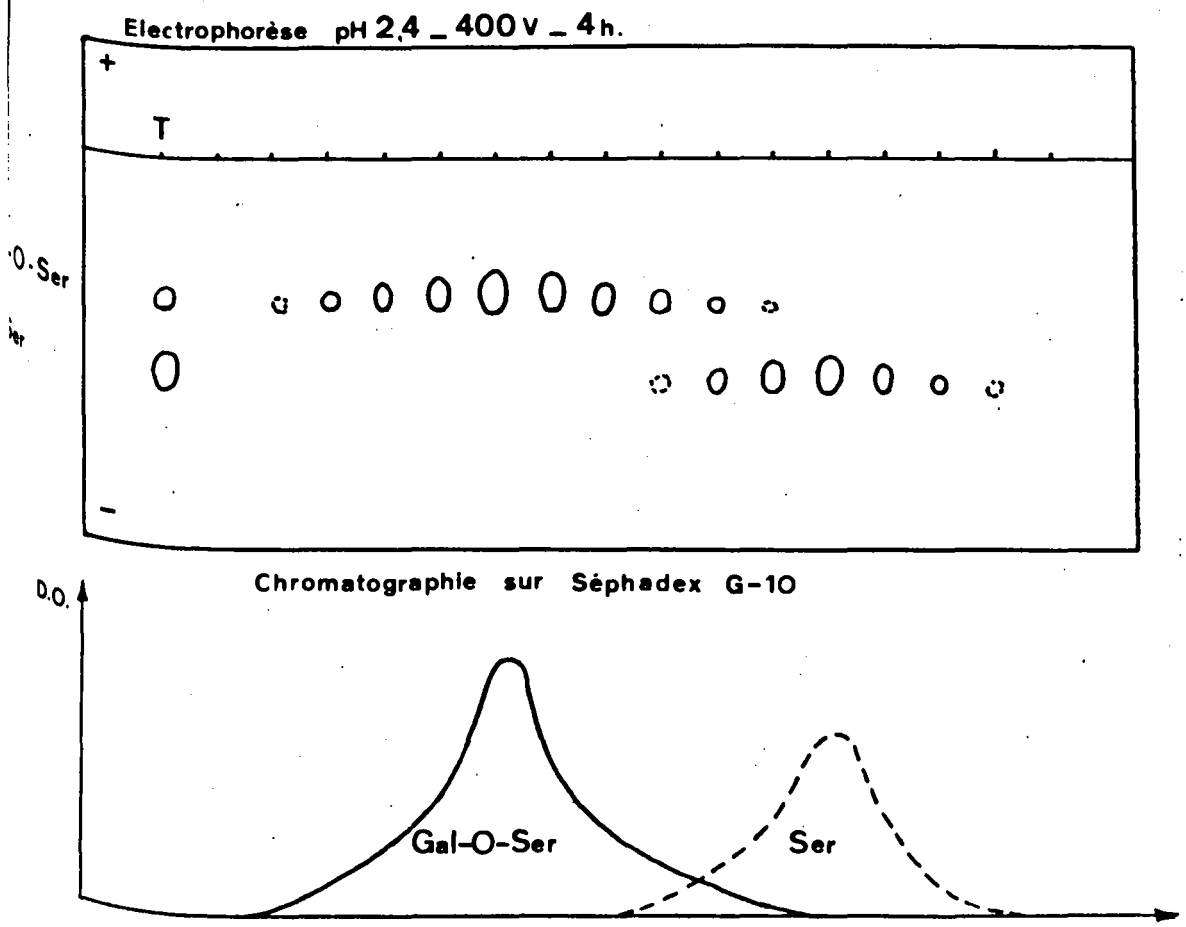


Figure 6

Purification du O-séryl β-D-galactoside par filtration sur Sephadex G-10.

F) Dosage du galactose et de l'hydroxy-amino-acide dans le β-D-galactoside de l'hydroxy-amino-acide

Ce dosage a pour but de montrer que notre produit contient une molécule d'acide aminé hydroxylé par molécule de galactose.

1) Dosage du galactose

a) Principe

On utilise la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (417) modifiée par RIMINGTON (418) dont le principe consiste à condenser l'orcinol avec un dérivé du furfural provenant de la dégradation des oses par l'acide sulfurique. Le produit obtenu absorbe à 510 nm et la transmittance est inversement proportionnelle à la concentration en oses de départ.

b) Matériel et méthode

On utilise une solution d'orcinol dans l'acide sulfurique à 30 p. 100 ainsi que de l'acide sulfurique à 60 p. 100.

On ajoute à 1 ml de solution (contenant au maximum 400 µg d'oses totaux) 2 ml de la solution d'orcinol et 15 ml d'acide sulfurique à 60 p. 100. On mélange énergiquement à l'aide d'un agitateur aplati. Les tubes sont ensuite mis au bain-marie à 80°C ± 2°C pendant 20 mn exactement. Ils sont ensuite refroidis sous courant d'eau puis placés 45 mn à l'obscurité. La lecture sera faite au spectromètre à 420 nm ainsi qu'à 510 nm. Les dosages seront faits en triple, en les comparant à une solution témoin contenant 200 µg de galactose par ml de solution.

Le résultat obtenu est excellent ; il correspond exactement au résultat théorique déterminé par le calcul.

2) Dosage de l'hydroxy-amino-acide

a) Méthode approximative

Elle consiste à comparer la densité de taches sur un électro-

phorégramme. Cette méthode est très simple, peu coûteuse et de plus, fournit des résultats satisfaisants.

L'hydroxy-amino-acide est libéré de son β-galactoside par une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 2 N au bain-marie bouillant pendant 2 heures (voir cinétique d'hydrolyse acide page 67). Le produit d'hydrolyse est passé sur une résine échangeuse d'anions, de type Duolite A-102 D, dans le but de retenir les ions chlorure qui provoqueraient des phénomènes de traînées sur l'électrophorégramme. La colonne de résine est éluée par de l'eau désionisée et l'éluat est évaporé à siccité à l'évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris par une quantité d'eau connue et des fractions de cette solution, de volume calculés préalablement, sont déposées sur l'électrophorégramme, ainsi que des témoins d'hydroxy-amino-acide à différentes concentrations. L'électrophorèse est réalisée sur papier Arches 304 à pH 2,4 sous 400 v pendant 4 h. La révélation est effectuée par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 1 p. 1000. Le résultat obtenu est très voisin du résultat théorique.

b) Dosage à l'auto-analyseur d'amino-acides

Une quantité connue de β-galactoside d'hydroxy-amino-acide est dissoute dans une solution titrée de norleucine dans l'eau. Le tout est hydrolysé par l'acide chlorhydrique. Après concentration, le produit est injecté dans l'auto-analyseur d'amino-acides. Par intégration des pics de sérine ou de thréonine, èt de norleucine, on en déduit la quantité d'hydroxy-amino-acide. Celle-ci correspond à ce que l'on attendait.

3) Conclusions

Par dosage du galactose et de l'hydroxy-amino-acide, nous avons montré que notre produit contient une mole d'acide aminé pour une mole de galactose, ce qui correspond au O-séryl β-D-galactoside et au O-thréonyl β-D-galactoside.

G) Critères de pureté

Nous ne sommes pas parvenu à cristalliser notre produit, aussi l'avons-nous lyophilisé. Les méthodes utilisées pour s'assurer de la pureté du β-D-galactoside sont les suivantes :

1) Electrophorèse

Les électrophorèses ont été effectuées dans des cuves "en toit", sur du papier d'Arches 304, avec une solution aqueuse d'acide acétique 1 N de pH 2,4, sous une tension de 10 V/cm pendant 4 heures.

La révélation des électrophorégrammes a été effectuée à l'aide des réactifs suivants :

- Réactif à la ninhydrine à 1 p. 1000, spécifique des fonctions amines primaires,
- Réactif à l'oxalate d'aniline, spécifique des oses.

Notre produit donne une tache unique et de ce fait semble pur. Nous avons obtenu les rapports de migration suivants :

pour H-Ser(O-Gal)-OH : $R_{ser} = 0,68$; $R_{Thr} = 0,71$

pour H-Thr(O-Gal)-OH : $R_{Thr} = 0,62$; $R_{ser} = 0,59$

pour H-Thr-OH : $R_{ser} = 0,95$

2) Chromatographie sur papier

Les chromatogrammes ont été effectués sur papier Whatman n° 1 dans les systèmes-solvants de PARTRIDGE (419) ; n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) et de JERMYN et ISHERWOOD (420) : pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2).

Les résultats sont illustrés par les figures 7 et 8 (pages 62 et 63) et précisés dans le Tableau IV (page 64).

La vitesse de migration du glycoside est toujours inférieure à celle de chacun des deux constituants, l'ose et l'hydroxy-amino-acide.

3) Chromatographie automatique sur colonne de résines échangeuses de cations

Le O-séryl β-D-galactoside donne un pic unique à l'auto-analyseur d'amino-acides. Celui-ci passe en tête de diagramme. Sa position est repérée en additionnant les témoins sérine et norleucine. Le résultat obtenu est illustré par la figure 9 (page 65).

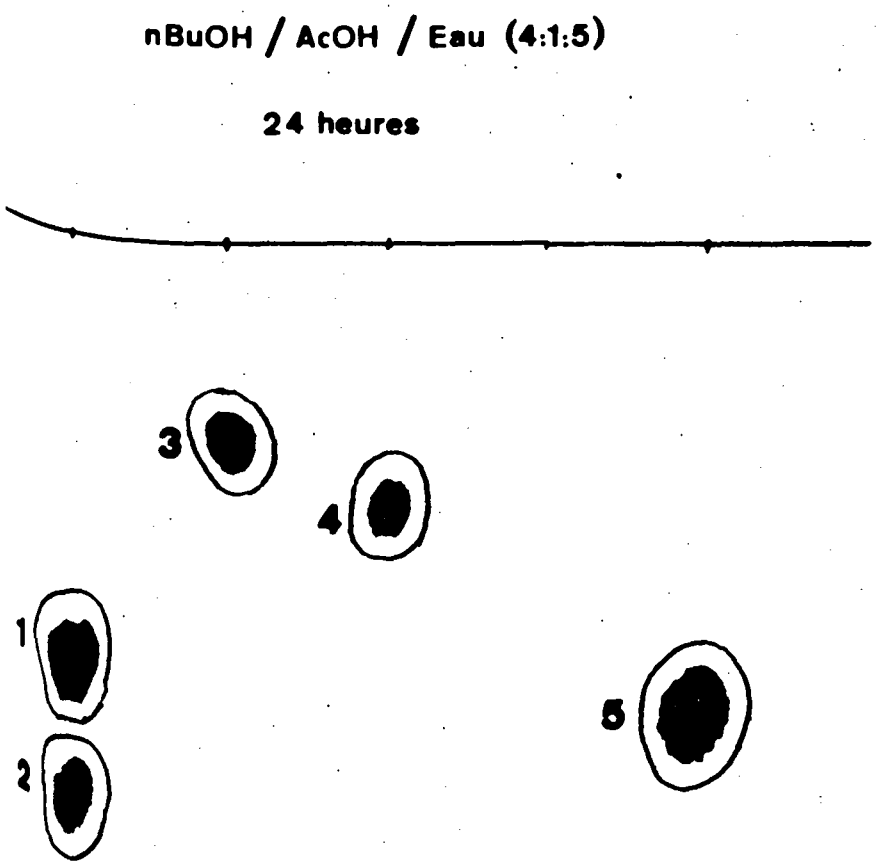
H) Nature de l'anomérie

La synthèse de KOENIGS et KNORR favorise la formation de β-glycosides (voir page 27). En comparant le pouvoir rotatoire de notre produit respectivement avec le pouvoir rotatoire du méthyl-β-D-galactoside et celui du méthyl α-D-galactoside, nous en déduisons que notre composé de synthèse possède une liaison β-glycosidique.

La recherche de l'anomérie de notre galactopyrannoside n'a porté que sur le dérivé de la sérine. Elle a été effectuée par action des osidases spécifiques : l'α-D-galactosidase du Fénugrec, d'une part, et la β-D-galactosidase d'*Aspergillus niger*, d'autre part (*).

Les conditions expérimentales sont les suivantes : l'enzyme et le O-séryl D-galactoside sont dissous dans un tampon citrate (acide citrique 0,01 M/citrate trisodique 0,02 M) de pH 4,4 ; la solution est maintenue à 37°C pendant 48 h. Le galactose libéré est dosé par la méthode réductimétrique au ferricyanure de PARK et JOHNSON (421).

(*) Nous exprimons nos remerciements à Monsieur S. BOUQUELET qui a effectué cette étude enzymatique.



Révélateur à la ninhydrine

Révélateur à l'oxalate d'aniline

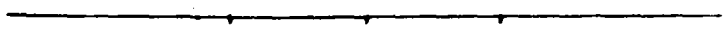
1:Sérine
2:Thréonine
3:O-séryl-β-D-galactoside
4:O-thréonyl-β-D-galactoside
5:Galactose

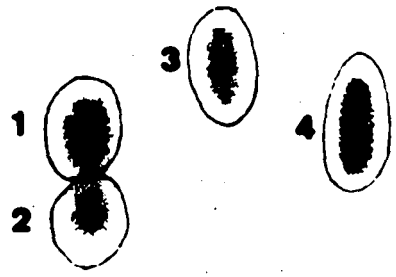
Figure 7

Chromatographie sur papier du O-séryl β-D-galactoside et du O-thréonyl β-D-galactoside.

Pyr / AcOEt / Eau (1:2:2)

11 heures





1: Sérine
2: Thréonine
3: O-séryl-β-D-galactoside
4: O-thréonyl-β-D-galactoside

Révélateur à la ninhydrine

Figure 8

Chromatographie sur papier du O-séryl β-D-galactoside et du O-thréonyl β-D-galactoside

TABLEAU IV

Comportement chromatographique des β-D-galactosides de la sérine et de la thréonine

Composés	Systèmes-solvants					
	A (*)			B (**)		
	Rf	R_{Ser}	R_{Thr}	Rf	R_{Ser}	R_{Thr}
Sérine	0,20	1	0,77	0,33	1	0,89
O-séryl β-D-galactoside	0,08	0,40	0,31	0,28	0,85	0,76
Thréonine	0,26	1,30	1	0,37	1,12	1
O-thréonyl β-D-galactoside	0,12	0,60	0,46	0,32	0,97	0,86
Galactose	0,21	1,05	0,81	0,52	1,58	1,41

(*) n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5)
(**) pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2).

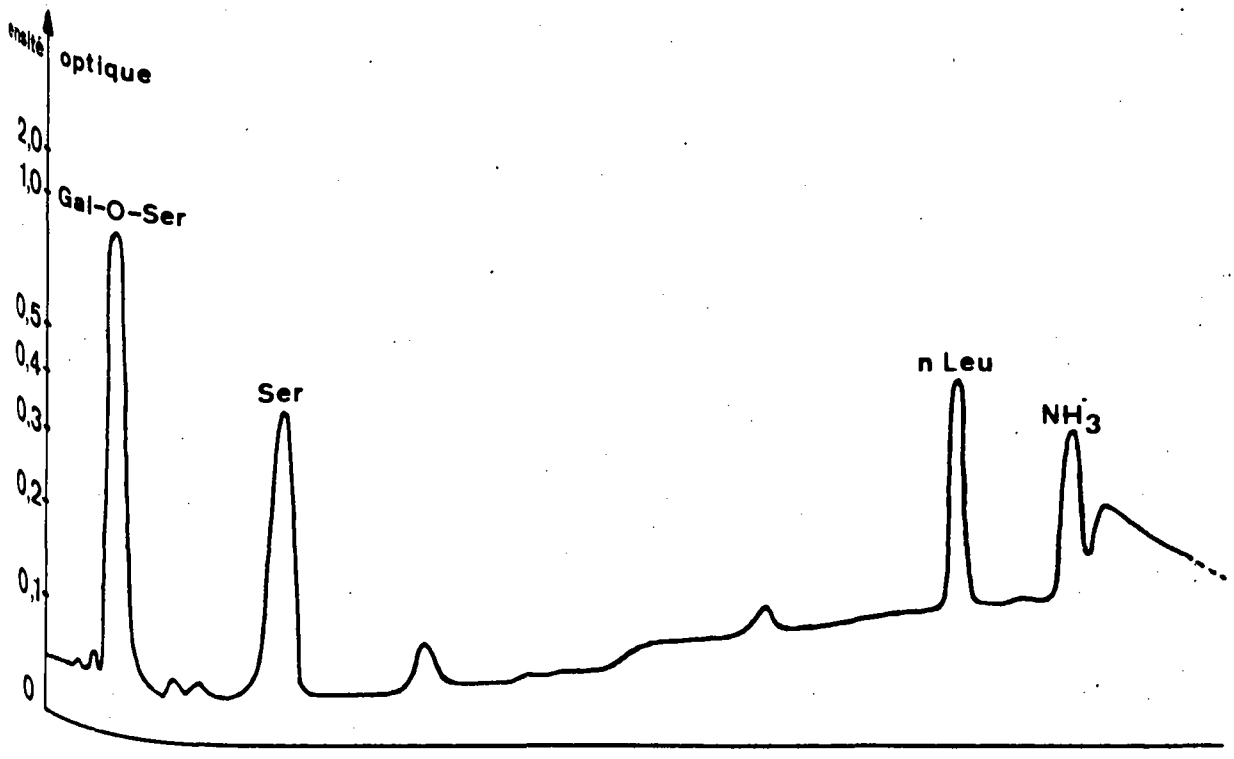


Figure 9

Chromatographie à l'auto-analyseur Technicon du O-séryl β-D-galactoside. Témoins sérine et norleucine.

La β-D-galactosidase coupe 70 p. 100 de la liaison O-glycosidique de notre produit dans les conditions expérimentales énoncées ci-dessus.

Cette étude enzymatique confirme le fait que la synthèse de KOENIGS et KNORR favorise la formation de β-glycosides. Notre produit est donc du O-séryl β-D-galactopyrannoside.

I) Conclusions

La réaction de condensation de KOENIGS et KNORR appliquée au bromo-1 désoxy-1 tétra-O-acétyl-2,3,4,6 α-D-galactopyrannose et à l'ester benzylique du N-benzyloxycarbonyl L-hydroxy-amino-acide, suivie d'une hydrogénation catalytique et d'une O-désacétylation par le méthanolate de sodium, fournit le β-D-galactopyrannoside de l'hydroxy-amino-acide dont la purification est réalisée par filtration sur gel de Sephadex G-10. On obtient de cette manière, un composé électrophorétiquement et chromatographiquement homogène dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Il est composé de galactose et d'hydroxy-amino-acide en proportion équimolaire.
- Il est hydrolysé par la β-galactosidase en D-galactose et en sérine, ou thréonine.

II - ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DU O-SERYL β-D-GALACTOSIDE ET DE QUELQUES-UNS DE SES DERIVES

Nous avons limité notre étude des caractéristiques du O-séryl β-D-galactoside aux seules propriétés dont la connaissance devait permettre de résoudre l'énigme posée par la nature de la liaison ose-acide aminé dans certaines glycoprotéines. Aussi, étudierons-nous, outre le comportement électrophorétique et chromatographique (voir page 60).

1°) La stabilité vis-à-vis de l'acide chlorhydrique de la liaison glycosidique, de manière à prévoir l'existence de O-séryl β-D-galactoside dans les glycoprotides.

2°) Le comportement de la liaison glycosidique du galactoside vis-à-vis de la soude afin de préciser la stabilité d'une telle liaison.

