

SYNTHÈSE DU
2-AMINO-3-O-(L-1-CARBOXYÉTHYL)-2-DÉSOXY-D-GLUCOSE
(ACIDE ISOMURAMIQUE) ET DE SES DÉRIVÉS*†

J.-M. PETIT‡ ET P. SINAY‡

Laboratoire de Chimie des Composés Biologiques, Faculté des Sciences, 91-Orsay (France)

E. WALKER, D. A. JEANLOZ ET R. W. JEANLOZ§

Laboratory for Carbohydrate Research, Departments of Biological Chemistry and Medicine, Harvard Medical School and Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114 (U S A)

(Reçu le 13 mars 1972; accepté sous forme modifiée le 19 juin 1972)

ABSTRACT

2-Amino-3-O-(L-1-carboxyethyl)-2-deoxy-D-glucose (isomuramic acid), an isomer of muramic acid, and its *N*-acetyl derivative have been synthesized from benzyl 2-acetamido-4,6-O-benzylidene-2-deoxy- α - and β -D-glucopyranoside by condensation with D-2-chloropropionic acid, followed by removal of the protective groups. *N*-Acetylisomuramic acid can be differentiated from its D-1-carboxyethyl isomer (*N*-acetylmuramic acid) by chromatography and by the circular dichroism spectrum of the internal ester of the methyl α -D-glycopyranosides.

SOMMAIRE

Le 2-amino-3-O-(L-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-D-glucose (acide isomuramique), isomère de l'acide muramique, et son dérivé *N*-acétylé ont été synthétisés à partir du benzyl 2-acétamido-4,6-O-benzylidène-2-désoxy- α - et β -D-glucopyranoside par condensation de ces dérivés avec l'acide D-2-chloropropionique puis scission des groupes protecteurs. L'acide *N*-acétylisomuramique se différencie de son isomère D-1-carboxyéthyle (acide *N*-acétylmuramique) par chromatographie et par le spectre de dichroïsme circulaire de l'ester interne des méthyl α -D-glycopyranosides.

*Dédié au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65ème anniversaire

†Sucres amines LXXXI. Cette publication porte le no 581 du Lovett Group for the Study of Diseases Causing Deformities, Harvard Medical School at Massachusetts General Hospital, Boston. Ce travail a bénéficié de l'aide de subventions de la Fondation pour la Recherche Médicale Française et du National Institute for Allergy and Immunology, National Institutes of Health, U S Public Health Service (Grant AI-06692)

‡Adresse actuelle. Laboratoire de Biochimie Structurale, Faculté des Sciences, 45-Orléans 02 (France)

§Auquel doivent être adressées les demandes de tirés-à-part.

INTRODUCTION

Lors de la condensation d'un dérivé convenablement protégé du 2-amino-2-désoxy-D-glucose avec un acide D,L-2-halogénopropionique, il se forme, en plus du 2-amino-3-O-(D-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-D-glucose (acide muramique), une quantité plus ou moins importante de son isomère L-1-carboxyéthyle (acide isomuramique)¹. La séparation des deux composés a été réalisée par plusieurs procédés. Strange et Kent², Gigg et Carroll³, puis Osawa et Jeanloz⁴ tirent parti de la faible solubilité des dérivés protégés de l'acide isomuramique dans les solvants organiques. Les premiers obtinrent ainsi pour la première fois l'acide isomuramique. Des séparations chromatographiques ont également été effectuées, soit sur le mélange acide muramique-acide isomuramique², soit sur le mélange des benzyl-⁴ et des méthyl-glycosides⁵. Enfin, la séparation des deux isomères peut s'effectuer par cristallisation fractionnée en utilisant leurs sels de S-benzylthiouronium³ ou de (+)-(1R, 2S)-2-amino-1-[4-(méthylthio)phényl]-1,3-propanediol⁶.

L'emploi, pour la condensation, d'acide D-2-chloropropionique a permis à Matsushima et Park⁷ d'obtenir directement un dérivé de l'acide isomuramique optiquement pur, ce qui évite toute séparation. Mais l'emploi de méthyl- ou d'éthyl-glycosides ne leur a pas permis l'obtention directe de l'acide N-acétylisomuramique.