A) Action de l'acide chlorhydrique

Nous avons étudié la stabilité du O-séryl β-D-galactoside, ainsi que celle de ses dérivés N-dinitrophénylé et N-acétylé, dans l'acide chlorhydrique 1 N, pendant des temps variant de 5 à 90 mn. Notre but était de vérifier si, dans les conditions d'hydrolyse (par HCl 1 N, à 100°C, pendant 90 mn) de glycoprotéines, l'on pouvait retrouver un composé de ce type. Il s'agissait donc d'étudier la stabilité vis-à-vis de l'acide chlorhydrique de la liaison glycosidique du β-D-galactoside de la sérine et de certains de ses dérivés.

1) Préparation de la N-dinitro-2,4 phényl-O-(β-D-galactopyrannosyl)-L-sérine

Nous avons utilisé la méthode générale de SANGER (422) en modifiant la technique de purification.

a) Mode opératoire

α) Principe : La N-dinitro-2,4 phényl-O-(β-D-galactopyrannosyl)-L-sérine est préparée par action du dinitro-2,4 fluorobenzène dans de l'éthanol sur le O-séryl β-D-galactopyrannoside dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium.

β) Technique : 12 mg de O-séryl β-D-galactopyrannoside sont dissous dans 2,5 ml d'eau contenant 250mg de bicarbonate de sodium. A cette solution sont ajoutés 5 ml d'une solution éthanolique de dinitro-2,4 fluorobenzène à 5 p. 100 (v:v), et le mélange est agité pendant 4 h., à l'obscurité et à température ambiante. On ajoute alors à nouveau 250 mg de bicarbonate de sodium et 5 ml de la solution éthanolique de dinitrofluorobenzène. La réaction est prolongée pendant 24 h. Le mélange réactionnel, auquel est ajouté l'éthanol de rinçage, est centrifugé 10 mn à 4500 t/mn. Le surnageant est concentré à siccité à l'évaporateur rotatif et le résidu obtenu est repris par de l'eau distillée. Après extraction à l'éther éthylique, la phase aqueuse est évaporée à siccité.

b) Résultats- Conclusions

La N-dinitro-2,4 phényl-O-(β-D-galactopyrannosyl)-L-sérine est obtenue sous forme de cristaux jaunes. La pureté de notre produit a été étudiée en chromatographie sur couche mince de KIESELGEL et KIESELGUR en utilisant le système-solvant : acétate d'éthyle/méthanol (1:1). L'obtention d'une seule tache nous conduit à croire que notre produit est pur.

En chromatographie sur papier Whatman n° 1, dans le système-solvant de PARTRIDGE (423) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), après un développement de 19 h., les vitesses de migration par rapport au front du solvant (Rf) sont les suivants :

Galactose : 0,17 ; L-sérine : 0,15 ; O-séryl β-D-galactoside : 0,07 ; N-dinitro-2,4 phényl-L-sérine : 0,79 ; N-dinitro-2,4 phényl-O-(β-D-galactosyl)-L-sérine : 0,47.

Les dérivés dinitrophénylés sont jaunes et ne nécessitent donc pas de révélation.

2) Préparation de la N-acétyl-O-(β-D-galactopyrannosyl)-L-sérine

Nous avons utilisé la méthode de N-acétylation de ROSEMAN et al. (424).

a) Mode opératoire

α) Principe : La N-acétyl-O-(β-D-galactopyrannosyl)-L-sérine est préparée par action de l'anhydride acétique sur le O-séryl β-D-galactopyrannoside dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium.

β) Technique : A 9 mg de O-séryl β-D-galactopyrannoside dans 3 ml d'eau sont additionnés 5 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 1 p. 100. A cette solution sont ajoutés 60 µl d'anhydride acétique et la réaction est menée 24 h. à 20°C sous agitation.

La solution réactionnelle est ensuite purifiée sur une colonne (1x10 cm) de résine échangeuse de cations (Dowex 50x8 ; forme acide). L'éluat (élution par 40 ml d'eau) est concentré à 3-4 ml puis lyophilisé.

b) Résultats - Conclusions

La N-acétyl-O-(β-D-galactopyrannosyl)-L-sérine est obtenue sous forme de poudre blanche, très soluble dans l'eau.

La pureté de notre produit a été étudiée en chromatographie sur papier Whatman n° 1.

En utilisant le système-solvant de PARTRIDGE (425) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), après un développement de 19 h. et par révélation par le réactif à l'acide periodique-benzidine (*) nous obtenons un rapport de migration (Rf) pour la N-acétyl-O-(β-D-galactopyrannosyl)-L-sérine qui est sensiblement égal à celui obtenu pour le galactose et la sérine. Le galactoside de la sérine étant moins organophile que son dérivé N-acétylé, migre moins que ce dernier, ce qui est bien le cas, cependant le problème reste entier.

(*) Voir l'Appendice (page 124).

Afin de résoudre ce problème, nous avons changé de système-solvant. En utilisant le système-solvant de JERMYN et ISHERWOOD (426) : pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2), après un développement de 11 h., nous avons obtenu les rapports de migration suivants :

L-sérine : 0,33 ; D-galactose : 0,52 ; O-séryl β-D-galactoside : 0,27 ; N-acétyl-O-(β-D-galactosyl)-L-sérine : 0,38.

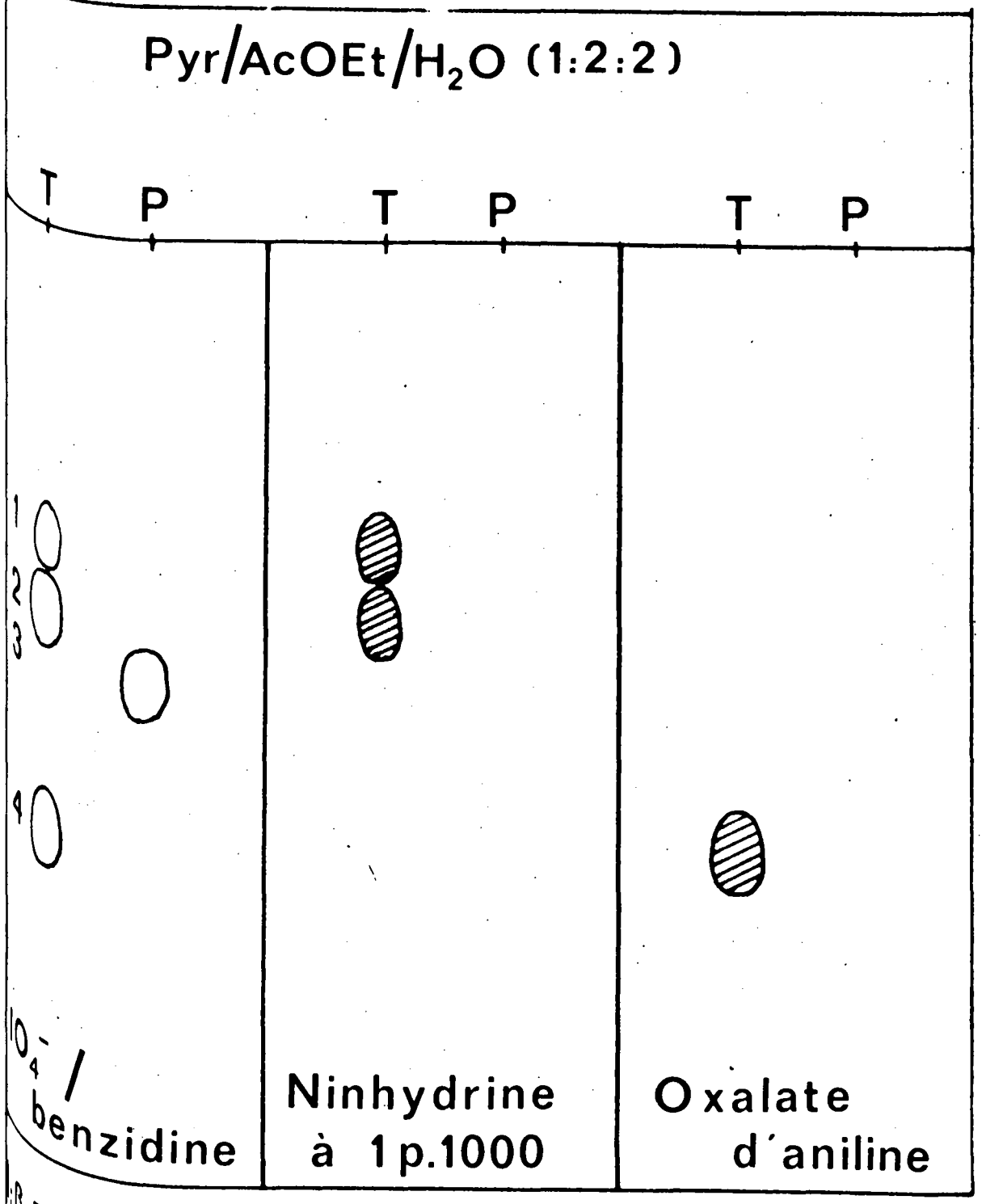
L'absence de révélation du galactoside de la N-acétyl sérine par le réactif à la ninhydrine à 1 p. 1000, nous porte à croire que la N-acétylation est quantitative. En outre, l'absence de tache après utilisation du réactif à l'oxalate d'aniline nous montre qu'il n'y a pas eu de coupure de la liaison O-glycosidique. Enfin, l'action du réactif à l'acide periodique-benzidine, ne révèle qu'une seule tache.

Ces différents résultats nous permettent de conclure que l'acétylation est complète, et que le produit obtenu est pur. Ces résultats sont illustrés par la figure 10 (page 71).

3) Action de l'acide chlorhydrique sur le O-séryl β-D-galactoside et sur ses dérivés N-dinitrophénylé et N-acétylé

a) Mode opératoire

Une solution de 10 µM de O-séryl β-D-galactoside ou d'un de ses dérivés N-substitué, dans 20 ml d'acide chlorhydrique 1 N, est répartie en fractions de 2 ml dans des tubes à essais. Ces tubes sont maintenus à 100°C au bain-marie bouillant. A des intervalles de temps échelonnés entre 5 et 90 mn, les tubes sont prélevés un à un. La réaction est "gelée" en plongeant le tube à essais dans la glace. L'acide chlorhydrique est soigneusement neutralisé par une solution de soude normale contenant 5 p. 100 de borohydrure de potassium. Le borohydrure réduit le galactose, libéré lors de l'hydrolyse acide, en galactitol. Un dosage à l'orcinol (voir page 58) permet de connaître la quantité de galactose non libéré par l'hydrolyse chlorhydrique.



1-β-D-Galactoside de la L-Sérine
2-L-Sérine
3-β-D-Galactoside de la N-acétyl L-Sérine
4-D-Galactose

Figure 10

Chromatographie sur papier des produits (P) de N-acétylation du O-séryl β-D-galactoside

b) Résultats

Nous avons tracé les courbes : concentration en galactose en fonction du temps d'hydrolyse. Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par la figure 11 (page 73).

Pour le dérivé N-acétylé, au-delà de 15 minutes, le résultat n'est plus interprétable, peut-être à cause de l'interférence des ions borates.

L'ordre de la réaction d'hydrolyse a été déterminé par la méthode des vitesses.

$$v = k\ (A)^n$$

où v représente la vitesse de la réaction,
k la constante de vitesse,
n l'ordre de la réaction.
$\log v = \log k + n \log (A)$.

La vitesse est calculée en prenant, pour différents temps, la tangente à la courbe : concentration en galactose en fonction du temps d'hydrolyse. On trace ensuite la courbe $\log v = f\left[\log (A)\right]$. On obtient une droite de pente n et d'ordonnée à l'origine log k.

Nous trouvons $n = 1{,}13$ et $k = 10^{-3}\ \mu M\ s^{-1}$ pour le O-séryl ß-D-galactoside (si $n = 1$, $k = 4{,}6.10^{-4}\ s^{-1}$). Quant à son dérivé N-dinitrophénylé, nous obtenons $n = 1$ et $k = 6{,}7.10^{-4}\ s^{-1}$.

De ces valeurs, nous pouvons en déduire le temps de demi-réaction, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que le produit soit hydrolysé à 50 p. 100.

$$t^{1/2} = \frac{2^{n-1} - 1}{k(n-1)\ A_o^{n-1}}$$

où $t^{1/2}$ représente le temps de demi-réaction,
k la constante de vitesse,
n l'ordre global de la réaction,
A_o la concentration initiale en galactose.

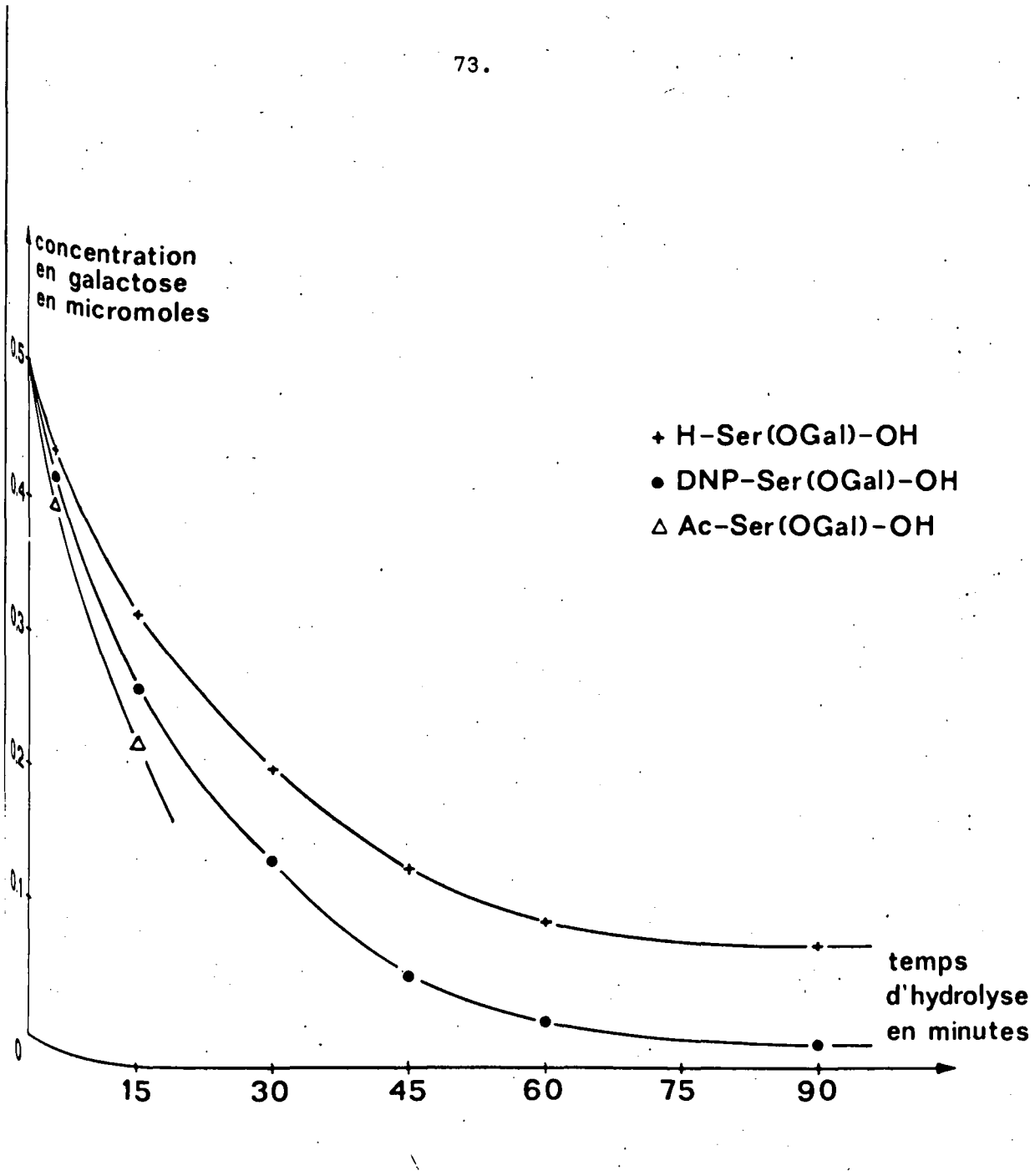


Figure 11

Cinétique d'hydrolyse, par l'acide chlorhydrique normal, du O-séryl β-D-galactoside et de ses dérivés N-dinitrophénylé et N-acétylé.

Pour une réaction du premier ordre $t^{1/2} = \frac{\text{Log } 2}{k}$

Les valeurs obtenues correspondent aux valeurs expérimentales que l'on peut déduire des courbes précédentes (page 73).

β-D-galactoside de la L-sérine $t^{1/2}$ = 25 mn

β-D-galactoside de la N-dinitro-2,4 phényl L-sérine $t^{1/2}$ = 17 mn

β-D-galactoside de la N-acétyl L-sérine $t^{1/2}$ = 14 mn

Etude cinétique grâce à l'auto-analyseur d'amino-acides

Des résultats analogues à ceux que nous avions trouvés précédemment ont pu être obtenus grâce à l'auto-analyseur d'amino-acides. Dans des tubes à hémolyse, on introduit 100 µg de β-D-galactoside dissous dans 200 µl d'acide chlorhydrique 1 N. Ces tubes sont placés dans un bain-marie bouillant puis prélevés un à un à des intervalles de temps échelonnés entre 10 et 60mn. Les diagrammes obtenus montrent une diminution du pic correspondant au galactoside et une augmentation de sérine au cours du temps. Le pic correspondant au O-séryl β-D-galactoside a complètement disparu après une hydrolyse d'une heure.

c) Conclusions

Dans les conditions d'hydrolyse de glycoprotéines, la liaison glycosidique du O-séryl β-D-galactoside est entièrement rompue après une hydrolyse d'une heure. Ce résultat avait déjà été obtenu par DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (427) ainsi que par KUM et ROSEMAN (428)

La présence de substituants attracteurs d'électrons sur l'azote de la sérine rend plus fragile la liaison O-glycosidique en milieu acide.

Au contraire, dans le cas de glycosides d'osamines, la liaison glycosidique est stable en milieu acide. Ceci provient du fait que le proton de la fonction amine, par un effet protecteur vis-à-vis de la liaison glucosaminidique stabilise cette dernière. Cet effet s'ajoute à celui de la fonction amine de l'amino-acide comme l'a démontré SPIRO (429) ainsi que DEREVITSKAYA et al. (430) et MONSIGNY (431).

B) Action de la soude

Les O-glycosides de composés hyroxylés en β d'un carbonyle ne sont dégradés par la soude que si ce dernier est bloqué : MONTREUIL, MONSIGNY et BUCHET (432).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'action de la soude :

1) sur le O-séryl β-D-galactoside et
2) sur l'ester méthylique de ce dernier, ainsi que sur des amides de celui-ci, dont nous nous proposons de décrire la préparation avant d'exposer les résultats que nous avons obtenus par action de la soude sur la série de composés.

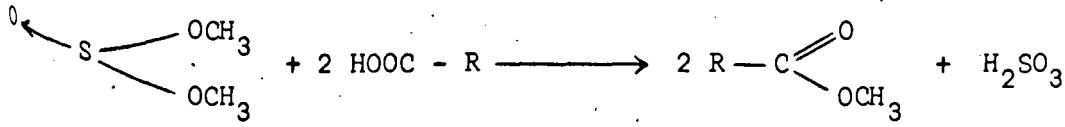
1) Préparation de β-D-galactosides de la sérinamide

a) Principe

Dans un premier temps, le O-séryl β-D-galactoside est estérifié par le méthanol anhydre en présence de chlorure de thionyle, selon le procédé général de SOKOLOVSKY, SADEH et PATCHORNIK (433) dans les conditions décrites par BUCHET (434) et MONSIGNY (435).

Le mécanisme de la réaction est le suivant :

Puis



L'amidation est réalisée dans un second temps par l'action, sur l'ester, de l'ammoniac en solution méthanolique (*) ou de la butylamine (*) que nous avons choisie préférentiellement à l'éthylamine trop volatile.

(*) Voir Appendice technique (page124).

b) Mode opératoire

α) Estérification : 20 mg de O-séryl β-D-galactoside sont mis en suspension dans 10 ml de méthanol anhydre. A la solution refroidie à - 20°C, on ajoute goutte à goutte 0,5 ml de chlorure de thionyle préalablement refroidi à -20°C. La réaction, qui est exothermique, élève la température. Le mélange est maintenu à la température ambiante pendant 24 h sous agitation constante. Il est ensuite concentré sous vide à la température du laboratoire, à l'abri de toute trace d'eau.

β) Amidation : Le résidu est traité, soit par 10 ml de méthanol anhydre saturé en ammoniac, pendant 24 h. à la température du laboratoire ; soit par 0,4 ml de n-butylamine à la température ambiante pendant une semaine. Les solutions sont ensuite évaporées à siccité. L'élimination de l'excès de butylamine sera réalisée par des distillations répétées en présence de méthanol anhydre.

c) Résultats

α) Estérification : Lors de l'estérification, il y a formation d'acide chlorhydrique provenant de l'action du chlorure de thionyle sur le méthanol (voir page 75). Cet acide chlorhydrique est en concentration très faible mais lors de l'évaporation à siccité, cette concentration augmente et n'est plus négligeable. On a alors une hydrolyse partielle de la liaison O-glycosidique (voir page67). Cette hydrolyse acide fournit de l'ester méthylique de la sérine. Ceci a été montré grâce à une analyse électrophorétique (pH 2,4 ; 10 V/cm pendant 4 h).

L'estérification du O-séryl β-D-galactoside par la méthode de SOKOLOVSKY et al., fournit un produit secondaire que nous avons identifié à l'ester méthylique de la sérine en comparant sa migration électrophorétique et chromatographique, ainsi que son comportement à l'auto-analyseur Technicon, à ceux de l'ester méthylique de la sérine que nous avons synthétisé. Ces résultats sont illustrés par les figures 12 et 13 (pages 77 et 78).

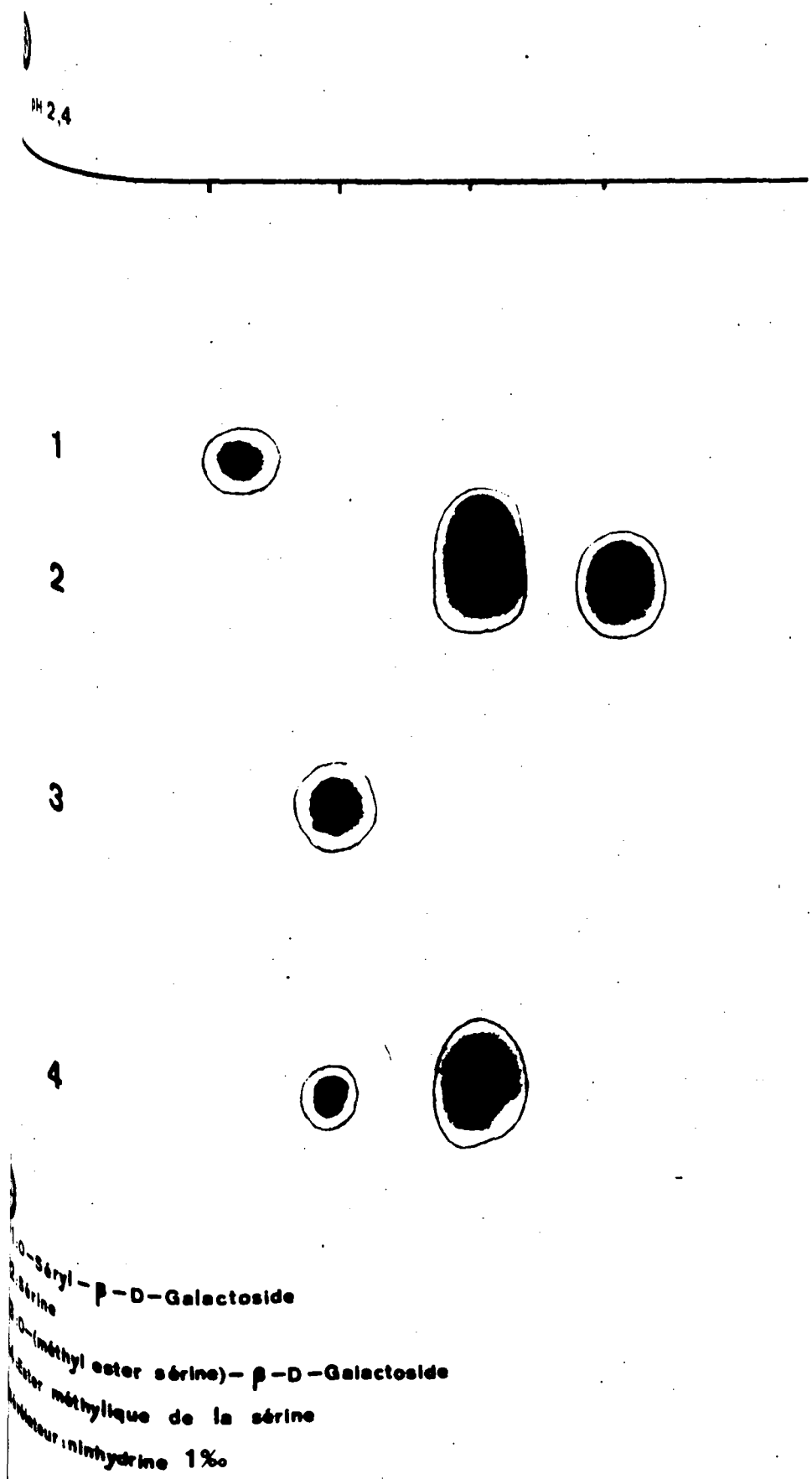


Figure 12

Electrophorèse à pH 2,4 de l'estérification, par le méthanol en présence de chlorure de thionyle, du O-séryl ß-D-galactoside et de la sérine.

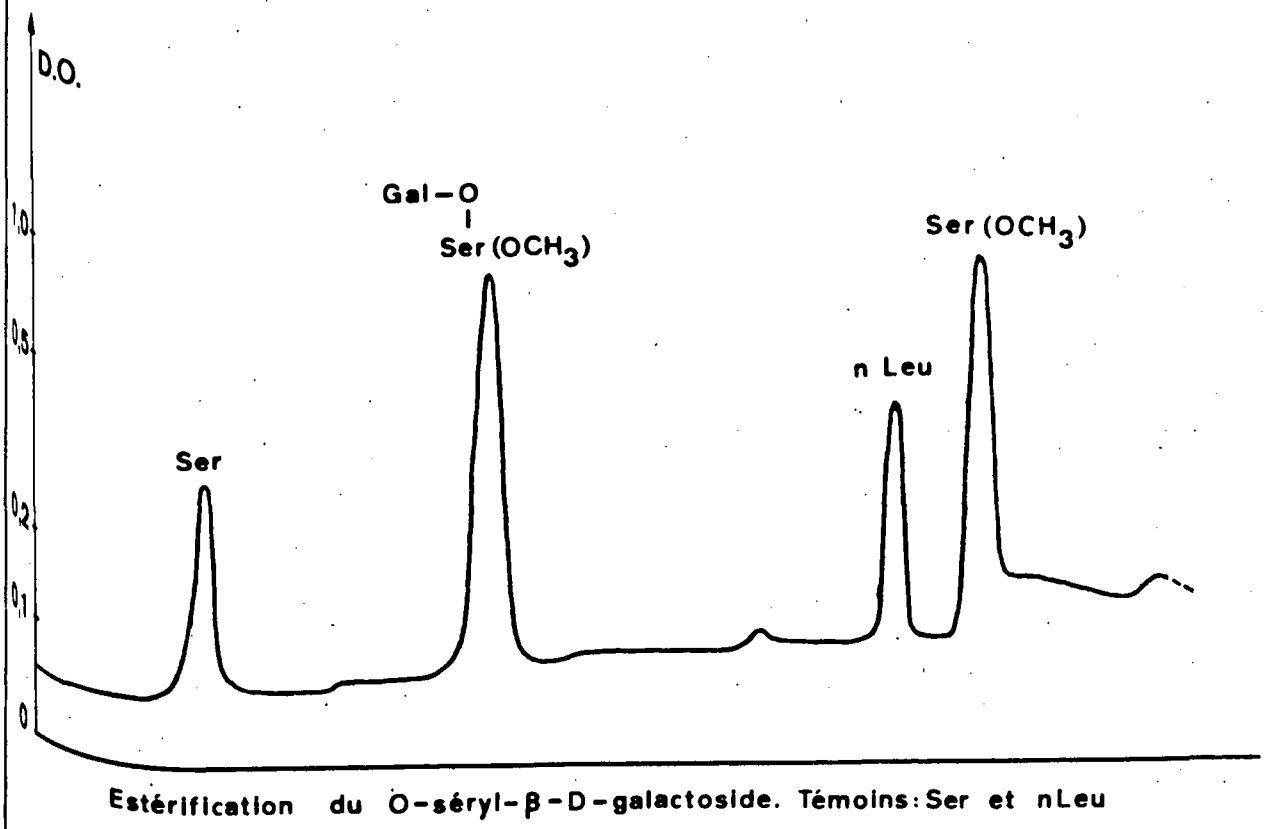


Figure 13

Chromatographie à l'auto-analyseur Technicon des produits de l'estérification du O-séryl ß-D-galactoside.
Témoins sérine et norleucine.

Nous remarquerons que si la sérine et le O-séryl β-D-galactoside donnent une coloration rose-violette avec le réactif à la ninhydrine à 1 p. 1000, l'ester méthylique de la sérine donne une coloration brunâtre qui vire au violet après quelques heures.

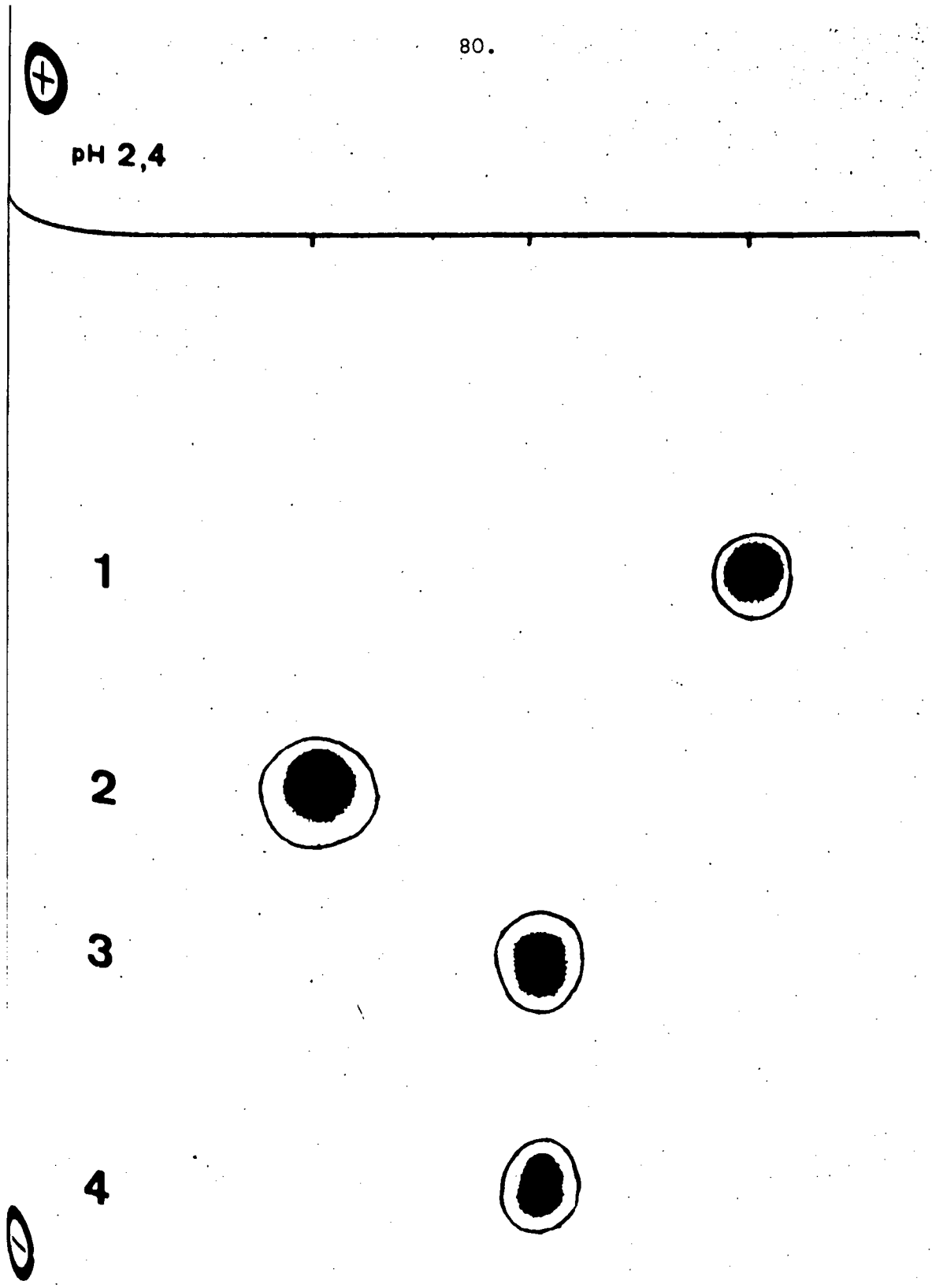
β) Amidation : L'amidation étant réalisée sur un mélange de deux produits (ester méthylique de la sérine et ester méthylique de la O-β-D-galactosyl L-sérine), nous obtenons les deux amides correspondants. L'amide de la sérine donne une coloration jaunâtre avec le réactif à la ninhydrine à 1 p. 1000 mais cette coloration passe au violet après quelques heures.

Les comportements électrophorétiques, chromatographiques et à l'Auto-analyseur Technicon sont illustrés par les figures 14, 15 et 16 (pages 80, 81 et 82). En électrophorèse (pH 2,4 ; 10 V/cm pendant 4 h), l'ester et l'amide ont sensiblement la même migration. La distinction entre ces deux produits est également difficile à faire sur les diagrammes de l'Auto-analyseur Technicon. Aussi, préférera-t-on utiliser la chromatographie sur papier.

Les rapports de migration des différents produits sont précisés dans le Tableau V (page 83). Ils peuvent être résumés de la manière suivante :

- En électrophorèse : les amides possèdent une vitesse de migration cationique supérieure à celle des esters correspondants, cependant, la différence est très faible surtout avec l'amide obtenu avec l'ammoniac. Les différents composés de la sérine migrent plus rapidement que leurs homologues contenant du galactose.

- En chromatographie sur papier : la vitesse de migration de l'ester méthylique est comprise entre celle de l'amide primaire et celle du butylamide.



1 : O-Séryl - β - D - Galactoside
2 : Sérine
3 : O-(méthyl ester sérine) - β - D - Galactoside
4 : O-(butyl amide sérine) - β - D - Galactoside

Figure 14

Electrophorèse à pH 2,4 de l'amidation par la n-butylamine de l'ester méthylique du O-séryl β-D-galactoside.

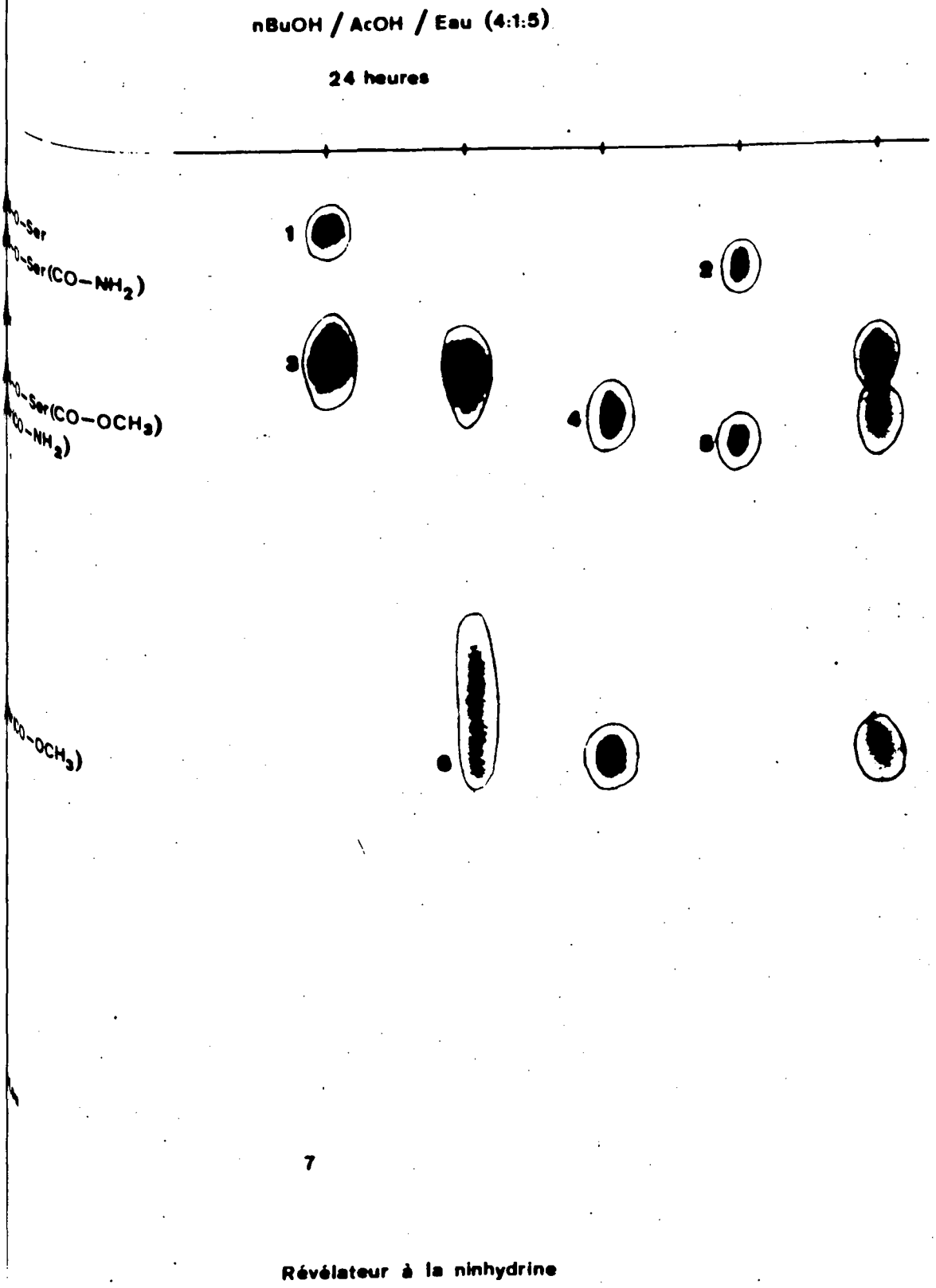


Figure 15

Chromatographie sur papier des esters méthyliques et des amides, dérivés de la sérine et du O-séryl β-D-galactoside

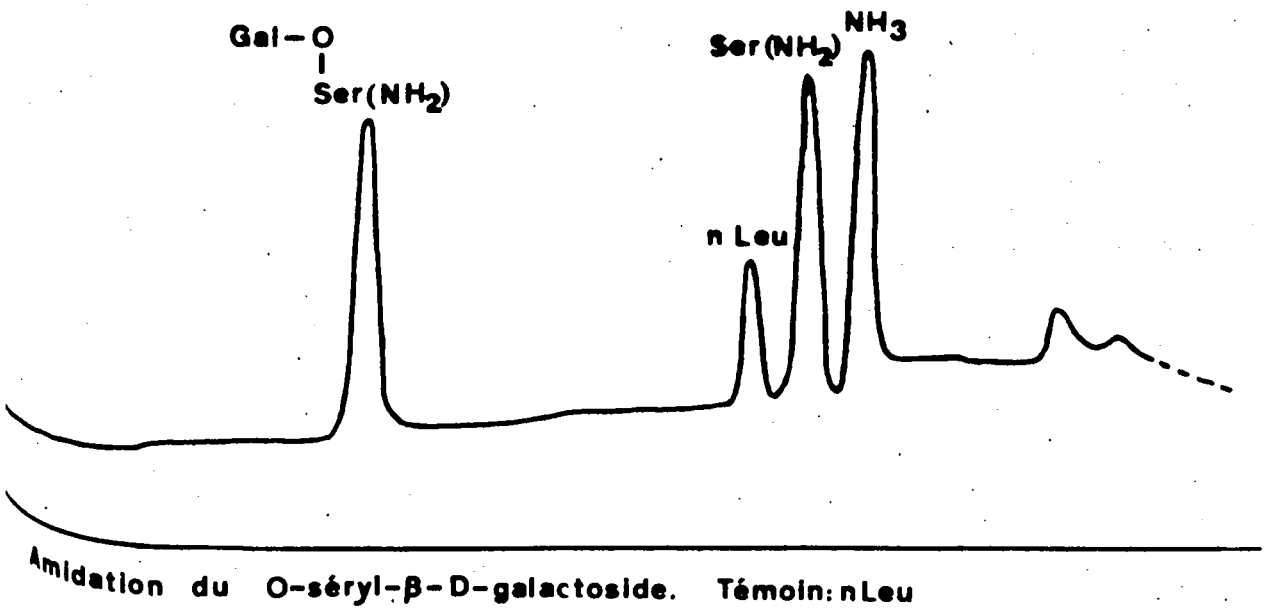


Figure 16

Chromatographie à l'auto-analyseur Technicon des produits de l'amidation par l'ammoniac du O-séryl β-D-galactoside. Témoin norleucine.