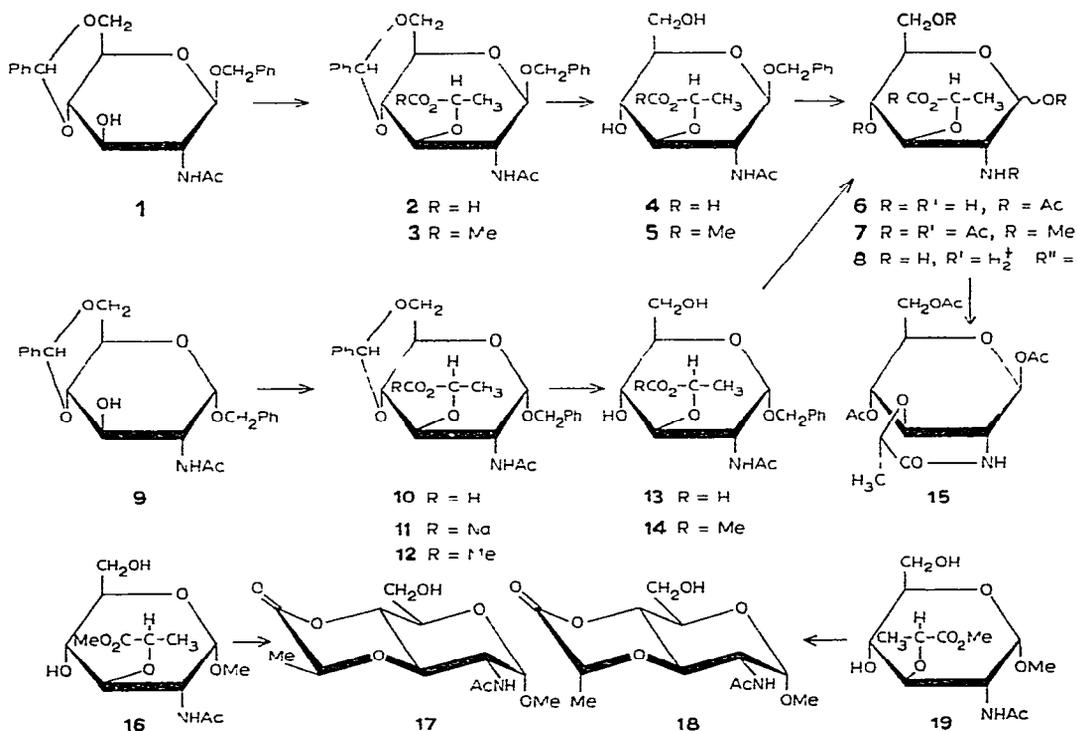
Vu la présence de l'acide N-acétylmuramique dans toutes les parois bactériennes⁸, il est possible que l'acide N-acétylisomuramique ou l'un de ses dérivés puisse avoir une action inhibitrice sur la biosynthèse de cette paroi et ceci nous a incités à étudier plus en détail leurs synthèses. La découverte récente d'isomères de l'acide muramique dans les parois bactériennes⁹ a été également une raison d'étudier la séparation qualitative des acides muramique et isomuramique et la caractérisation de ce dernier.

DISCUSSION

La synthèse du 2-amino-3-O-(L-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-D-glucose (acide isomuramique, 8) a été effectuée par l'intermédiaire du dérivé N-acétylé 6, lui-même obtenu à partir des benzyl- β -D- et α -D-glycosides 1 et 9. Cette route a ainsi permis de préparer 6 dans des conditions très douces d'hydrogénolyse et d'éviter toute isomérisation du résidu lactyle.

L'acide D-2-chloropropionique optiquement pur a été préparé selon la méthode de Sinay *et al*¹⁰. Il a été condensé, selon Flowers et Jeanloz¹¹, avec le benzyl-2-acétamido-4,6-O-benzylidène-2-désoxy- β -D-glucopyranoside¹² (1) préparé de façon commode selon Parquet et Sinay¹³. L'acide cristallin 2 obtenu fut caractérisé par un ester méthylique cristallin 3, et la scission du groupe benzylidène de 2 a donné l'acide cristallin 4, également caractérisé par un ester méthylique cristallin 5. Une même série de réactions sur l'anomère α -D a donné les composés cristallins 10, 11, 12, 13 et 14. Les composés 4 et 13 présentent un double point de fusion par suite de la formation, par chauffage, d'un ester interne entre le groupement carboxylique de la

chaîne lactyle et l'hydroxyle en position 4 Un tel comportement a déjà été constaté en série isomuramique^{5,7} ainsi qu'en série isogalactomuramique¹⁴. L'acide *N*-acétyl-isomuramique (6), préparé par hydrogénation catalytique des dérivés cristallisés 4 ou 13, a été obtenu sous forme d'un sirop chromatographiquement pur, mais n'a pu être cristallisé La valeur de son pouvoir rotatoire est en accord avec celle mesurée à l'équilibre mutarotationnel par Gigg et Warren¹⁵ Son comportement chromatographique sur papier est nettement différent de celui de l'acide *N*-acétylmuramique, ce qui permet de contrôler une éventuelle contamination mutuelle de ces composés Ces deux composés se différencient également très nettement par la chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés per(triméthylsilyl)és L'acide *N*-acétylisomuramique 6 a été caractérisé par l'obtention, sous forme cristalline, d'un mélange anomérique des acétates 7