TABLEAU V

rports de migration électrophorétique et chromatographique de dérivés de la sérine et du O-séryl β-D-galactoside

Composés		Electrophorèse Arches 304 pH 2,4 10 V/cm 4 h. $R_{sérine}$	Chromatographie Whatman n°1 Système-solvant BuOH/AcOH/H_2O (4:1:5) $R_{sérine}$
Noms	Abréviations		
	H-Ser-OH	1	1
β-D-galactoside	H-Ser(OGal)-OH	0,66	0,37
éthylique de la sérine	H-Ser-OMe	2,33	3,00
ll ester sérine) β-D-galac-	H-Ser(OGal)-OMe	1,40	1,23
de la sérine	H-Ser-NH_2	2,40	1,41
amide sérine) β-D-galac-	H-Ser(OGal)-NH_2	1,60	0,54
ide de la sérine	H-Ser-NH-C_4H_9	2,44	3,58
ll amide sérine) β-D- ide	H-Ser(OGal)NHC_4H_9	1,78	2,63

2) Action de la soude sur le β-D-galactoside de la sérine et sur son dérivé estérifié et amidé.

a) Mode opératoire

10 mg de O-séryl β-D-galactoside, ou de son dérivé estérifié ou amidé, sont dissous dans 5 ml d'une solution de norleucine 0,5 mM dans l'eau. 5 ml d'une solution aqueuse 0,2 N en soude et 0,6 N en borohydrure de sodium sont ajoutés. La solution finale est donc 0,1 N en soude et 0,3 N en borohydrure. Le mélange est maintenu à la température du laboratoire. Des fractions de 1 ml sont prélevées à des temps différents et on leur ajoute 2 ml d'acide chlorhydrique 5,6 N. Ce dernier provoque une effervescence en réagissant sur l'excès de borohydrure. Les tubes, contenant ces fractions, sont ensuite scellés sous vide puis placés au bain-marie bouillant pendant 4 h.

Les hydrolysats sont évaporés à siccité sous vide puis analysés à l'Auto-analyseur Technicon.

b) Résultats

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

1) le β-D-galactoside de la sérine est stable en milieu alcalin. La sérine de départ est retrouvée intégralement après l'hydrolyse acide ; il n'y a donc pas de β-élimination. Cette étude a également été faite sans hydrolyser le produit après l'action de la soude, afin de s'assurer qu'il n'y avait pas une hydrolyse due aux conditions alcalines. Après avoir soigneusement neutralisé la soude par de l'acide chlorhydrique, le produit est étudié à l'auto-analyseur Technicon. De cette étude complémentaire, nous tirons la conclusion suivante : 20 p. 100 de O-séryl β-D-galactoside sont détruits après une action de 2 jours. La destruction atteint 40 p. 100 après 2 semaines d'action à la température ambiante. Il s'agit d'une hydrolyse et non de β-élimination.

2) Au contraire, l'ester méthylique de ce glycoside est sensible à l'action combinée de la soude et du borohydrure de sodium et la rupture de la liaison glycosidique s'accompagne de la formation de galactitol et de la destruction de la sérine. Le pourcentage de β-élimination atteint 15 p. 100 après une action de 4 jours. Ce résultat est en accord avec ceux de

DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (436). En effet, il y a compétition entre la coupure de la liaison glycosidique et l'hydrolyse de l'ester. Dans nos conditions expérimentales (pH > 11), l'hydrolyse est plus rapide que la β-élimination d'où une formation de O-séryl β-D-galactoside qui ne subit pas la β-élimination. En milieu légèrement alcalin (pH 8), la vitesse de la réaction de β-élimination est plus grande que celle de l'hydrolyse de l'ester DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (437). De plus, ces auteurs travaillèrent sur des dérivés de la sérine N-substitués (benzyloxycarbonylé) et montrèrent que la substitution du groupement aminé a une grande influence sur la stabilité de la liaison glycosidique.

3) Le butylamide du O-séryl β-D-galactopyrannoside, comme l'ester méthylique correspondant, subit la β-élimination lorsqu'il est placé en milieu alcalin. Le pourcentage de β-élimination atteint 10 p. 100 après une action de 2 jours. DEREVITSKAYA et al. ont montré que le méthylamide du O-séryl β-D-galactopyrannoside n'est pas dégradé après 24 h à pH 11 et à 37°C.

En associant nos résultats à ceux de DEREVITSKAYA et al., nous pouvons conclure que le pourcentage de dégradation par β-élimination, des galactopyrannosides de la sérine augmente dans l'ordre : acide < méthylamide < ester méthylique < butylamide. De plus, les dérivés du galactose sont plus stables en milieu alcalin que ceux du glucose.

c) Mécanisme de la "β-élimination" (*)

La grande labilité, en milieu alcalin, des glycosides de composés β-hydroxy-carbonylés est bien connue depuis les travaux de KUHN et LOW (440) et d'ISBELL (441) et l'on sait depuis longtemps, que les composés suivants réduisent à chaud la liqueur de Fehling.

(I) $$Glc-O-\overset{CH_3}{\overset{|}{CH}}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OCH_3$$

(II) $$Glc-O-\overset{CH_3}{\overset{|}{CH}}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH-C_6H_5$$

(*) Voir la revue générale de BALLOU (438), ainsi que la thèse de MONSIGNY (439).

(III) Tétra-acétyl-Glc-O-CH_2-CH_2-$\overset{O}{\overset{\|}{C}}$-$CH_3$

On sait aussi que l'hydrolyse de la liaison glycosidique s'accompagne d'une désaturation de l'aglycone par un processus dit de "β-élimination". Par exemple, le traitement du composé III par une solution méthanolique de méthoxyde de baryum 0,003 M à la température ordinaire fournit du glucose et la méthylvinylcétone :

$$CH_2 = CH - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - CH_3$$

Dans les mêmes conditions expérimentales, le céto-3 butanol-1 lui-même n'est pas modifié. La "β-élimination" implique donc la substitution de l'hydroxyle du composé β-hydroxycarbonylé par un composé électrophile. En outre, suivant certains auteurs (HARBON, HERMAN-BOUSSIER et CLAUSER (442) ; HARTLEY et JEVONS (443)), et particulièrement dans le cas de liaisons osidiques de la sérine et de la thréonine, lorsque le groupement carbonylé fait partie d'une fonction carboxylique, celle-ci doit être bloquée. Cette hypothèse a été vérifiée par MONTREUIL, MONSIGNY et BUCHET (444).

La rupture, par la soude, des liaisons O-glycosidiques des β-hydroxy-amino-acides dont le groupement carboxylique est bloqué s'explique par une double induction électrophile. Elle peut être décomposée en plusieurs étapes que nous avons illustrées dans la figure 17 (page 87). Le mécanisme peut être expliqué de la façon suivante : la substitution d'une fonction hydroxylée, placée en position β d'un carbonyle ("β-hydroxyle"), par un composé qui rend électrophile l'oxygène de liaison -comme, par exemple, un reste "glycosyl"- induit la délocalisation du doublet σ et provoque l'apparition d'une charge positive partielle sur le carbone qui la porte. Quand, en outre, le milieu est basique, les cations alcalins induisent une délocalisation du doublet π de la fonction carbonyle qui s'énolise et dont le carbone se charge électropositivement. L'ionisation des carbones "β" et "carbonylé" provoque un appel d'électrons de l'hydrogène du carbone "α" vers celui-ci. Cette délocalisation se traduit par l'élimination du proton et par l'apparition d'un carbanion. Finalement, la molécule se stabilise par une série de délocalisations d'électrons ; transfert des électrons du

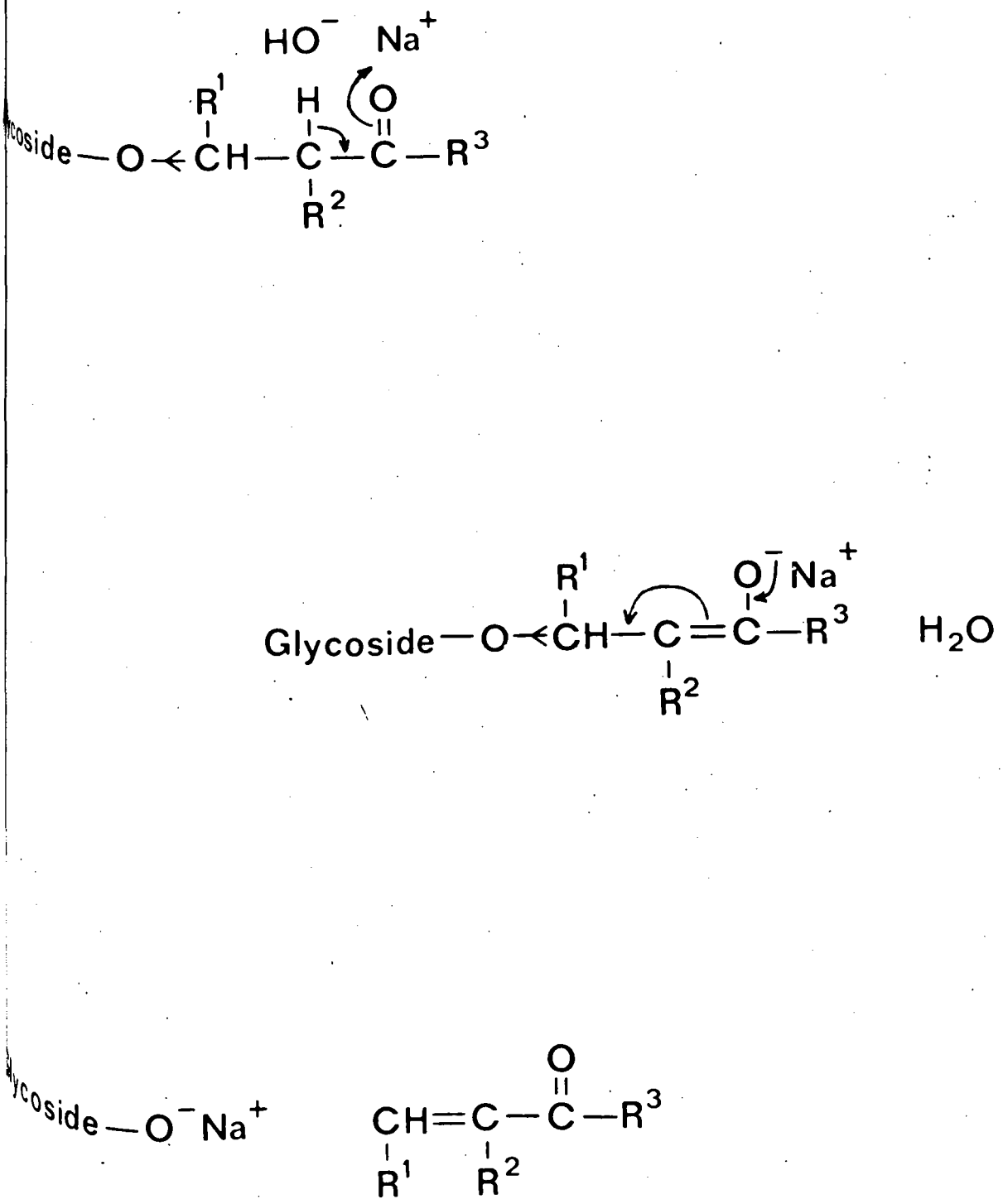


Figure 17

Mécanisme général de la "β-élimination"

carbanion sur le carbone β avec formation d'une liaison π, avec rupture concomitante de la liaison C-O et libération, sous la forme d'un anion, du groupement électrophile (d'un glycosyloxy-anion, dans le cas particulier que nous avons choisi).

d) Conclusion

Le groupement carboxylique de la sérine et de la thréonine O-glycosidée doit être bloqué pour que s'exerce l'action de la soude sur la liaison glucide-amino-acide : MONTREUIL, MONSIGNY et BUCHET (445). Ce résultat original présente un intérêt fondamental dans l'étude de la nature de la liaison glycanne-protide. En effet, si le groupement carboxylique de l'hydroxy-amino-acide O-conjugué au glucide est libre, une grave cause d'erreur d'interprétation d'un résultat négatif de l'action de la soude peut être commise. Pour l'éviter, les glycoprotides renfermant des β-hydroxy-amino-acides doivent être systématiquement amidés avant de faire agir la soude, de manière à bloquer le groupement carboxylique éventuellement libre d'un hydroxy-amino-acide O-conjugué à un glycanne.

o

o o

SYNTHESE DE PEPTIDES ET DE GALACTOSIDES DE PEPTIDES

(à suivre)

Lors de l'étude de l'action de l'acide chlorhydrique (page 67) et de la soude (page 75) sur le O-séryl β-D-galactoside et sur certains de ses dérivés, nous avons mis en évidence l'influence primordiale des substituants des fonctions amine et acide de la sérine, que ce soit au niveau de la fonction amine ou à celui du groupement carboxylique.

Par exemple, en milieu alcalin à pH 11, les β-D-glucopyrannosides de la N-benzyloxycarbonyl-L-sérine et du méthylamide de la L-sérine ne sont pas dégradés après 24 h à 37°C. Par contre, le β-D-glucopyrannoside du méthylamide de la N-benzyloxycarbonyl-L-sérine, dans les mêmes conditions est dégradé à 95 p. 100 : DEREVITSKAYA et al. (446).

La stabilité de la liaison O-glycosidique dans les glycoprotéines, il devenait intéressant de synthétiser des galactosides de peptides afin de posséder des modèles dont la structure se rapprochait de celle de glycoprotéines. Nous nous proposons donc de synthétiser des β-D-galactopyrannosides de la L-sérine en substituant les fonctionsamine et acide de cette dernière par des résidus d'acides aminés.

Dans une première partie, nous exposerons les résultats que nous avons obtenus à propos de la synthèse de peptides de la L-sérine, puis dans une seconde partie à suivre, nous décrirons la synthèse des galactosides de ces peptides, ainsi que leur stabilité en milieu acide et basique.

I - SYNTHESE DE PEPTIDES DE LA L-SERINE

Pour alléger cet exposé, nous avons désigné les amino-acides et les peptides par les abréviations proposées par SCHWYSER (447) ; les motifs élémentaires dérivés des amino-acides sont représentés par les trois premières lettres du nom qui les désigne ; pour représenter la formule développée de l'amino-acide écrite en commençant par l'extrémité azotée, il suffit d'ajouter à gauche le symbole H et à droite OH. Dans le cas d'un amino-acide trifonctionnel la fonction portée par la chaîne latérale ne sera pas mentionnée sauf si elle est subtituée par un groupement qui figurera alors entre parenthèses.

D'autres abréviations proposées par la Commission de Nomenclature IUPAC-IUB (448) seront utilisées pour désigner des groupements divers, des réactifs ou des solvants.

Lorsque dans l'écriture d'un acide aminé ne figure aucun symbole, il s'agit toujours de l'isomère L.

-Ala-	résidu L-alanyle	$-NH-CH(CH_3)-CO-$
Ac-	acétyle	CH_3-CO-
Bu-	butyle	$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-$
Bzl-	benzyle	$C_6H_5-CH_2-$
DCCI	dicyclohexylcarbodiimide	$C_6H_{11}-N=C=N-C_6H_{11}$
DCHA	dicyclohexylamine	$C_6H_{11}-NH-C_6H_{11}$
DMF	diméthylformamide	$H-CO-N(CH_3)_2$
Et-	éthyle	CH_3-CH_2-
-Gly-	résidu glycyle	$-NH-CH_2-CO-$
Me-	méthyle	CH_3-
Nps-	o-nitrophénylsulfényle	$NO_2-C_6H_4-S-$
-Ser-	résidu L-séryle	$-NH-CH(CH_2-OH)-CO-$

TEA	triéthylamine	$(C_2H_5)_3N$
THF	tétrahydrofuranne	$O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2$
Z-	benzyloxycarbonyle	$C_6H_5-CH_2-O-CO-$

Les peptides que nous avons synthétisés devant être condensés par la suite avec l'acétobromogalactose, sont protégés du côté N terminal par le groupement benzyloxycarbonyle et, du côté C terminal, sous la forme d'ester benzylique car ces deux substituants présentent de nombreux avantages (voir page 11).

Afin de mettre plus facilement en évidence l'influence de substituants de la sérine, nous avons engagé dans une liaison peptidique soit sa fonction amine, soit sa fonction acide, soit les deux ensemble ; de plus, nous avons utilisé deux amino-acides différents dans le but de faciliter les études ultérieures.

La glycine et l'alanine ont été retenues pour diverses raisons : premièrement, ces amino-acides sont abondants dans les mucines ainsi que dans les glycoprotéines d'érythrocytes ; deuxièmement, les polymères à base de glycine, alanine et sérine ont des structures connues, et de ce fait, il était intéressant de mener une étude comparée de ces polymères et de ces mêmes composés possédant des sucres liés aux hydroxyles de la sérine par des liaisons O-glycosidiques.

Pour ces raisons, nous avons été amené finalement à choisir les trois peptides suivants :

Z-Ser-Gly-OBzl

Z-Ala-Ser-OBzl

Z-Ala-Ser-Gly-OBzl

A) Z-Ser-Gly-OBzl

1) Principe

La N-benzyloxycarbonyl L-sérine et l'ester benzylique de la glycine sont couplés par la méthode à la carbodiimide de SHEEHAN et al. (449, 450) et KHORANA (451) (voir la figure 18, page 93), l'ester benzylique de la glycine étant préparé au sein du mélange réactionnel par action de la triéthylamine sur le tosylate de l'ester benzylique de la glycine, ceci est illustré par la figure 19,(page 94).

2) Mode opératoire

a) Préparation de CH_3-C_6H_4-SO_3H,H-Gly-OBzl

Nous avons utilisé la méthode de ZERVAS, WINITZ et GREENSTEIN (452). Dans un ballon de 500 ml sont introduits : 18,8 g de glycine (0,25 mole) 48,5 g d'acide p-toluène sulfonique monohydraté (0,255 mole) préalablement séché à l'étuve sous vide, 100 ml d'alcool benzylique et 50 ml de benzène. Le mélange est chauffé à reflux. L'eau formée lors de l'estérification ainsi que l'eau provenant de l'acide p-toluène sulfonique est éliminée azéotropiquement avec le benzène grâce à un DEAN et STARK. La solution devient limpide après 3 h de distillation. Quand l'eau (≈ 9 ml) ne distille plus (6-7 h), on laisse le mélange réactionnel se refroidir à la température du laboratoire, puis on le filtre. Au filtrat sont additionnés 250 ml de benzène puis 400 ml d'éther sec et l'ensemble est placé une nuit à + 4°C. Le tosylate de l'ester benzylique de glycine qui cristallise est filtré, lavé avec de l'éther anhydre puis recristallisé dans du THF chaud. On obtient 69 g d'un produit blanc cristallisé en aiguilles (Rdt : 82 p. 100).

F : 131 - 133°C λ_{max}^{KBr} 3020, 1600, 1500 (NH_3^+), 1755 (CO_2Bzl), 1180, 1040, 1015 (SO_3^-), 810 (Ar Tosyl), 725 (Ar Bzl), 1625, 1525, 1430, 1420, 1375, 1255, 1125, 1060, 910, 685 cm^{-1}.

Littérature : Rdt : 84 p. 100 F = 132-134°C : ZERVAS et al. (453)
Rdt : 83 p. 100 F = 132°C : CROFTS et al. (454)

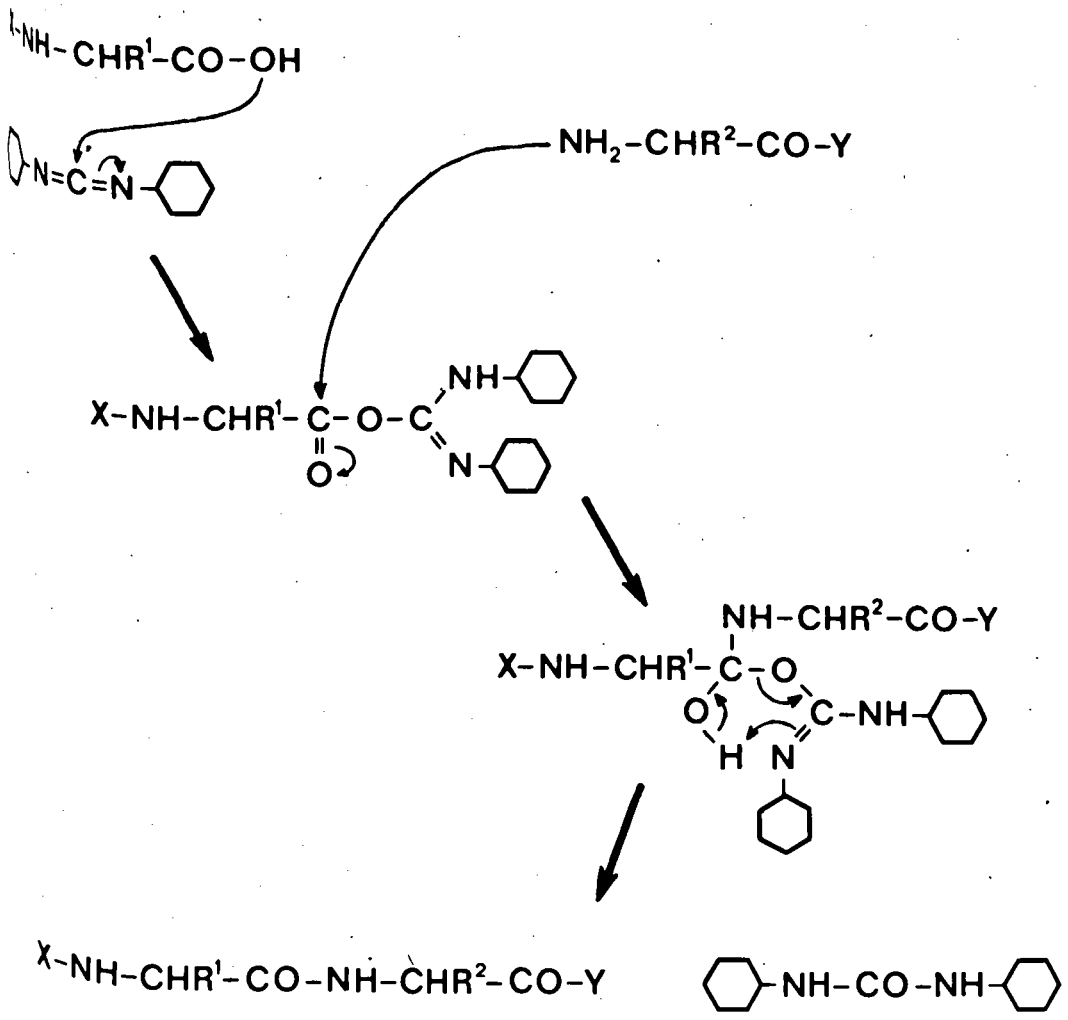
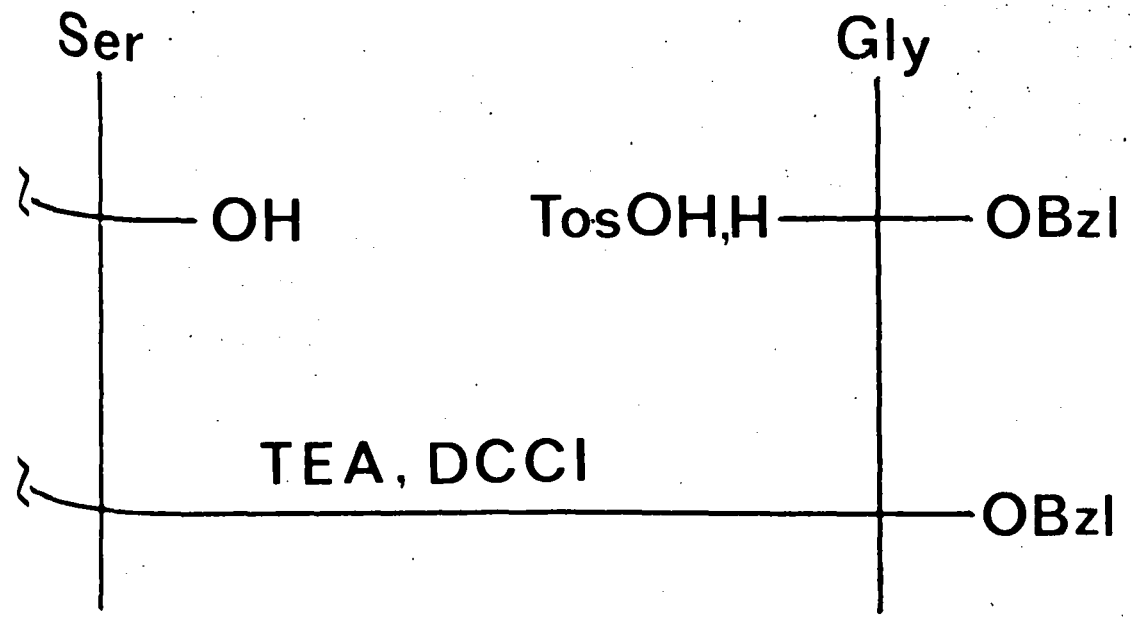


Figure 18

Mécanisme de la synthèse de liaison peptidique par la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide.



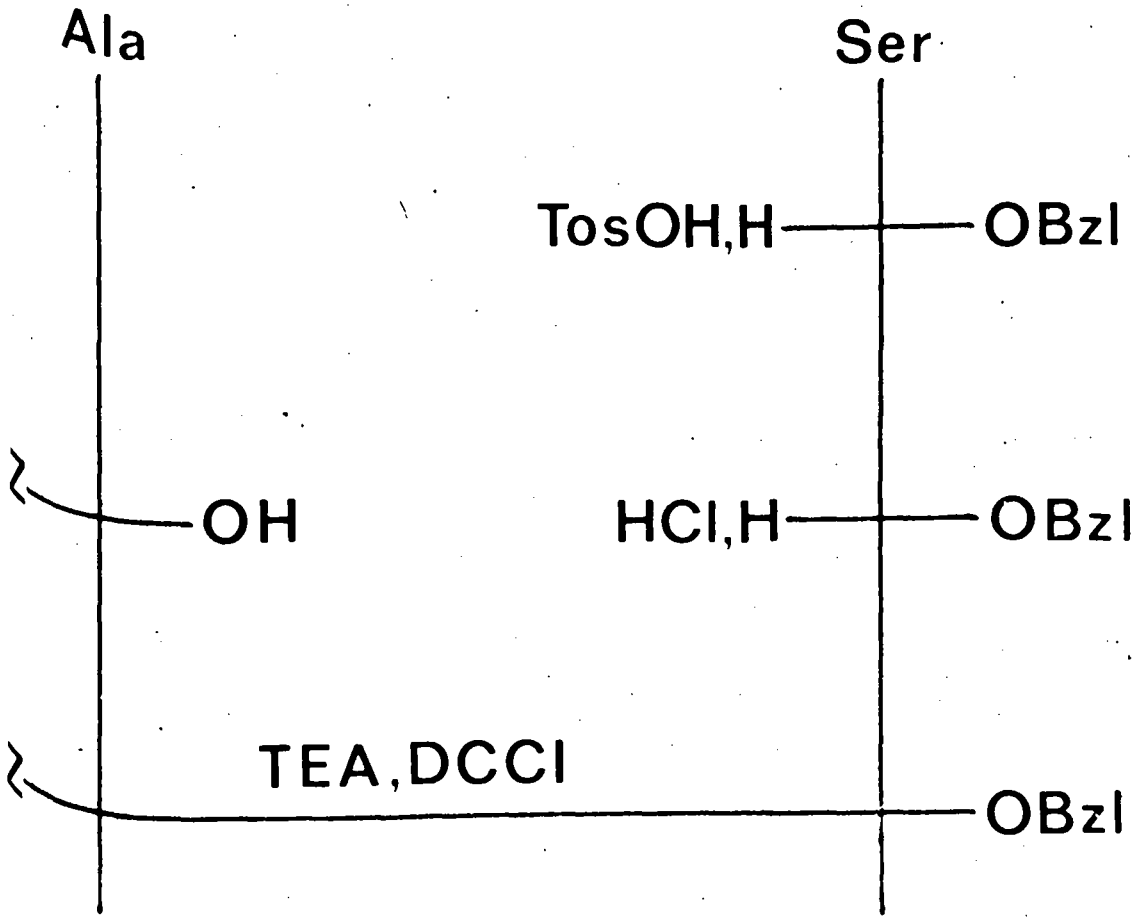


Figure 19

Schéma de la synthèse de Z-Ser-Gly-OBzl et Z-Ala-Ser-OBzl.

Remarque : Le tosylate de l'ester benzylique de la glycine peut être recristallisé dans l'isopropanol chaud.

b) Préparation de Z-Ser-OH

(voir page 44).

c) Préparation de Z-Ser-Gly-OBzl

A une suspension de 6,8 g de $CH_3-C_6H_4-SO_3H$,H-Gly-OBzl (0,02 mole) dans 80 ml d'acétonitrile refroidie à - 15°C, sont ajoutés 2,8 ml de TEA (0,02 mole). Après 20 mn d'agitation, sont ajoutés 4,8 g de Z-Ser-OH (0,02 mole) et 100 ml d'acétonitrile. Une solution de 4,2 g de DCCI (0,02 mole) dans 20 ml d'acétonitrile est ensuite additionnée au mélange réactionnel. On laisse alors remonter lentement la température à température ambiante puis on filtre. Le filtrat est concentré à moitié à l'évaporateur rotatif, placé une nuit à + 4°C, et la dicyclohexyl-urée qui précipite à nouveau, est éliminée par filtration. Le filtrat, évaporé à siccité, fournit un sirop qui est dissous dans 50 ml d'éthanol absolu. Après 1/4 h dans un bain de glace, l'ester benzylique de N-benzyloxycarbonyl sérylglycine (4,8 g) cristallise. (Rdt : 62 p. 100).

F = 109 - 110°C $\left[\alpha\right]^{25}_{546}$ = - 12,2° (c = 1,4 ; $CHCl_3$)

λ^{KBr}_{max} : 3380, 3360, (NH), 1745 (CO_2Bzl), 1685, 1655, 1645 (amide I), 1550, 1525 (amide II), 735, 695 (Ar), 1460, 1410, 1390, 1360, 1265, 1230, 1215, 1115, 1085, 1065, 1030, 980, 780, 755, 725 cm^{-1}.

Analyse : $C_{20}H_{22}O_6N_2$ (M : 386,44)

Calc. %	62,16	5,75	24,84	7,25
tr.	C 61,54	H 5,99	O 24,54	N 6,94

Par dosage de la sérine et de la glycine à l'auto-analyseur d'amino-acides, nous obtenons Ser/Gly = 0,92.

Remarques : FÖLSCH (457) qui a synthétisé ce composé mais en utilisant la DL-sérine, remarque que la méthode à la carbodiimide fournit de meilleurs résultats que celle à l'azide ou à l'anhydride mixte.

Nous avons également synthétisé Z-Ser-Gly-OBzl dans le THF, mais le rendement est légèrement plus faible que celui obtenu en utilisant l'acétonitrile. De plus, comme l'ont montré ZAHN et DIEHL (458), lors des synthèses à la DCCI, la Z-Ser-OH se transforme partiellement en N (N-benzyloxycarbonylséryl)-N,N'-dicyclohexylurée si l'on ne travaille pas en présence d'acétonitrile, ce dernier accélérant fortement la formation de la liaison peptidique.

Littérature : par la méthode à l'azide : FRUTON (455), Rdt : 45 p. 100
F = 102°C

par la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide :
THEODOROPOULOS et GAZOPOULOS (456), Rdt : 71 p. 100
F = 105 - 106°C

B) Z-Ala-Ser-OBzl

1) Principe

La N-benzyloxycarbonyl L-alanine et l'ester benzylique de la L-sérine sont couplés par la méthode à la dicyclohexyl carbodiimide ; l'ester benzylique de la L-sérine étant obtenu *in situ* par action de la triéthylamine sur le chlorhydrate de l'ester benzylique de la L-sérine, lui-même obtenu à partir du tosylate correspondant. Ceci est illustré par la figure 19, (page 94).

2) Mode opératoire

a) Préparation de Z-Ala-OH

Nous avons utilisé la méthode de BERGMANN et ZERVAS (459). Une solution de 8,9 g de L-alanine (0,1 mole) dans 25 ml de soude 4 N (0,1 mole) est refroidie à 0°C puis traitée pendant une heure par 17 g de chloroformiate de benzyle (0,1 mole) et 25 ml de soude 4 N, divisés en 5 parties égales et ajoutés alternativement. L'agitation est maintenue pendant 2 h à 0°C puis 2 h à 20°C. Le chloroformiate qui n'a pas réagi est éliminé

par filtration sur papier humide, et le filtrat est acidifié jusqu'à pH 3 par HCl concentré. L'huile qui précipite cristallise en aiguilles, après quelques minutes, et par reprécipitation, dans l'éther de pétrole, du produit dissous dans l'éther, on obtient 17 g de produit blanc. (Rdt : 76 p. 100).

F = 84°C (littérature : 84°C)

λ_{max}^{KBr} : 3330(NH), 1695 (amide I), 1535 (amide II), 1455, 1375 (CH_3), 745, 695 (Ar), 1290, 1275, 1250, 1075, 1030, 1020, 780, 730 cm^{-1}.

b) Préparation de HCl,H-Ser-OBzl

Dans un premier temps, nous avons préparé le tosylate de l'ester benzylique de la L-sérine, selon le procédé expérimental de FÖLSCH (460). En effet, l'estérification se fait avec de bons rendements quand l'amino-acide est rendu soluble dans l'alcool benzylique en formant un sel de l'acide benzènesulfonique : MILLER et WAELSCH (461).

8,4 g d'acide p-toluène sulfonique monohydraté (0,044 mole) préalablement séché sous vide, sont dissous dans un mélange de 20 ml d'alcool benzylique et 75 ml de tétrachlorure de carbone. 4,2 g de L-sérine (0,040 mole) sont ajoutés à cette solution qui est distillée lentement. Lorsque l'eau ne distille plus (7 - 8 h), le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante puis filtré. Le filtrat, auquel sont additionnés 200 à 300 ml d'éther sec, est placé une nuit à + 4°C. L'huile qui précipite, cristallise après trituration prolongée. Le produit blanc ainsi obtenu est filtré puis lavé abondamment avec de l'éther de pétrole.

Le produit de la réaction est souvent difficile à cristalliser à cause de la présence de produits secondaires obtenus par exemple par O-benzylation : ZAHN et DIEHL (462).

Une recristallisation par l'isopropanol-éther, n'amène pas la purification attendue ; aussi, le tosylate est transformé en chlorhydrate, produit beaucoup plus facile à purifier.

A une solution de 3,7 g de tosylate de l'ester benzylique de la L-sérine (0,01 mole) dans 20 ml de chloroforme, refroidie à 0°C, sont ajoutés goutte à goutte et sous agitation, 1,96 ml de dicyclohexylamine (0,01 mole).

Par addition de 100 ml d'éther anhydre, le tosylate de dicyclohexylamine formé précipite sous forme d'huile qui ne tarde pas à cristalliser, puis est éliminé par filtration et lavé avec de l'éther anhydre. Au filtrat, refroidi à 0°C, sont ajoutés goutte à goutte et sous agitation 0,021 mole d'une solution HCl/Et_2O. Le chlorhydrate précipite immédiatement sous forme de cristaux blancs qui sont filtrés et lavés par de l'éther anhydre, 2,2 g. Rdt = 95 p. 100 (à partir du tosylate). Une recristallisation dans l'isopropanol chaud, fournit 1,9 g de HCl,H-Ser-OBzl (Rdt = 82 p.100 à partir du tosylate correspondant).

$F = 177 - 179°C \qquad [\alpha]^{25}_{546} = -4,3° \quad (c = 4,4 \; ; \; CH_3OH)$

λ^{KBr}_{max} : 3050, 1600, 1505 (NH_3^+), 1755 (CO_2Bzl), 740, 695 (Ar), 3350, 2720, 2525, 2425, 1470, 1400, 1370, 1340, 1295, 1245, 1230, 1160, 1130, 1095, 1035, 975, 940 cm^{-1}.