L'hydrolyse de l'acide *N*-acétylisomuramique 6 a donné le 2-amino-3-*O*-(*L*-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-D-glucose (acide isomuramique, 8) chromatographiquement pur, mais qui n'a pu être cristallisé Par acétylation, au moyen d'anhydride acétique dans la pyridine, la morpholinone 15 a été isolée à l'état cristallin La formation d'une morpholinone par acétylation, dans les mêmes conditions, de l'acide muramique a déjà été observée¹⁶ Le composé 15 possède la configuration β -D, ainsi que le suggère la faible valeur du pouvoir rotatoire, de plus, le spectre de résonance magnétique

nucléaire montre clairement une constante de couplage de 8 Hz pour le proton anomère et H-2, les autres valeurs des constantes montrant que le cycle glucopyranosique adopte, tout au moins approximativement, la forme 4C_1 . Enfin, la structure de **15** a été établie sans ambiguïté par une synthèse indépendante à partir de l'amide interne de l'acide isomuramique¹⁷

La configuration D de la chaîne latérale lactyle de l'acide muramique semble établie avec certitude¹⁸⁻²⁰. D'autre part, les différents dérivés de l'acide isomuramique, qu'ils aient la configuration anomérique α ou β , ont été comparés à leurs homologues muramiques antérieurement décrits^{4, 11, 21}; il a été alors constaté que leurs comportements chromatographiques sont nettement différents (couche mince de gel de silice pour **2**, **3**, **4**, **5**, **10**, **12** et **14**, papier Whatman pour **6** et **8**). En particulier les composés **2** et **10** présentent, lors d'une chromatographie sur couche mince de gel de silice dans divers solvants, une migration plus faible que leurs homologues en série muramique. Ce fait a permis de vérifier que, dans les conditions de la réaction de condensation initiale, aucune épimérisation de la chaîne lactyle ne se produisait. Elle peut par contre avoir lieu lors d'un traitement basique très fort et prolongé²². Il en résulte que la configuration L de la chaîne lactyle des dérivés ici décrits peut être tenue pour certaine. À condition que les pouvoirs rotatoires soient mesurés dans le méthanol ou le chloroforme, on constate que les dérivés de la série D-1-carboxyéthyle sont plus dextrorotatoires que les dérivés correspondants de la série L-1-carboxyéthyle. Des écarts à cette règle peuvent se produire lorsque le pouvoir rotatoire est mesuré dans la pyridine¹⁴ ou la *N,N*-diméthylformamide, ainsi que le montre une comparaison avec les benzyl- α -D- et β -D-glycosides de la série D-1-carboxyéthyle^{11, 21} (Tableau I)

TABLEAU I

COMPARAISON DES POUVOIRS ROTATOIRES SPECIFIQUES DES BENZYL 2-ACÉTAMIDO-3-O-(D- ET L-1-CARBOXYÉTHYL)-2-DESOXY- α - ET β -D-GLUCOPYRANOSIDES ET DE LEURS DÉRIVÉS^a

Dérivés	α -D		β -D	
	D-1 ^b	L-1	D-1 ^c	L-1
Ester méthylique	+168 (MeOH)	+86 (MeOH)	-36 (MeOH)	-86 (MeOH)
4,6-O-Benzylidene	+137 (CHCl ₃)	+90 (MeOH)	-53 (CHCl ₃)	-83 (MeOH)
4,6-O-Benzylidene, ester méthylique	+115 (MeOH)	+79 (MeOH)	-76 (Py)	-68 (DMF)
	+94 (CHCl ₃)	+62 (CHCl ₃)	-51 (CHCl ₃)	-77 (CHCl ₃ - MeOH, 1/1)

^aPouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$ en degrés, solvant entre parenthèses: pyridine (Py), *N,N*-diméthylformamide (DMF) ^bRéf 11 ^cRéf 21

Afin de caractériser et différencier les deux séries sur des quantités minimales de matériel, les deux esters internes **17** et **18** furent préparés à partir des méthyl esters méthyl- α -D-glycosides **16** et **19** précédemment décrits^{21, 23}. La scission par le gaz chlorhydrique dans le méthanol de polymères contenant l'acide muramique donne

exclusivement l'anomère α -D^{9,10} et la saponification de l'ester méthylique suivie de séchage à haute température fournit l'ester interne correspondant. Ces esters internes montrent un effet Cotton très important dans la région 230–240 nm et il est ainsi possible de caractériser et de différencier très nettement les deux esters internes 17 et

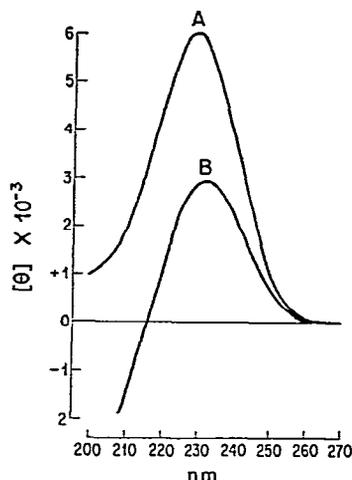


Fig 1 Courbes de dichroïsme circulaire des composés 17 et 18 enregistrées à l'aide d'un spectropolarimètre Cary 60 muni d'un accessoire pour dichroïsme circulaire Cary. Les mesures ont été effectuées dans l'acétonitrile à 23°