Analyse : $C_{10}H_{14}O_3NCl$ (M = 231,70)

	C	H	O	N	Cl
Calc. %	51,83	6,10	20,72	6,05	15,30
Tr.	52,14	6,35	20,42	6,20	15,03

Littérature : FÖLSCH (463) : Rdt : 74 p. 100, F = 172-174°C

$[\alpha]^{21}_{D} = -4,1° \quad (c = 4,4 \; ; \; CH_3OH)$ (Trouvé : - 3,7°)

LOSSE et AUGUSTIN (464) : $[\alpha]^{20}_{D} = -4,19° \; (c = 4,53 \; ; \; CH_3OH)$.

Remarque : Pour préparer H-Ser-OBzl à partir du tosylate correspondant, ZAHN et DIEHL, ainsi que FÖLSCH utilisent la TEA. Nous avons préféré utiliser la DCHA qui, avec l'acide p-toluène sulfonique, donne un sel d'ammonium cristallisant spontanément, ce qui n'est pas le cas lorsque l'on utilise la TEA.

BU LILLE

c) Préparation de Z-Ala-Ser-OBzl

A une suspension de 2,315 g de HCl,H-Ser-OBzl (0,01 mole) dans 50 ml de chlorure de méthylène, refroidie à 0°C, sont ajoutés goutte à goutte sous agitation magnétique 1,4 ml de TEA (0,01 mole). 2,23 g de Z-Ala-OH (0,01 mole) sont alors additionnés au mélange réactionnel ; la température de celui-ci étant portée à - 10°C, on ajoute 2,1 g de DCCI (0,1 mole) dissous dans 10 ml de chlorure de méthylène. La température de la réaction est maintenue 10 h à - 5°C, puis est laissée remonter lentement (12 h) à température ambiante. Le mélange réactionnel est filtré, et le filtrat est lavé successivement par HCl 1 N, H_2O, $NaHCO_3$ à 5 p. 100, H_2O, et finalement, après séchage sur Na_2SO_4, évaporé à sec sous pression réduite. Le produit, dissous dans un minimum d'acétate d'éthyle chaud, est reprécipité par de l'éther de pétrole : 2,95 g (Rdt : 74 p. 100).

F : 125 - 126°C $\quad [\alpha]^{25}_{546} = -0,3°$ $\quad$ (c = 1,1 ; $CHCl_3$)

λ^{KBr}_{max} : 3455 (OH), 3400, 3320 (NH), 3060, 3025, 730, 695(Ar), 2940, 1455, 1380 (CH_3), 1740 (CO_2Bzl), 1705, 1660 (amide I), 1540 (amide II), 1410, 1360, 1325, 1290, 1260, 1230, 1210, 1190, 1130, 1080, 1045, 1030, 985, 790, 780 cm^{-1}.

Analyse : $C_{21}H_{24}O_6N_2$ $\quad$ (M = 400,47)

	C	H	O	N
Calc. %	62,98	6,05	23,97	7,00
Tr.	63,32	6,30	23,45	7,18

Par dosage de l'alanine et de la sérine à l'auto-analyseur d'amino-acides, nous obtenons Ala/Ser = 1,09.

C) Z-Ala-Ser-Gly-OBzl

1) Principe

La N-benzyloxycarbonyl L-alanine et l'ester benzylique de la L-séryl glycine sont couplés par la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide ;

l'ester benzylique de la L-sérine glycine étant engendré *in situ* par action de la triéthylamine sur le chlorhydrate correspondant. Le chlorhydrate de l'ester benzylique de la L-séryl glycine a été obtenu par action de l'acide chlorhydrique sur l'ester benzylique de la (N-o-nitrophénylsulfényl-séryl)-glycine synthétisé lui-même en couplant le N-o-nitrophénylsulfényl sérinate de dicyclohexylammonium avec le tosylate de l'ester benzylique de la glycine. Ceci est illustré par la figure 20 (page 101).

2) Mode opératoire

a) Préparation de Nps-Ser-OH,DCHA

Nous avons utilisé la méthode de ZERVAS, BOROVAS et GAZIS (465), en employant deux fois plus de soude, comme nous l'a inspiré la publication de WÜNSCH et FONTANA (466).

Une suspension de 2,1 g de L-sérine (0,02 mole) dans un mélange de 10 ml d'eau et 25 ml de dioxanne est traitée, à température ambiante, pendant 20 mn par 4,2 g de chlorure de nitro-2 benzènesulfényle (0,022 mole) dans 10 ml de dioxanne et 22 ml de soude 2 N (0,044 mole), divisés en 10 parties égales et ajoutés alternativement. L'agitation est maintenue 20 minutes, puis le mélange réactionnel est acidifié jusqu'à pH 3 par H_2SO_4 1 N sous agitation. La solution est ensuite extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée plusieurs fois à l'eau jusqu'à ce que la phase aqueuse devienne neutre au rouge congo, puis est séchée sur Na_2SO_4. A la solution refroidie à 0°C sont ajoutés goutte à goutte sous agitation 4 ml de DCHA (0,02 mole). Le produit qui cristallise est filtré après 1 h à 0°C, et lavé avec de l'acétate d'éthyle. On obtient 7,03 g de produit jaune serin. (Rdt = 80 p. 100) F : 173-175°C

$[\alpha]^{25}_{546}$ = - 109°,4 (c = 1 ; DMF)

$[\alpha]^{25}_{D}$ = - 80,4° (c = 1, DMF)

λ^{KBr}_{max} : 3400 (OH) 3270, 1550 (NH), 3000, 1590 (NH_2^+), 2930, 2855, 1445 (CH_2), 1630 (SN), 1510, 1335, 850 (NO_2), 735 (Ar), 1570, 1305, 1070, 1025, 785, 650 cm^{-1}.

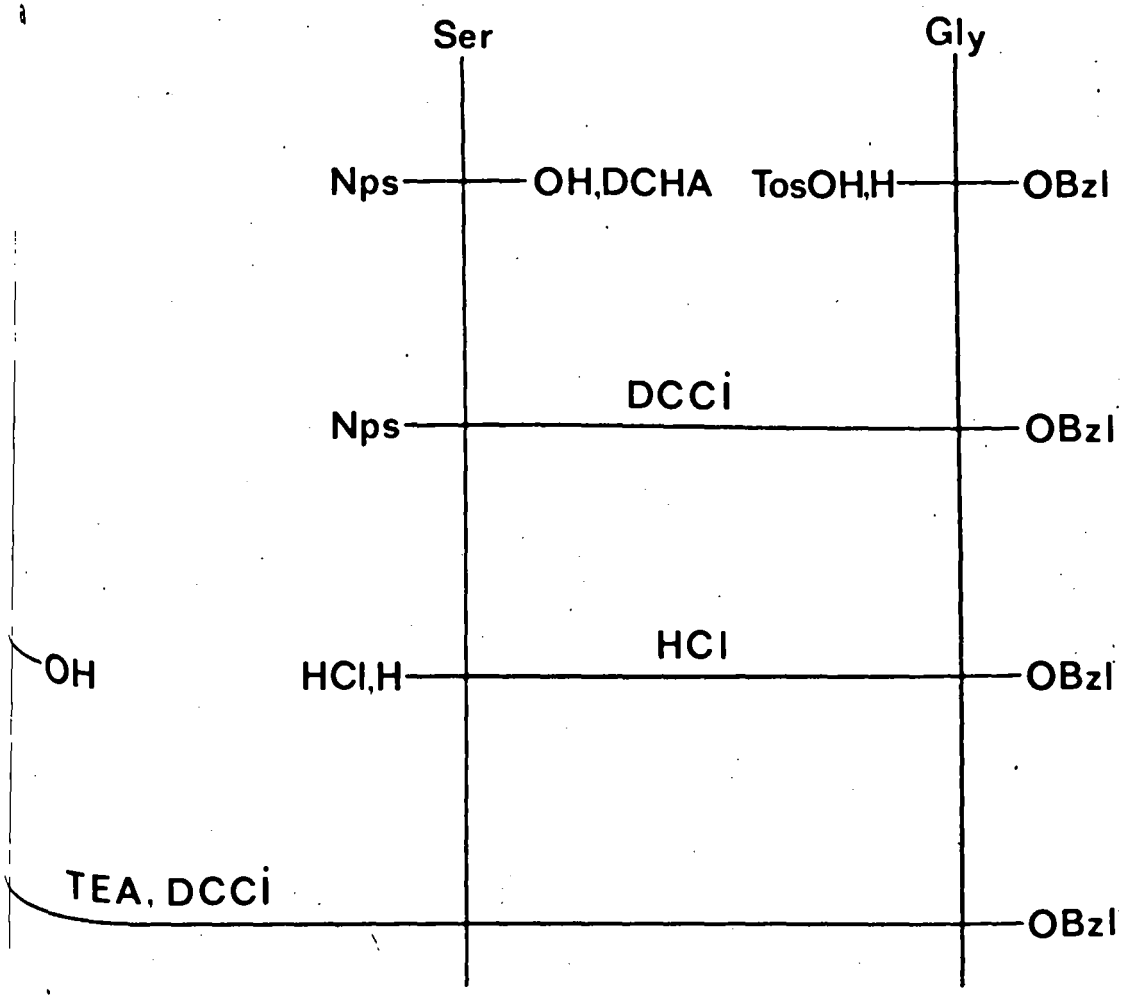


Figure 20

Schéma de la synthèse de Z-Ala-Ser-Gly-OBzl

Littérature : ZERVAS et HAMALIDIS (467) : Rdt : 61 p. 100 F = 171-173°C

$[\alpha]_D$ = - 89° (c = 1 ; DMF)

Remarque : en utilisant les conditions décrites par ZERVAS, BOROVAS et GAZIS (468), il y a formation de di-o-nitrophényldisulfure avec un rendement d'environ 20 p. 100, par réaction secondaire du chlorure de nitro-2 benzènesulfényle, ce qui explique la baisse de rendement en Nps-Ser-OH,DCHA.

b) Préparation de CH_3-C_6H_4-SO_3H,H-Gly-OBzl

(voir page 92)

c) Préparation de Nps-Ser-Gly-OBzl

A une solution de 13,17 g de Nps-Ser-OH,DCHA (0,03 mole) et 10,11 g de CH_3-C_6H_4-SO_3H,H-Gly-OBzl (0,03 mole) dans 150 ml de $CHCl_3$, refroidie à - 10°C, sont ajoutés 6,3 g de DCCI (0,03 mole). La solution est agitée pendant 2 h à 0°C, puis une nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est filtré et le précipité de dicyclohexylurée est lavé par de l'acétate d'éthyle, jusqu'à ce qu'il devienne blanc (10 à 20 lavages). Dans le filtrat précipite le tosylate de DCHA qui est éliminé par filtration. Le nouveau filtrat est évaporé à sec sous pression réduite puis est repris par de l'acétate d'éthyle bouillant, filtré et concentré de nouveau à siccité. Après recristallisation dans l'isopropanol on obtient 10,7 g de produit jaune. (Rdt : 88 p. 100). $[\alpha]_D^{25}$ = - 44,1° (c = 2 ; DMF)

F = 138-140°C $[\alpha]_{546}^{25}$ = - 44,5° (c = 2 ; DMF)

λ_{max}^{KBr} : 3565 (OH), 3300, 3280 (NH), 1730 (CO_2Bzl), 1650 (amide I), 1560 (amide II), 1515, 1335, 850 (NO_2), 730 (Ar), 3070, 1595, 1450, 1430, 1395, 1365, 1305, 1250, 1215, 1135, 1100, 1055, 1040, 1020, 940, 910, 785, 760, 670 cm^{-1}.

Analyse : $C_{18}H_{19}O_6N_3S$ (M = 405,41)

	C	H	N	S
Calc. %	53,32	4,73	10,37	7,90
Tr.	53,85	5,27	10,17	8,03

Par dosage de la sérine et de la glycine à l'auto-analyseur d'amino-acides, nous obtenons Ser/Gly = 0,91.

d) Préparation de HCl,H-Ser-Gly-OBzl

On dissout 10,13 g de Nps-Ser-Gly-OBzl (0,025 mole) dans 75 ml de méthylcellosolve (CH_3-O-CH_2-CH_2-OH) chaud. A cette solution est ajouté un mélange de 250 ml d'acétate d'éthyle et 250 ml d'éther anhydre puis, sous agitation, 0,074 mole d'acide chlorhydrique dissous dans de l'éther anhydre. Le mélange réactionnel est agité vigoureusement 30 mn jusqu'à ce que le surnageant devienne limpide. Le produit est filtré et lavé plusieurs fois avec de l'éther anhydre. On obtient 6,46 g de chlorhydrate sous forme de cristaux blancs (Rdt : 90 p. 100).

F = 136 - 138°C $\quad [\alpha]^{25}_{546} = +20,5°$ (c = 1 ; DMF)

$[\alpha]^{25}_{Na} = +18,0°$ (c = 1 ; DMF)

λ^{KBr}_{max} : 3290 (NH), 3110, 1485 (NH_3^+), 1735 (CO_2Bzl), 1690 (amide I), 1590 (amide II), 750, 695 (Ar), 1470, 1455, 1415, 1390, 1360, 1235, 1140, 1020, 1010, 715 cm^{-1}.

Analyse : $C_{12}H_{17}O_4N_2Cl$ (M = 288,76)

	C	H	O	N	Cl
calc. %	49,91	5,95	22,16	9,70	12,28
tr.	49,44	6,12	22,25	9,81	12,07

e) Préparation de Z-Ala-OH

(voir page 96)

f) Préparation de Z-Ala-Ser-Gly-OBzl

A une suspension de 5,77 g de HCl,H-Ser-Gly-OBzl (0,02 mole) dans 100 ml de $CHCl_3$, refroidie à 0°C, sont ajoutés goutte à goutte sous agitation magnétique 2,8 ml de TEA (0,02 mole). Lorsque le mélange réactionnel

est devenu limpide, 4,46 g de Z-Ala-OH (0,02 mole) sont additionnés puis la température de la solution est portée à - 10°C. On ajoute alors 4,2 g de DCCI (0,02 mole) et l'agitation est maintenue 6 h à 0°C puis une nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est concentré à siccité sous pression réduite puis repris par un mélange eau/méthanol (4:1) à ébullition sous réfrigérant ascendant. (La dicyclohexylurée est insoluble dans ces conditions). En filtrant chaud sur verre fritté n° 4, on élimine l'uréine, et dans le filtrat cristallise instantanément le tripeptide. (Le chlorhydrate de triéthylamine restant en solution).

En général, le précipité de dicyclohexylurée contient encore du peptide ; aussi, on le reprend plusieurs fois par le mélange eau/méthanol (4:1) bouillant et l'on s'assure que le précipité ne contient plus de peptide au moyen d'un spectre infra-rouge. Les différentes fractions contenant le peptide sont rassemblées (5,19 g). Par recristallisation dans le méthanol, on obtient 4,74 g de N-benzyloxycarbonyl L-alanyl L-séryl glycinate de benzyle (Rdt : 52 p. 100).

F = 156 - 157°C $\quad [\alpha]^{25}_{546} = + 5,2°$ (c = 2,1 ; DMF)

$[\alpha]^{25}_{Na} = + 4,3°$ (c = 2,1 ; DMF)

λ^{KBr}_{max} : 3335, 3300, 3280 (NH), 1740 (CO_2Bzl), 1695, 1640 (amide I), 1535 (amide II), 740, 695 (Ar), 1455, 1440, 1410, 1350, 1255, 1215, 1135, 1065, 1030, 950, 750 cm^{-1}.

Analyse : $C_{23}H_{27}O_7N_3$ (M = 457,53)

	C	H	O	N
Calc. %	60,37	5,96	24,48	9,19
Tr.	60,44	6,03	24,38	9,22

Par dosage de l'alanine, de la sérine et de la glycine à l'auto-analyseur d'amino-acides, nous obtenons : Ser/Gly = 0,91 et Ala/Gly = 1,08.

D) Conclusion

Nous avons synthétisé trois peptides de la sérine dans le but de les condenser avec l'acétobromogalactose afin d'étudier quelques propriétés de glycopeptides. Seul Z-Ser-Gly-OBzl avait été synthétisé par d'autres auteurs.

Remarque : La sérine étant l'un des α amino-acides qui se racémise le plus facilement (DAFT et COGHILL (469)), les synthèses de peptides seront faites dans le sens C terminal → N terminal.

o

o o

CONCLUSION

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'ensemble de nos recherches sur les β-D-galactopyrannosides d'hydroxy-amino-acide sont les suivantes :

1) Nous avons mis au point des procédés de synthèse de glycosides dont certains n'avaient pas encore été réalisés jusqu'à présent. Il s'agit des composés suivants, dont nous avons, en outre, précisé les comportements chromatographiques et électrophorétiques :

le O-séryl β-D-galactopyrannoside
le O-thréonyl β-D-galactopyrannoside
la N-dinitro 2,4 phényl-O-(β-D-galactopyrannosyl) L-sérine
la N-acétyl-O-(β-D-galactopyrannosyl) L-sérine
l'ester méthylique du O-séryl β-D-galactopyrannoside
l'amide du O-séryl β-D-galactopyrannoside
le butylamide du O-séryl β-D-galactopyrannoside.

Seule la préparation du O-séryl β-D-galactopyrannoside avait été décrite par KUM et ROSEMAN (470), DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (471) et RÜDE et MEYER-DELIUS (472).

2) Nous avons étudié l'action de l'acide chlorhydrique sur le O-séryl β-D-galactoside, ainsi que sur ses dérivés N-dinitrophénylé et N-acétylé, dans les conditions habituellement appliquées pour effectuer l'hydrolyse partielle de glycoprotides dans le but d'obtenir le glucide et l'amino-acide impliqués dans la liaison glycanne-protéine ; HCl 1 N à 100°C pendant 5 à 90 mn. Nous avons, de cette manière, démontré que la liaison O-galactosyl de la sérine est peu stable : l'hydrolyse est sensiblement totale après une heure ; et que le O-séryl β-D-galactoside ne peut être présent dans les hydrolysats partiels de glycoprotides.

3) Nous avons étudié l'action de la soude sur le O-séryl β-D-galactoside et montré que celle-ci hydrolyse lentement le produit de synthèse pour fournir du galactose et de la sérine.

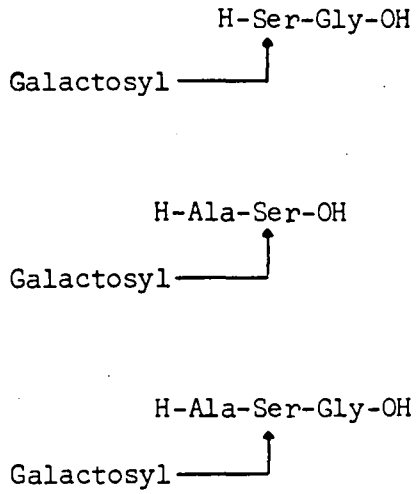
4) Nous confirmons que la rupture, par la soude, d'une liaison O-glycosidique d'hydroxy-amino-acide, par un mécanisme de "β-élimination", ne peut s'effectuer qu'à la condition que le groupement carboxylique de cet acide aminé soit bloqué, soit par conjugaison peptidique "naturelle" avec un autre amino-acide, soit par estérification ou amidation "artificielle". Cette information est capitale afin d'éviter des causes d'erreur dans l'interprétation des résultats de l'action de la soude sur les glycoprotides. Cependant, il est à noter que notre produit est beaucoup plus stable, en milieu alcalin, que son homologue de la glucosamine. En effet, le N-acétyl-glucosaminide de la sérinamide est détruit rapidement par "β-élimination" : BUCHET (473), MONSIGNY (474) et WERRIES et BUDDECKE (475).

5) Nous avons mis au point des procédés de synthèse de peptides dont certains n'avaient pas encore été réalisés jusqu'à présent. Il s'agit des composés suivants :

N-benzyloxycarbonyl-séryl-glycinate de benzyle
N-benzyloxycarbonyl-alanyl-sérinate de benzyle
N-benzyloxycarbonyl-alanyl-séryl-glycinate de benzyle

Seule la préparation du N-benzyloxycarbonyl-séryl-glycinate de benzyle avait été décrite par FRUTON (476) et THEODOROPOULOS et GAZOPOULOS (477).

6) Nous nous proposons de synthétiser les glycopeptides suivants :



afin de définir l'influence de la substitution des groupements aminés et carboxyliques de la sérine par des amino-acides. En se plaçant dans les conditions rencontrées lors de l'étude des glycoprotides, nous pourrons mettre au point des méthodes précises d'identification et de dosage de telles liaisons dans les glycoprotides.

Dans un second temps, nous préparerons des glycopeptides dont la partie peptidique est plus importante, ceci dans le but de connaître l'influence des groupements glycanniques sur la conformation des chaînes peptidiques.

o

o o

BIBLIOGRAPHIE

ABDERHALDEN E. et ZEMPLÉN G., Z. Physiol. Chem., 1911, 72, 58.
(322).

ADKINS H., ROSS R.M., SCHROEDER D.C., MAHONEY C.L. et GILBERT W.W., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 147.
(15)

ANGYAL S.J. et SHELTON B., J. Chem. Soc., 1966, 433.
(199, 230, 239, 259, 262, 266).

ASP L. et LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1950, 4, 1386.
(275, 282)

ASP L. et LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1952, 6, 947.
(276)

AUGESTAD I., BERNER E. et WEIGNER E., Chemistry et Industry, 1953, 376.
(45)

AUSTIN P.W., HARDY F.E., BUCHANAN J.G. et BADDILEY J., J. Chem. Soc. 1965, 1419.
(100, 363, 369)

AUSTIN F., J. Chem. Soc., 1964, 2128.
(229)

BACHLI P. et PERCIVAL E.G.V., J. Chem. Soc., 1952, 1243.
(117, 186, 222, 234, 240)

BAER E. et MAURUKAS J., J. Biol. Chem., 1955, 212, 25.
(13, 26)

BALLOU C.E., Adv. Carb. Chem., 1954, 9, 59.
(438)

ÜRCZAI-MARTOS M. et KÖROSY F., Nature, 1950, 165, 369.
(158)

ATES F.J. and Associates "Polarimetry, Saccharimetry and the Sugars", Natl. Bur. Standards Circular, 440, 1942, 500.
(115)

EHREND R. et ROTH P., Ann., 1904, 331, 359.
(73)

EMBRY T.H. et POWELL G., J. Am. Chem. Soc., 1942, 64, 2419.
(55)

EN-ISHAI D. et BERGER A., J. Org. Chem., 1952, 17, 1564.
(25, 407)

ERGEL F. et WADE R., J. Chem. Soc., 1959, 941.
(30, 406, 408)

ERGMANN M. et ZERVAS L., Ber., 1932, 65, 1192.
(18, 459)

ERGMANN M., ZERVAS L. et ROSS W.F., J; Biol. Chem., 1935, 111, 245.
(34)

ERNOULLI et STAUFFER, Helv. Chim. Acta, 1940, 23, 615.
(101)

OISSONNAS R.A. et GUTTMANN S., Helv. Chim. Acta, 1960, 43, 200.
(38)

OLLENBACK G.N., LONG J.W., BENJAMIN D.G. et LINDQUIST J.A., J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 3310.
(52, 54)

ONNER W.A., Adv. Carb. Chem., 1951, 6, 251.
(138)

ONNER W.A., J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 3372.
(78)

ONNER W.A., J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 5171.
(269)

ONNER W.A. et KOEHLER W.L., J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 314.
(345, 349)

RAUNS D.H., J. Am. Chem. Soc., 1920, 42, 1846.
(133)

RAUNS D.H., J. Am. Chem. Soc., 1922, 44, 401.
(134)

RAUNS D.H., J. Am. Chem. Soc., 1925, 47, 1280.
(113)

REDERECK H., WAGNER A., FABER G., OTT H. et RAUTHER J., Chem. Ber., 1959, 92, 1135.
(227)

BENDEL K. et DAVIDSON E.A., Carbohyd. Res., 1966, 2, 42.
(155, 187, 226, 255, 263, 283, 313, 355, 366, 367, 377, 378, 379)

BETSCHNEIDER H. et BERAN K., Monatsh., 1949, 80, 262.
(59)

BRIGL P. et SCHINLE R., Ber., 1934, 67, 754, Ber., 1934, 67, 127.
(98)

BRUNDISH D.E., SHAW N. et BADDILEY J., J. Chem. Soc., 1966, 521.
(143).

BUCHET M.T., D.E.S., Lille, 1966.
(390, 434, 473)

BUCK K.W., DUXBURY J.M., FOSTER A.B., PERRY A.R. et WEBBER J.M., Carbohyd. Res.,1966, 2, 122.
(82)

CADOTTE J.E., SMITH F. et SPRIESTERSBACH D., J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 1501.
(48)

CASH W.D., J. Org. Chem.,1962, 27, 3329.
(21)

COLLEY A., Ann. Chim. Phys., 1870, 21, 363.
(163, 166)

CONCHIE J. et LEVVY G.A., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 335.
(156, 347, 394, 397, 400)

CONCHIE J. et LEVVY G.A., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 345.
(51)

CONCHIE J., LEVVY G.A. et MARSH C.A., Adv. Carb. Chem., 1957, 12, 157.
(195, 303, 319)

CONCHIE J., LEVVY G.A. et MARSH C.A., Unpublished results.
(75)

COXON B. et FLETCHER H.G., J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2637.
(216)

COXON B. et FLETCHER H.G., J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 922.
(217)

CROFTS P.C., MARKES J.H.H. et RYDON H.N., J. Chem. Soc., 1959, 3610.
(454)

DAFT F.S. et COGHILL R.D., J. Biol. Chem., 1931, 99, 213.
(469)

DALE J.K., J. Am. Chem. Soc., 1915, 37, 2745.
(149)

DALE J.K., J. Am. Chem. Soc., 1916, 38, 2187.
(150)

DALE J.K., J. Am. Chem. Soc., 1924, 46, 1046.
(298, 334, 358)

DALE J.K., J. Am. Chem. Soc., 1929, 51, 2788.
(77)

DEREVITSKAYA V.A., VAFINA M.G. et KOCHETKOV N.K., Carbohyd. Res., 1967, 3, 377.
(5, 23, 118, 119, 190, 242, 308, 316, 318, 361, 370, 372, 384, 410, 412, 413, 414, 427, 430, 436, 437, 446, 471)

DURETTE P.L., HORTON D. et BHACCA N.S., Carbohyd. Res., 1969, 10, 565.
(68)

EDWARD J.T., Chem. and Ind., 1955, 1102.
(171)

ERWIG E. et KOENIGS W., Ber., 1889, 22, 1464.
(84)

ERWIG E. et KOENIGS W., Ber., 1889, 22, 2207.
(91)

EVANS W.L., REYNOLDS D.D. et TALLEY E.A., Adv. Carb. Chem., 1951, 6, 27.
(221)

FEIER H. et WESTPHAL O., Chem. Ber., 1956, 89, 589.
(60, 96)

FINDLAY J., LEVVY G.A. et MARSH C.A., Biochem. J., 1958, 69, 467.
(85)

FISCHER E., Ber., 1893, 26, 2400.
(7, 41)

FISCHER E., Ber., 1911, 44, 1903.
(112)

FISCHER E., Ber., 1916, 49, 584.
(94)

FISCHER E. et ARMSTRONG E.F., Ber., 1901, 34, 2885.
(147)

FISCHER E. et BERGMANN M., Ber., 1917, 50, 711.
(182)

FISCHER E. et BERGMANN M., Ber., 1919, 52, 829.
(350)

FISCHER E., BERGMANN M. et RABE A., Ber., Otch. Chem. Ges., 1920, 53, 2362.
(289)

FISCHER E. et OETKER R., Ber., 1913, 46, 4029.
(76, 97)

FISCHER E. et RASKE K., Ber., 1910, 43, 1750.
(178)

FISCHER E. et Von MECHEL L., Ber., 1916, 49, 2813.
(181, 324)

FLETCHER H.G., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 234.
(99)

FLETCHER H.G. et NESS R.K., J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 5337.
(293)

FLOWERS H.M. et JEANLOZ R.W., J. Org. Chem., 1963, 28, 1377.
(62, 267)

FLOWERS H.M. et JEANLOZ R.W., J. Org. Chem., 1963, 28, 1565.
(207)

FLOWERS H.M. et JEANLOZ R.W., J. Org. Chem., 1963, 28, 2983.
(63)

FLOWERS H.M. et JEANLOZ R.W., Biochem., 1964, 3, 121.
(208)

FLOWERS H.M., LEVY A. et SHARON N., Carbohyd. Res., 1967, 4, 189.
(246)

FÖLSCH G., Acta Chem. Scand., 1958, 12, 561.
(457)

FÖLSCH G., Acta Chem. Scand., 1959, 13, 1407.
(460, 463)

FÖLSCH G. et MELLANDER O., Acta Chem. Scand., 1957, 11, 1232.
(29)

FOX J.J. et GOODMAN I., J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 3256.
(145)

FOX J.J., YUNG N., DAVOLL J. et BROWN G.B., J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 2117.
(146)

FRANCHIMONT A.P.N., Ber., 1879, 12, 1938.
(89)

FREUDENBERG K. et SOFF K., Ber., 1936, 69, 1245.
(122)

FRUTON J.S., J. Biol. Chem., 1942, 146, 463.
(11, 455, 476)

GEHRKE et AICHNER, Ber., 1927, 60, 918.
(153)

GOLD V. et JEFFERSON E.G., J. Chem. Soc., 1953, 1409.
(81)

GOLDSCHMID H.R. et PERLIN A.S., Can. J. Chem., 1961, 39, 2025.
(198, 238)

GOLDSTEIN I.J., SMITH F. et SRIVASTAVA H.C., J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 3858.
(196, 235, 325)

GORIN P.A.J. et PERLIN A.S., Can. J. Chem., 1959, 37, 1930.
(120, 264)

GUTTMANN S. et BOISSONNAS R.A., Helv. Chim. Acta, 1958, 41, 1852.
(17, 20, 404)

HARBON S., HERMAN-BOUSSIER G. et CLAUSER H., Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 1279. (442)

HARTLEY F.K. et JEVONS F.R., Biochem. J.,1962, 84, 134.
(443)

HASKIN, HANN et HUDSON, J. Am. Chem. Soc., 1941, 63, 1724.
(220)

HAWORTH W.N., HIRST E.H. et STACEY M., J. Chem. Soc.,1931, 2864.
(291)

HAYNES L.J. et NEWTH F.H., Adv. Carb. Chem., 1955, 10, 207.
(109, 170)

HELFERICH B., BOHN E. et WINKLER S., Ber., 1930, 63, 989.
(218, 232)

HELFERICH B. et BREDERECK H., Ann., 1928, 465, 166.
(183)

HELFERICH B., DEMANT S., GOERDELER J. et BOSSE R., Z. Physiol. Chem., 1948, 283, 179.
(56)

HELFERICH B., DOPPSTADT A. et GOTTSCHLICH A., Naturwissenschaften, 1953, 40, 441. (179, 261)

HELFERICH B. et ILOFF A., Z. Physiol. Chem., 1933, 221, 252.
(327)

HELFERICH B. et JUNG K.H., Ann., 1954, 589, 77.
(204, 247)

HELFERICH B. etKLEIN W., Ann., 1926, 450, 219.
(193, 364)

HELFERICH B., LÖWA A., NIPPE W. et RIEDEL H., Z. Physiol. Chem., 1923, 128, 141.
(351)

HELFERICH B. et SCHMITZ-HILLEBRECHT E., Ber.,1933, 66, 378.
(9, 49, 53)

HELFERICH B. et WEDEMEYER K.F., Ann., 1949, 563, 139.
(215)

HELFERICH B. et WEIS K., Ber., 1956, 89, 314.
(205, 213, 248, 300, 338, 383)

HELFERICH B. et ZIRNER J., Ber., 1962, 95, 2604.
(214)

HERZFELD A., Ber., 1880, 13, 265.
(328)

HORTON D. et WOLFROM M.L., J. Org. Chem., 1962, 27, 1794.
(167)

DSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1915, 37, 1591.
(70)

DSON C.S. et BRAUNS D.H., J. Am. Chem. Soc., 1915, 37, 1283.
(323)

DSON C.S. et DALE J.K., J. Am. Chem. Soc., 1915, 37, 1264.
(74)

DSON C.S. et DALE J.K., J. Am. Chem. Soc., 1918, 40, 992.
(152)

DSON C.S. et JOHNSON J.M., J. Am. Chem. Soc., 1915, 37, 2748.
(69, 329)

DSON C.S. et JOHNSON J.M., J. Am. Chem. Soc., 1916, 38, 1223.
(71, 132)

DSON C.S. et KUNZ A., J. Am. Chem. Soc., 1925, 47, 2052.
(135)

DSON C.S. et PARKER H.O., J. Am. Chem. Soc., 1915, 37, 1589.
(403)

DSON C.S. et SAYRE R., J. Am. Chem. Soc., 1916, 38, 1867.
(151)

RD C.D. et BONNER W.A., J. Org. Chem., 1946, 11, 50.
(58)

OUYE Y., ONODERA K., KITAOKA S. et OCHIAI H., J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 4218. (121)

RVINE J.C., OLDHAM J.W.H. et SKINNER A.F., J. Am. Chem. Soc., 1929, 51, 1279.
(359)

SBELL H.S., Bur. Standards J. Research, 1930, 5, 1179.
(343)

SBELL H.S., Ann. Rev. Biochem., 1943, 12, 215.
(441)

IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature. "Abbreviated Designation of Amino Acids Derivatives and Polypeptides", J. Biol. Chem., 1966, 241, 527.
(448)

IWATA M., Bull. Inst. Physical. Chem. Research, Abstracts (Tokyo) 1929, 2, 27, et Chem. Zentr., 1929, 2, 177.
(335)

JEANLOZ R.W., FLETCHER H.G. et HUDSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 4052.
(126)

JEANLOZ R.W., FLETCHER H.G. et HUDSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 4055.
(127, 362)

JEANLOZ R.W. et STOFFYN P. J., Meth. Carb. Chem., 1962, 1, 221.
(79, 154, 393, 395)

ERMYN M.A., Australian J. Chem., 1954; 7, 202.
(61)

ERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., Biochem. J., 1949, 44, 402.
(420, 426)

ONES E.E. et LIPKIN D., J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 2408.
(16, 27)

ONES J.K.N, PERRY M.B., SHELTON B. et WALTON D.J., Can. J. Chem., 1961, 39, 1005.
(24, 197, 225, 236, 254, 312, 317, 346, 388, 415)

AHLENBERG L., DAVIS D.J. et FOWLER R.E., J. Am. Chem. Soc., 1899, 21, 1.
(270)

ARJALA S. et LINK K.P., J. Am. Chem. Soc., 1940, 62, 917.
(114)

HORANA H.G., Chem. et Ind. London, 1955, 1087.
(451)

HORLIN A.J., BOCHKOV A.F. et KOCHETKOV N.K., Izv. Akad. Nauk SSSR, ser Khim., 1964, 2214.
(302)

HORLIN A.J., BOCHKOV A.F. et KOCHETKOV N.K., Khim. prirodnich soedineniy, 1966, 6.
(306)

OCHETKOV N.K., DEREVITSKAYA V.A., KHORLIN A.J., VAFINA M.G., et BOCHKOV A.F., Izv. Aka. Nauk. SSSR, Ser. Khim., 1965, 1698.
(307, 360, 385)

OCHETKOV N.K., DEREVITSKAYA V.A. et KLIMOV E.M., Tetrahedron Letters, 1969, 54, 4769.
(191, 260, 286)

OCHETKOV N.K., KHORLIN A.J. et BOCHKOV A.F., Tetrahedron Letters, 1964, 289.
(287, 304)

OCHETKOV N.K., KHORLIN A.J. et BOCHKOV A.F., Tetrahedron Letters, 1967, 23, 693. (10, 288, 305, 309, 310)

OENIGS W. et KNORR E., Sitzber. Bayer. Akad. Wiss., 1900, 30, 103.
(65, 184)

OENIGS W. et KNORR E., Ber., 1901, 34, 957.
(8, 66, 175, 185)

ORYTNYK W. et MILLS J.A., J. Chem. Soc., 1959, 636.
(148, 173)

UHN R. et KIRSCHENLOHR W., Chem. Ber., 1953, 86, 1331.
(202, 244, 353)

UHN R. et KIRSCHENLOHR W., Chem. Ber., 1954, 87, 384.
(203)

UHN R. et LÖW I., Ber. 1941, 74, 219.
(440)

KUHN R., ZILLIKEN F. et GAUHE A., Chem. Ber., 1953, 86, 466.
(354)

KUM K., Carbohyd. Res., 1969, 11, 269.
(387)

KUM K. et ROSEMAN S., Biochemistry, 1966, 5, 3061.
(4, 31, 188, 224, 231, 241, 249, 257, 284, 311, 356, 371, 380, 399, 409, 428, 470)

KUNZ A. et HUDSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1926, 48, 1978 et 2435.
(136)

LEABACK, J. Chem. Soc., 1960, 3166.
(321)

LEHMANN J. et BECK D., Ann., 1960, 630, 56.
(206, 252, 265)

LELOIR L.F. et CARDINI C.E., Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20, 33.
(108)

LEMIEUX R.U., Adv. Carb. Chem., 1954, 9, 1
(268)

LEMIEUX R.U., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 221.
(162)

LEMIEUX R.U., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 223.
(141)

LEMIEUX R.U. et BRICE C., Can. J. Chem., 1952, 30, 295.
(142, 172)

LEMIEUX R.U. et BRICE C., Can. J. Chem., 1955, 33, 109.
(294)

LEMIEUX R.U. et CIPERA J.D.T., Can. J. Chem., 1956, 34, 906.
(295)

LEMIEUX R.U. et MORGAN, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 1889.
(177)

LEMIEUX R.U. et SHYLUK W.P., Can. J. Chem., 1953, 31, 528.
(57)

LEVENE P.A., J. Biol. Chem., 1941, 137, 29.
(337)

LEVENE P.A., RAYMOND A.L. et DILLON R.T., J. Biol. Chem., 1932, 95, 699.
(47)

LEVENE P.A. et TIPSON, J. Biol. Chem., 1931, 90, 89.
(111)

LIEBERMANN C. et HÖRMANN O., Ber., 1878, 11, 1618.
(89)

LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1948, 2, 426.
(279)

LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1948, 2, 534.
(280)

LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1949, 3, 1153.
(281)

LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1949, 3, 1355.
(274)

LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1952, 6, 949.
(271)

LINDBERG B. et SILVANDER B.G., Acta Chem. Scand., 1965, 19, 530.
(22, 381)

LLOYD P.F. et ROBERTS G.P., J. Chem. Soc., 1965, 6910.
(105, 176, 375)

LOSSE G. et AUGUSTIN M., Chem. Ber., 1958, 91, 157.
(464)

MASKALERIS M.L., SEVENDAL E.S. et KIBRICK A.C., J. Chromatog., 1966, 23, 403.
(40)