18 par leurs courbes de dichroïsme circulaire (Fig 1). Les deux esters se différencient également nettement par leur comportement en présence d'eau, l'ester isomuramique 17 prenant plus d'une semaine⁵ pour donner l'acide libre correspondant, alors que l'ester muramique 18 prend moins de 5 min.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Conditions générales — Les points de fusion sont mesurés à l'aide d'un appareil Mettler FP-2. Les pouvoirs rotatoires sont déterminés au moyen d'un polarimètre Perkin-Elmer (Modèle 141). Les spectres sont enregistrés avec les appareils suivants : spectrophotomètre Perkin-Elmer (Modèles 457 et 237) pour l'infrarouge, spectromètre Bruker 90 (90 MHz) pour la r m n. L'homogénéité des composés préparés est contrôlée par chromatographie sur des plaques recouvertes de gel de silice Merck (épaisseur 0,25 mm) et révélées par vaporisation d'une solution alcoolique à 10 % d'acide sulfurique concentré et chauffage. Les évaporations s'effectuent sous pression réduite, la température du bain-marie étant maintenue au-dessous de 45°. Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Dr M. Manser (Zurich, Suisse) et par le Service Central de Micro-analyse du C N R S (Thiais, France).

Benzyl-2-acétamido-4,6-O-benzylidène-3-O-(L-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-β-D-glucopyranoside (2) — Le benzyl-2-acétamido-4,6-O-benzylidène-2-désoxy-β-D-gluco-

pyranoside (1, 6,4 g) sec est dissous à 90° sous agitation mécanique dans du *p*-dioxanne (400 ml) anhydre en l'absence d'humidité. Après refroidissement à 70°, on ajoute par petites portions l'hydrure de sodium en suspension huileuse (3,6 g, 50 % p/p d'hydrure de sodium). Le mélange est maintenu pendant 1 h à 95° puis la température est abaissée à 65° et une solution d'acide D-2-chloropropionique (9 g) dans le *p*-dioxanne anhydre est alors ajoutée. L'acide D-2-chloropropionique a été préparé selon une modification¹⁰ de la méthode de Fischer et Raske²⁴ décrite pour l'acide D-2-bromopropionique. Après 1 h on procède à une nouvelle addition d'une suspension à 50 % d'hydrure de sodium (14,8 g) et l'agitation mécanique est poursuivie pendant une nuit à 65°. Au mélange réactionnel refroidi on ajoute avec précaution de l'eau (200 ml) afin de décomposer l'excès d'hydrure de sodium. La couche inférieure, alcaline et fortement colorée, est éliminée, et la couche supérieure est décantée, filtrée, le *p*-dioxanne en étant éliminé par distillation. De l'eau (100 ml) est ajoutée à la solution résiduelle, et cette solution aqueuse est extraite une fois par le chloroforme (50 ml) afin d'éliminer l'huile minérale et toute trace de produit de départ n'ayant pas réagi; elle est alors acidifiée à 0° par de l'acide chlorhydrique 2,5M jusqu'à pH 3. Le précipité formé, immédiatement filtré, lavé à l'eau glacée et séché, fournit le composé 2 pur (6,75 g, 89,5%), p f 286–289°; $[\alpha]_D^{20} -68^\circ$ (*c* 0,16, *N,N*-diméthylformamide); spectre i r. $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 3290 (NH), 1710 (CO₂⁻), 1650 (Amide I), 1560 cm⁻¹ (Amide II). L'échantillon analytique a été préparé par recristallisation à partir de *N,N*-diméthylformamide.

Anal. Calc. pour C₂₅H₂₉NO₈ C, 63,68; H, 6,20, N, 2,97, O, 27,15. Trouvé C, 63,45, H, 6,27, N, 3,05; O, 27,27.

Benzyl-2-acétamido-4,6-O-benzylidène-2-désoxy-3-O-[L-1-(méthoxycarbonyl)éthyl]-β-D-glucopyranoside (3) — Le composé 2 (50 mg) est dissous dans du méthanol (150 ml) et estérifié par addition d'un léger excès de diazométhane en solution étherée. Par évaporation de la solution et cristallisation du résidu à partir de méthanol-chloroforme-éther on obtient 3 sous forme de plaques brillantes (45 mg, 87%), p f. 287–288°, $[\alpha]_D^{20} -77^\circ$ (*c* 0,43, chloroforme-méthanol, 1 l, v/v), spectre i r $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 3290 (NH), 1745 (CO₂Me), 1650 (Amide I), 1560 cm⁻¹ (Amide II).

Anal. Calc. pour C₂₆H₃₁NO₈ C, 64,31, H, 6,44, N, 2,89. Trouvé C, 64,31, H, 6,45; N, 2,35.