MATTOK et PHILLIPS, J. Chem. Soc., 1958, 130.
(129)

Mc CLOSKEY C.M. et COLEMAN G.H., Org. Syntheses, 1955, 3, 434.
(200)

Mc NEELY W.H., BINKLEY W.W. et WOLFROM M.L., J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, 527.
(373)

MICHEEL F. et LENGSFELD W., Chem. Ber., 1956, 89, 1246.
(339)

MILLER H.K. et WAELSCH H., J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 1092.
(461)

MITCHELL W.A., J. Am. Chem. Soc., 1941, 63, 3534.
(344)

MONSIGNY M., Thèse Doct. Sciences, Lille, 1968
(1, 3, 391, 431, 435, 439, 474)

MONTGOMERY E.M. et HUDSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1934, 56, 2463.
(88)

MONTGOMERY E.M. et HUDSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1937, 59, 992.
(46)

MONTGOMERY E.M., RICHTMYER N.K. et HUDSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1942, 64,690.
(50)

MONTREUIL J., MONSIGNY M. et BUCHET M.T., C.R. Acad. Sci., 1967, 264 D, 2068.
(432, 444, 445)

MOORE J.A., DICE J.R., NICOLAIDES E.D., WESTLAND R.D. et WITTLE E.L., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 2884.
(12)

NESS R.K. et FLETCHER H.G., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 1663.
(292)

NESS R.K., FLETCHER H.G. et HUDSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2200.
(128)

NESS R.K., FLETCHER H.G. et HUDSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 3742.
(80, 299)

NEUMANN H., LEVIN Y., BERGER A. et KATCHALSKI E., Biochem. J., 1959, 73, 33.
(37)

NICHOLAS S.D. et SMITH F., Nature, 1948, 161, 349.
(86, 125, 159)

OHLE, MARELEK et BOURJAU, Ber., 1929, 62, 833.
(398, 402)

OSAWA T. et JEANLOZ R.W., Carbohyd. Res., 1965, 1, 181.
(209)

PACSU E., Ber., 1928, 61, 137.
(95, 278)

PACSU E., Ber.,1928, 61, 1508.
(140, 272)

PACSU E., J. Am. Chem. Soc., 1930, 52, 2563.
(273)

PACSU E., J. Am. Chem. Soc., 1930, 52, 2571.
(336)

PACSU E., Adv. Carb. Chem., 1945, 1, 77.
(67,290)

PACSU E., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 379.
(139)

PACSU E., JANSON J. et LINDBERG B., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 376.
(169)

PACSU E., JANSON J. et LINDBERG B., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 379.
(396, 401)

PAINTER E.P., J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 1137.
(174)

PARK J.T. et JOHNSON M.J., J. Biol. Chem., 1949, 181, 149.
(421)

PARTRIDGE S.M., Biochem. J., 1948,42, 238.
(419, 423, 425)

PURVES C.B. et HUDSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1934, 56, 708.
(44)

RAYMOND A.L. et SCHROEDER E.F., J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 2785.
(42)

REDEMANN C.E. et NIEMANN C., Org. Syntheses, 1942, 22, 1.
(157)

REDEMANN C.E. et NIEMANN C., Org. Syntheses, 1955, 3, 11.
(87)

REEVES R.E. et MAZZERO L.W., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 2219.
(277)

REYNOLDS T.M., J. Chem. Soc., 1933, 223.
(340)

REYNOLDS D.D., Ph. D. Dissertation, The Ohio State University, Columbus, Ohio, 1939, p. 19.
(365)

REYNOLDS D.D. et EVANS W.L., J. Am. Chem. Soc., 1938, 60, 2559.
(194, 219, 233, 253)

RICHTMYER N.K. et HUDSON C.S., J. Am. Chem. Soc., 1935, 57, 1716.
(137)

RILEY G., TURNBULL J.H. et WILSON W., J. Chem. Soc., 1957, 1373.
(19, 32)

RIMINGTON C., Biochem. J., 1931, 25, 1062, et 1940, 34, 931.
(418)

ROBBINS P.W., KELLER J.M., WRIGHT A. et BERNSTEIN R.L., J. Biol. Chem., 1965, 240, 384.
(376)

ROSEMAN S. et DAFFNER I., Ann. Chem., 1956, 28, 1743.
(424)

RÜDE E. et MEYER-DELIUS M., Carbohyd. Res., 1968, 8, 219.
(6, 103, 123, 212, 251, 285, 315, 357, 368, 382, 411, 472)

RÜDE E., WESTPHAL O., HURWITZ E., FUCHS S. et SELA M., Immunochemistry. Pergamon Press, 1966, 3, 137.
(116, 189, 210, 250, 314, 386)

RYAN H., J. Chem. Soc., 1899, 75, 1055.
(164)

SANGER F., Biochem. J., 1945, 39, 507.
(422)

SARIN P.S. et FASMAN G.D., Biochim. Biophys. Acta, 82, 175,1964.
(33)

SCHELLENBERG P., Angew Chem., 1962, 74, 118.
(39)

SCHEURER P.G. et SMITH F., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 3224.
(160)

SCHLUBACH H.H. et SCHRÖTER G.A., Ber., 1928, 61, 1216.
(107, 180)

SCHLUBACH H.H. et WAGENITZ E., Z. Physiol. Chem., 1932, 213, 87.
(124)

SCHWYSER R., Helv. Chim. Acta, 1961, 44, 1136.
(447)

SHAPIRO D., ACHER A.J. et RACHAMAN E.S., J. Org. Chem., 1967, 32, 3767.
(102)

SHEEHAN J.C., et HESS G.P., J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 1067.
(449)

SHEEHAN J.C., GOODMAN M. et HESS G.P., J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 1367.
(450)

SHULZ M. et STEINMAUS H., Zeitschrift für Naturforschung, 1964, 196, 263.
(301)

SKINNER C.G., Mc CORD T.J., RAVEL J.M. et SHIVE W., J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 2412.
(14, 28)

SKRAUP Z.H., Monatsh., 1901, 22, 375.
(110)

SKRAUP Z.H. et KÖNIG J., Ber., 1901, 34, 1115.
(326)

SKRAUP Z.H. et KREMANN R., Monatsh., 1901, 22, 375.
(131, 144)

SMITH E.L. et BERGMANN M., J. Biol. Chem., 1944, 153, 627.
(416)

SOKOLOVSKY M., SADEH T. et PATCHORNIK A., J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 1212.
(433)

SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1966, 263 D, 893.
(2)

SPIRO R.G., Feder. Proc., 1966, 25, 409 et 1967, 26, 607, et J. Biol. Chem., 1967, 242, 1923 et 1967, 242, 4813.
(429)

TALLEY E.A., REYNOLDS D.D. et EVANS W.L., J. Am. Chem. Soc., 1943, 65, 575.
(237)

TANRET C., Bull. Soc. Chim., 1895, 13, 261.
(92)

THEODOROPOULOS D. et GAZOPOULOS J., J. Org. Chem., 1962, 27, 2091.
(456, 477)

THOMPSON A. et WOLFROM M.L., J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 3605.
(341)

THOMPSON A., WOLFROM M.L. et PACSU E., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 215.
(320)

TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 215, 36.
(417)

TSOU K.C. et SELIGMAN A.M., J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 3066.
(352)

VERCELLOTTI J.R. et LUETZOW A.E., J. Org. Chem., 1966, 31, 825.
(168, 211, 245, 389)

Von ARLT F., Monatsh., 1901, 22, 144.
(130)

Von CHARANTE M., Rec. trav. Chim., 1902, 21, 42.
(165)

WELTZIEN W. et SINGER R., Ann., 1925, 443, 71.
(342)

WERRIES E. et BUDDECKE E., Hoppe-Seyler's Z-Physiol. Chem., 1970, 351, 1089.
(392, 475)

WEYGAND F., Meth. Carb. Chem., 1962, 1, 182.
(161)

WIELAND T. et BAUER L., Angew Chem., 1951, 63, 511.
(35)

WIELAND T. et HEINKE B., Liebigs Ann. Chem., 1958, 193, 615.
(36)

WOLFROM M.L., GEORGES L.W. et MILLER I.L., J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 125.
(348)

WOLFROM M.L. et LINEBACK D.R., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 341.
(192, 374)

WOLFROM M.L., Mc WAIN P., PAGNUCCO R. et THOMPSON A., J. Org. Chem., 1964, 29, 454. (297)

WOLFROM M.L., PITTET A.O. et GILLAM I.C., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.,1961, 47, 700.
(223, 228, 256)

WOLFROM M.L. et THOMPSON A., Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 211.
(72, 83, 93)

WOLFROM M.L. et WEISBLAT D.I., J. Am. Chem. Soc., 1944, 66, 805.
(296)

WULFF G., RÖHLE G. et KRÜGER W., Angew. Chem., 1970, 9, 455.
(201, 258)

WÜNSCH E. et FONTANA A., Chem. Ber., 1968, 101, 323.
(466)

WÜNSCH E. et JENTSCH J., Chem. Ber., 1964, 97, 2490.
(405)

ZAHN H. et DIEHL J.F., Z. Naturforschg., 1957, 12 b, 85.
(458, 462)

ZEMPLÉN G., Ber., 1926, 59, 1254.
(330)

ZEMPLÉN G., Ber., 1929, 62, 985.
(64)

ZEMPLÉN G. et GERECS A., Ber., 1930, 63, 2720.
(243)

ZEMPLÉN G., GERECS A. et HADÁCSY I., Ber., 1936, 69, 1827.
(332)

ZEMPLÉN G. et KUNZ A., Ber., 1923, 56, 1705.
(331)

ZEMPLÉN G. et PACSU E., Ber., 1929, 62, 1613.
(333)

ZERVAS L., BOROVAS D. et GAZIS E., J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 3660.
(465, 468)

ZERVAS L. et HAMALIDIS C., J. Am. Chem. Soc., 1965, 87, 99.
(467)

ZERVAS L., WINITZ M. et GREENSTEIN J.P., J. Org. Chem., 1957, 22, 1515.
(452, 453)

ZERVAS L. et KONSTAS S., Ber., 1960, 93, 435.
(104, 106)

SMITH F. et VAN CLEVE J.W., J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 3159.
(43)

APPENDICE TECHNIQUE

I - PREPARATION OU PURIFICATION DES SOLVANTS ET DES MATIERES PREMIERES

A) Ether sans peroxyde

1 litre d'éther est maintenu à l'ébullition à reflux en présence de 100 g de chlorure stanneux, pendant 60 mn. Il est ensuite distillé, recueilli et conservé dans des flacons de verre brun, sur du sulfate ferreux.

B) Méthanol anhydre

Le méthanol employé dans les réactions d'estérification (p.75) est déshydraté de la manière suivante :

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

C) Pyridine sèche

La pyridine est chauffée à reflux, pendans 4 h, sur de la baryte anhydre. Elle est ensuite distillée en atmosphère anhydre et conservée sur sulfate de calcium anhydre.

D) 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 à 20 g p. 100 ml, 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 emploi.

E) Benzène anhydre

Le benzène commercial est purifié selon la technique de PICHAT et CLEMENT (1). Il est d'abord agité, pendant quelques minutes, avec le cinquième de son volume d'une solution obtenue en dissolvant 50 g d'oxyde mercurique jaune dans 1 litre d'une solution diluée d'acide sulfurique (200 ml d'acide sulfurique p. 1000 ml d'eau). La phase benzénique est ensuite distillée.

F) Carbonate d'argent

Le carbonate d'argent utilisé dans les réactions de condensation de KOENIGS et KNORR (p. 23) est préparé extemporanément, à l'obscurité, suivant le procédé de WOLFROM et LINEBACK (2) :

Une solution de 16 g de carbonate de sodium anhydre pur R.P. dans 75 ml d'eau distillée est ajoutée goutte à goutte, sous agitation constante à une solution de 80 g de nitrate d'argent pur R.P. dans 200 ml d'eau distillée On verse ensuite, en trois fractions, dans le mélange, une solution de 10 g de bicarbonate de sodium pur R.P. dans 125 ml d'eau distillée. Le précipité jaune de carbonate d'argent est recueilli par filtration sur verre fritté n° 4 et lavé 12 à 15 fois à l'eau distillée, en prenant soin de le remettre chaque fois en suspension homogène. Il est enfin lavé deux fois à l'éther et séché sous vide, en présence de chlorure de calcium anhydre à l'abri de la lumière. Rendement : 60 à 65 g.

G) Méthanol ammoniacal

Le passage d'un ester à un amide (p. 75) est réalisé dans une solution méthanolique d'ammoniac préparée en faisant barbotter dans du méthanol anhydre de l'ammoniac obtenu par action d'une solution de soude sur une solution saturée de sulfate d'ammonium et séché sur une colonne d'oxyde de calcium, de chaux sodée et de sulfate de calcium.

H) Butylamine anhydre

La n-butylamine est chauffée à reflux, pendant plusieurs jours, sur des pastilles de potasse. La potasse est renouvelée de temps en temps. La n-butylamine est ensuite distillée en atmosphère anhydre et conservée dans un flacon bien bouché à - 20°C.

I) Solution d'acide bromhydrique dans l'acide acétique glacial

La synthèse de dérivés acétobromés est réalisée en faisant agir une solution d'acide acétique glacial saturée en acide bromhydrique sur le dérivé peracétylé (p. 39).

On fait barbotter dans un mélange acide acétique/anhydride acétique (95:5) (v:v) de l'acide bromhydrique obtenu par l'action du brome sur de la tétraline (tétrahydronaphtalène) et séché sur colonne de sulfate de calcium. La saturation est d'abord réalisée à la température du laboratoire afin d'éviter la solidification de l'acide acétique. La saturation est achevée à 0°C.

J) Méthanolate de sodium

Le méthanolate de sodium utilisé dans les réactions de O-désacétylation (p. 53) est préparé en dissolvant des copeaux de sodium dans du méthanol anhydre. La solution est ensuite titrée en retour par acidimétrie et ajustée à 0,4 N par addition de méthanol anhydre.

II - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES

A) Chromatographie sur couche mince

1) Préparation des plaques

A 30 g de silicagel G (MERCK), on ajoute 55 ml d'eau et 10 ml d'éthanol absolu. 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 ainsi préparées sont utilisables après élimination de l'excès de solvant (eau et alcool) soit par séchage à 20°C pendant 24 h, soit par séchage à 100°C pendant 30 mn.

2) Systèmes-solvants

La chromatographie est effectuée dans des cuves en verre à base rectangulaire (8x22 cm) contenant 100 ml de l'un des systèmes-solvants spécifiques de chacune des applications suivantes :

a) Analyse du peracétylgalactose et de l'acétobromogalactose

- Benzène/méthanol/chloroforme (85:8:7)
- Ether de pétrole (60-80°)/acétate d'éthyle (3:2)

b) Analyse de la N-benzyloxycarbonyl-sérine et de son ester benzylique

- n-butanol/acide acétique/pyridine/eau (15:3:10:2) (EHRHARDT et CRAMER) (3).
- Ether de pétrole (60-80°)/acétate d'éthyle (3:2).

c) Analyse du O-acétyl-galactoside de l'ester benzylique de la N-benzyloxycarbonyl-sérine

- Benzène/méthanol/chloroforme (85:8:7).

3) Révélations

a) Réactif général : 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 p. 100 (v:v), suivie d'un chauffage à 120°C, pendant 0,5 h ou à 100°C pendant 2 ou 3 h.

b) Révélation des esters par l'hydroxylamine : Nous avons appliqué pour révéler les fonctions esters le procédé de TATE et BISHOP (4) :

Les chromatogrammes en couche mince sont d'abord imprégnés d'un réactif obtenu en mélangeant, à parties égales, une solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine à 10 g/100 ml et une solution de soude 5N. Après un séjour de 10 mn à 100-110°C, les hydroxamates formés sont mis en évidence, sous la forme de taches noir-violacé, par pulvérisation d'une solution obtenue en mélangeant 6 ml d'acide chlorhydrique concentré et 45 ml d'une solution ferrique (nitrate ferrique à 9 H_2O : 40 g, eau distillée : 600 ml, acide acétique glacial : 400 ml).

B) Chromatographie et électrophorèse sur papier

Les composés hydrophiles ont été analysés par chromatographie descendante sur papier WHATMAN n° 1 ou par électrophorèse en cuve en toit sur papier ARCHES 304.

1) Systèmes-solvants

- Phase supérieure du système-solvant biphasique de PARTRIDGE (5) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

- Phase supérieure du système-solvant biphasique de JERMYN et ISHERWOOD (6) : pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2).

2) Solution-tampon

Nous avons utilisé le système tampon suivant :

pH 2,4 : acide acétique/eau (6:94).

3) Révélation

a) Révélation des amines par la ninhydrine

Le réactif (solution à 1g de ninhydrine dans 990 ml de n-butanol

et 10 ml d'acide acétique) est finement pulvérisé sur le support chromatographique (papier ou couche mince) ou électrophorétique 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 ou les électrophorégrammes, on pulvérise le réactif de KAWERAU (7) obtenu en mélangeant 1 ml de solution aqueuse saturée de nitrate cuivrique, 0,2 ml d'acide nitrique à 10 p. 100 dans l'eau, et 500 ml d'éthanol absolu ; les taches rouge - violacé virent au rouge brique, par formation d'oxyde cuivreux, inaltérable.

b) Révélation des oses par l'oxalate d'aniline

Les chromatogrammes ou électrophorégrammes sont imprégnés du réactif obtenu en mélangeant :

- 2 vol. d'une solution éthanolique d'aniline à 2 p. 100 (v:v),
- 3 vol. d'une solution aqueuse d'acide oxalique à 25 p. 1000 (p:v),

et chauffés à l'étude à 105°C pendant 2 à 20 mn.

Les oses donnent des colorations spécifiques, brunes dans le cas des aldohexoses et des N-acétyl-osamines, roses dans le cas des pentoses (PARTRIDGE) (8).

c) Révélation des oses par le réactif à l'acide periodique-benzidine

Les oses, après chromatographie ou électrophorèse, sont révélés selon le procédé de MONTGOMERY et WU (9). Le papier est trempé, rapidement, dans une solution acétonique d'acide periodique fraîchement préparée (107 mg de métaperiodate de sodium + 1 ml AcOH glacial + 5 ml H_2O + 94 ml d'acétone). Après cinq minutes exactement de séchage à la température de la pièce, le papier est trempé dans une solution préparée de façon extemporanée de benzidine dans l'acétone (0,15 g p. 100 ml). L'emplacement des α-glycols est révélé par une tache blanche sur un fond uniformément bleu.

III - BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE

EHRHARDT E. et CRAMER F., J. Chromatog., 1962, 7, 405. (3)

JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., Biochem. J., 1949, 44, 402. (6)

KAWERAU E. et WIELAND T., Nature, 1951, 168, 77. (7)

MONTGOMERY R. et WU Y.C., J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547. (9)

PARTRIDGE S.M., Biochem. J., 1948, 42, 238. (5)

PARTRIDGE S.M., Biochemical Society Symposia 3, 52, Cambridge University Press éd., London, 1949. (8)

PICHAT L. et CLEMENT, Bull. Soc. Chim., 1961, 524. (1)

TATE M.E. et BISHOP C.T., Can. J. Chem., 1962, 40, 1043. (4)

WOLFROM M.L. et LINEBACK D.R., Meth. Carb. Chem., 1962, 2, 342. (2)

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE SECTION DE SCIENCES LILLE

Nunc est bibendum

(Horace, Ode, I, 37, 1)

Paulo majora canamus

(Virgile, Eglogues,IV,1)