Benzyl-2-acétamido-3-O-(L-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-β-D-glucopyranoside (4) — Une suspension du composé 2 (2,4 g) dans l'acide acétique 60 % (82 ml) est chauffée pendant 1,5 h au bain-marie à 100°. Après refroidissement à température ambiante, la solution est évaporée, les dernières traces de benzaldéhyde et d'acide acétique étant éliminées par des additions répétées d'eau suivies d'évaporations. Le résidu cristallisé à partir de méthanol-acétate d'éthyle-éther donne le composé 4 (1,05 g, 54 %) sous forme de cristaux sphériques, p f. 193–195°, réarrangement en aiguilles fondant à 240–242°, $[\alpha]_D^{20} -86^\circ$ (*c* 0,21, méthanol), spectre i r $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 3300 (NH), 1710 (CO₂), 1650 (Amide I), 1560 cm⁻¹ (Amide II).

Anal. Calc. pour C₁₈H₂₅NO₈ C, 56,39; H, 6,57, N, 3,65. Trouvé : C, 56,43, H, 6,69, N, 3,75.

Benzyl-2-acétamido-2-desoxy-3-O-[L-1-(methoxycarbonyl)éthyl]-β-D-glucopyranoside (5) — Le composé **4** (80 mg) est dissous dans le méthanol et un léger excès d'une solution étherée de diazométhane fraîchement préparée est ajouté. Après évaporation du solvant le résidu, cristallisé à partir d'acétate d'éthyle-méthanol, fournit **5** (63 mg, 76%), p f 183–185°, réarrangement en aiguilles fondant à 241–242°, $[\alpha]_D^{20} -83^\circ$ (c 0,42, méthanol), spectre i r $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 3400 (OH), 3290 (NH), 1735 (CO₂Me), 1650 (Amide I), 1550 cm⁻¹ (Amide II)

Anal Calc pour C₁₉H₂₇NO₈ C, 57,42, H, 6,85, N, 3,52 Trouve C, 57,33, H, 6,70, N, 3,76

2-Acétamido-3-O-(L-1-carboxyéthyl)-2-desoxy-D-glucose (acide N-acetylisomuramique) (6) — Une solution du composé **4** (1 g) dans de l'éthanol 95% (236 ml) est soumise à l'hydrogénolyse pendant 3 jours à température ambiante et pression atmosphérique en présence de palladium sur charbon 10% (200 mg). La suspension est alors filtrée plusieurs fois et le filtrat est évaporé (température du bain ≤ 30°), le résidu sirupeux incolore (680 mg, 89%), qui présente une seule tache en c c m sur silica gel (alcool butylique-acétone-eau, 4 5 1, v/v), n'a pu être cristallisé, $[\alpha]_D^{20} -26^\circ$ (c 1,4, méthanol-eau, 9 1, v/v), spectre i r $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 1720 (CO₂⁻), 1650 (Amide I), 1550 cm⁻¹ (Amide II). Le produit est également homogène en chromatographie descendante sur papier Whatman no 1 R_{GNAc} 0,63 dans alcool butylique-pyridine-eau (6 4 3, v/v), les taches sont détectées par le reactif au nitrate d'argent²⁵ et le procédé de Sharon et Seifter²⁶. Le dérivé per(triméthylsilyl)é de **6** se différencie du dérivé analogue du 2-acétamido-3-O-(D-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-D-glucose (acide N-acétylmuramique) par chromatographie en phase gazeuse effectuée sur chromatographe Perkin-Elmer (Modèle 900), sur colonne de SE-30 3% de 2,5 m, avec un programme de 5° par min et une température d'injection de 120°. T_p du dérivé de **6** 20,7 min, T_R du dérivé de l'acide N-acétylmuramique 19,2 min

Anal Calc pour C₁₁H₁₉NO₈ C, 45,05 H, 6,53 N, 4,78 Trouve C, 44,78 H, 6,66, N, 4,51

2-Acétamido-1,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[L-1-(methoxycarbonyl)éthyl]-β-D-glucopyranoside (7) — Le composé **6** (36 mg) en solution dans le méthanol est rapidement esterifié par le diazométhane en solution étherée. La fin de la réaction est vérifiée par c c m (méthanol-chloroforme). Après évaporation de la solution, le résidu est dissous dans la pyridine (4,5 ml) et on ajoute de l'anhydride acétique (0,5 ml). Le mélange réactionnel est maintenu pendant une nuit à température ambiante puis versé dans un mélange eau-glace (25 ml). Cette solution aqueuse est extraite par le chloroforme, la couche organique étant lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le résidu est cristallisé à partir de chloroforme-éther (38 mg, 87%), p f 154–156° (ramollissement à 135°), $[\alpha]_D^{20} +54^\circ$ (c 0,44 chloroforme), spectre i r $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 3300 (NH), 1750 (ester), 1660 (Amide I), 1550 cm⁻¹ (Amide II), spectre de r m n (chloroforme-d, tétraméthylsilane comme référence externe) τ 8,65 (doublet de 3 protons, J_{2-3} 7 Hz, Me de la chaîne lactyle) 7,9 (groupe de 4 pics avec 12 protons, Ac), 6,3 (1 pic abrupt, 3 protons, ester Me) 3,8 (1 proton H-1, J_{1-2} 3 Hz) Gigg et Warren¹⁵ rapportent p f 150° (ramollissement à 135°) pour un composé qu'ils

estiment *a priori* être un mélange d'anomères La valeur de la constante de couplage $J_{1,2}$ semble indiquer que le produit est soit anomériquement pur, soit riche en forme α

Anal Calc pour $C_{18}H_{27}NO_{11}$ C, 49,88, H, 6,28, N, 3,23 Trouvé C, 49,34, H, 6,27, N, 3,10

2-Amino-3-O-(L-1-carboxyéthyl)-2-désoxy- α,β -D-glucose (acide isomuramique) (8)

— Le composé **6** (600 mg) est hydrolysé par l'acide chlorhydrique 2,5M (23 ml) pendant 6 h au bain-marie à 100° La solution est alors évaporée à sec Une faible quantité d'eau est ajoutée plusieurs fois, puis évaporée sous pression réduite Le résidu est dissous dans l'eau (20 ml) et la solution est agitée à 0° avec addition de résine échangeuse d'ions Dowex 1 (X-8, OH⁻, 20–50 mesh) jusqu'à pH environ 9 La résine est filtrée, lavée à l'eau et agitée dans de l'eau à 0° De l'acide chlorhydrique m est ajouté à cette suspension jusqu'à l'obtention d'un pH de 5,2 La résine est éliminée par filtration et le filtrat lyophilisé donne **8** (290 mg, 57%) sous forme d'une poudre blanche hygroscopique, qui n'a pu être cristallisée, $[\alpha]_D^{20} + 38^\circ$ (*c* 0,75, éthanol-eau 1 l, v/v), spectre i r ν_{\max}^{Nujol} 1575 cm⁻¹ (CO₂⁻)

Le produit est homogène en chromatographie descendante sur papier Whatman no 1, $R_{Acide\ muramique}$ 0,54 dans alcool butylique-pyridine-eau (6 4 3, v/v, réactif au nitrate d'argent et ninhydrine) Il a été caractérisé par le dérivé cristallin **15**

1,4,6-Tris-O-acetyl- β -D-glucopyranosido-(2,3,5,6)-2'-(S)-methyl-3'-morpholinone (15) — Le composé **8** (150 mg) est dissous dans la pyridine (15 ml) et de l'anhydride acétique (2 ml) est ajouté Après 2 jours à température ambiante la solution est versée dans un mélange eau-glace (20 ml) Cette solution aqueuse est extraite par le chloroforme, qui est lavé à l'eau, séché sur sulfate de sodium et évaporé Le résidu est purifié sur une colonne de silica gel, l'éluant étant le chloroforme contenant 5% de méthanol, on obtient ainsi 104 mg (48%), qui sont recristallisés à partir de chloroforme-éther (78 mg, 36%), p f 229–230°, $[\alpha]_D^{20} + 15,5^\circ$ (*c* 1,48, chloroforme), spectre i r ν_{\max}^{Nujol} 3200 (NH), 1750 (Ac), 1680 cm⁻¹ (Amide I), pas de bande amide II, spectre de r m n (chloroforme-*d*, tétraméthylsilane comme référence externe) τ 8,57 (doublet de 3 protons, J 7 Hz, 2'-Me du cycle morpholinone), 7,86 (groupe de 3 pics avec 9 protons, Ac), 4,84 (triplet H₄, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9$ Hz), 4,46 (1 proton doublet H-1, $J_{1,2}$ 8 Hz), 2 (1 proton singulet, NH)

Anal Calc pour $C_{15}H_{21}NO_9$ C, 50,13, H, 5,89, N, 3,90 Trouvé, C, 49,96, H, 6,00, N, 3,59

Benzyl-2-acétamido-4,6-O-benzylidène-3-O-(L-1-carboxyéthyl)-2-désoxy- α -D-glucopyranoside (10) — À une solution agitée de benzyl-2-acétamido-4,6-O-benzylidène-2-désoxy- α -D-glucopyranoside^{1,2} sec (**9**, 1,6 g) dans le *p*-dioxanne anhydre (100 ml) on ajoute de l'hydrure de sodium en suspension huileuse (0,9 g, 50% p/p d'hydrure de sodium) La réaction est effectuée comme il a été décrit pour la préparation du composé **2** Après addition d'eau, la couche supérieure est décantée, filtrée, et le *p*-dioxanne en est éliminé par distillation De l'eau est ajoutée à la solution résiduelle afin de dissoudre une faible quantité de **11** qui a précipité Cette solution aqueuse est extraite une fois par le chloroforme (80 ml), afin d'éliminer l'huile minérale et toute trace de produit de départ n'ayant pas réagi, la solution est alors acidifiée à 0° par

de l'acide chlorhydrique 2,5M jusqu'à l'obtention du pH 3 Le précipité formé est immédiatement extrait par le chloroforme Les extraits chloroformiques sont combinés, lavés à l'eau, séchés sur sulfate de sodium, évaporés et donnent un résidu solide (1,84 g, 97%) Après deux recristallisations à partir du méthanol, on obtient des aiguilles blanches, p f 275–277° (réarrangement à 235°), $[\alpha]_D^{20} + 64^\circ$ (c 0,54, pyridine), $+ 79^\circ$ (c 0,13, méthanol), spectre i r ν_{\max}^{KBr} 3280 (NH), 1705 (CO_2^-), 1650 (Amide I), 1552 cm^{-1} (Amide II).

Anal Calc pour $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_8$ C, 63,68, H, 6,20, N, 2,97, O, 27,15 Trouvé C, 63,50, H, 6,21, N, 2,98, O, 27,23

À une occasion le sel de sodium **11** a été filtré et cristallisé à partir d'éthanol 95%, p f 316–318° (déc), $[\alpha]_D^{20} + 75^\circ$ (c 0,28, éthanol 95%), spectre i r ν_{\max}^{KBr} 3320 (NH), 1610–1660 (CO_2^- et Amide I), 1550 cm^{-1} (Amide II)

Anal Calc pour $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{NO}_8\text{Na}$ C, 60,84, H, 5,72, N, 2,83 Trouvé C, 60,82, H, 5,88, N, 2,87

Benzyl-2-acétamido-4,6-O-benzylidene-2-désoxy-3-O-[L-1-(méthoxycarbonyl)-éthyl]- α -D-glucopyranoside (12) — Le composé **10** (150 mg) brut est dissous dans le méthanol (50 ml) et estérifié par l'addition d'un léger excès de diazométhane dans l'éther Après évaporation de la solution et cristallisation du résidu à partir du méthanol (20 ml), on obtient **12** (117 mg, 72%), p f 259–260,5° (réarrangement en aiguilles filamenteuses à environ 240°), $[\alpha]_D^{20} + 62^\circ$ (c, 0,53, chloroforme), spectre i r $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 3300 (NH), 1735 (CO_2Me), 1640 (Amide I), 1550 cm^{-1} (Amide II), litt⁺ p f 253–254°, $[\alpha]_D^{20} + 54^\circ$ (c 0,60, chloroforme)

Benzyl-2-acétamido-3-O-(L-1-carboxyéthyl)-2-désoxy- α -D-glucopyranoside (13) — La solution du composé **10** (0,2 g) dans l'acide acétique 60% (5 ml) est chauffée pendant 1 h au bain-marie à 100° Après refroidissement à température ambiante, la solution est concentrée en un sirop, qui est séché par plusieurs additions et évaporations d'eau et de toluène, le résidu solide ainsi obtenu est traité à température ambiante pendant une nuit avec de l'hydroxyde de sodium M (0,9 ml) On ajoute de la résine échangeuse d'ions Amberlite IRC-50 (H^+) jusqu'à l'obtention d'un pH voisin de 6, la résine est éliminée par filtration et le filtrat est évaporé le résidu solide est cristallisé à partir de méthanol-acétate d'éthyle-ether et fournit **13** sous forme d'aiguilles (55 mg, 34%), p f 150–152°, resolidification et nouveau p f 215–217°, $[\alpha]_D^{20} + 86^\circ$ (c 0,68, méthanol), spectre i r $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 1705 (CO_2^-), 1640 (Amide I), 1545 cm^{-1} (Amide II)

Anal Calc pour $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_8$ C, 56,39, H, 6,57, N, 3,65, O, 33,38 Trouvé C, 56,38, H, 6,55, N, 3,55, O, 33,36

Benzyl-2-acétamido-2-désoxy-3-O-[L-1-(méthoxycarbonyl)éthyl]- α -D-glucopyranoside (14) — Le composé **13** (30 mg) est dissous dans le volume minimum de méthanol et un excès d'une solution éthérée fraîchement préparée de diazométhane est ajouté Après évaporation, le résidu est cristallisé à partir d'acétate d'éthyle-méthanol-ether et fournit **14** (20 mg, 63%), p f 169–171°, $[\alpha]_D^{20} + 90^\circ$ (c 0,38, méthanol), spectre i r $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 3530, 3360 (OH, épaules), 3300 (NH), 1735 (CO_2Me), 1640 (Amide I), 1550 cm^{-1} (Amide II)

Anal Calc pour $C_{19}H_{27}NO_8$ C, 57,42, H, 6,85, N, 3,52 Trouvé C, 57,35, H, 6,98; N, 3,45

L'hydrogénéolyse de ce composé, dans les conditions décrites pour **4**, donne l'acide *N*-acétylisomuramique (**6**), identique au produit obtenu à partir de **4**

Méthyl-2-acétamido-3-O-[(S)-1-carboxyethyl]-2-désoxy- α -D-glucopyranoside 4- (ester interne) (17) — Le méthyl-2-acétamido-2-désoxy-3-*O*-[L-1-(méthoxycarbonyl)-éthyl]- α -D-glucopyranoside²¹ (**16**, 125 mg) est dissous dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium M (8 ml) Après 1 h à température ambiante, on ajoute de l'eau (10 ml), passe la solution sur une colonne de résine Dowex-50 (X-8, H⁺, 50–100 mesh) et lave celle-ci à l'eau Les éluats aqueux sont évaporés à sec, après avoir été séché sous vide, le résidu partiellement cristallin est cristallisé à partir de méthanol-acétone, donnant le méthyl-2-acétamido-3-*O*-(L-1-carboxyéthyl)-2-désoxy- α -D-glucopyranoside pur (117 mg, 97 %) sous forme de petites aiguilles, p f 188–190°, sublimation en grandes aiguilles réfringentes, p f 248–250° (déc), $[\alpha]_D^{20} + 62,5^\circ$ (c 0,56, chloroforme), litt p f 180°, sublimation et transformation en **17**, $[\alpha]_D^{25} + 62,5^\circ$ (c 4, eau)⁵, p f 198°, resolidification et nouveau p f 245–250°, $[\alpha]_D^{25} + 60,4^\circ$ (c 0,2, eau)⁷

Par sublimation de ce composé (40 mg) à 200–220° sous vide pousse on obtient l'ester interne **17** (16 mg, 43 %) sous forme de fines aiguilles L'échantillon analytique est recristallisé à partir d'acétone anhydre et les cristaux sont immédiatement séchés sous vide dans un dessiccateur sur anhydride phosphorique, p f 254–256°, $[\alpha]_D^{20} + 168^\circ$ (c 0,35, acétone), +158° (c 0,21, acétonitrile), +165° (c 0,19, *N,N*-diméthylformamide), +159° (c 0,31, *p*-dioxanne), +152° (15 min) → +59° (1 mois) (c 0,54, méthanol), [litt⁵ p f 236° (déc), $[\alpha]_D^{25} + 131^\circ$ (3 min) → +84,0° (3 h), valeur finale +78,6° (1 semaine) (c 1,4, eau)], spectre IR ν_{\max}^{NH} 3290 (NH), 1750 (ester), 1650 (Amide I), 1550 cm⁻¹ (Amide II) pas de bande CO₂⁻

Anal Calc pour $C_{12}H_{19}NO_7$ C, 49,82, H, 6,62, N, 4,84 Trouvé C, 49,92, H, 6,62, N, 4,74

Méthyl-2-acétamido-3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-2-désoxy- α -D-glucopyranoside 4- (ester interne) (18) — Le méthyl-2-acétamido-2-désoxy-3-*O*-[D-1-(méthoxycarbonyl)-éthyl]- α -D-glucopyranoside²³ (**19**, 500 mg) est traité par l'hydroxyde de sodium M (5 ml) dans les conditions décrites pour le composé **16** On obtient ainsi le méthyl-2-acétamido-3-*O*-(D-1-carboxyéthyl)-2-désoxy- α -D-glucopyranoside sous forme d'un résidu transparent, qui cristallise par addition d'acétone-éther (458 mg, 96 %) sous forme de plaques transparentes, le produit est recristallisé à partir d'acétone-éther, p f 153–154°, sublimation en aiguilles, p f 229–235° (déc), $[\alpha]_D^{22} + 141^\circ$ (c 0,37, eau) litt⁷ produit non cristallisé, mais caractérise par son sel de potassium, p f 305° (déc), $[\alpha]_D^{25} + 111^\circ$ (c 0,278, eau)

Par sublimation de l'acide libre (100 mg) à 200–220° sous vide poussé on obtient l'ester interne **18** (73 mg, 78 %) sous forme de longues aiguilles fines L'échantillon analytique est recristallisé à partir d'acétone anhydre et les cristaux sont immédiatement séchés sous vide dans un dessiccateur sur anhydride phosphorique, p f 246–248°, $[\alpha]_D^{20} + 227^\circ$ (c 0,19, acétone), +192° (c 0,21, acétonitrile), +154° (c 0,24, *N,N*-diméthylformamide), +137° (c 0,21, *p*-dioxanne), +171° (15 min) →

+155° (1 mois) (c 0,56, méthanol), $[\alpha]_D^{24} + 141^\circ$ (après 4 min, c 0,2, eau), spectre i r ν_{\max}^{KBr} 3300 (NH), 1750 (ester), 1650 (Amide I), 1552 cm^{-1} (Amide II), pas de bande CO_2^-

Anal Calc pour $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_7$ C, 49,82, H, 6,62, N, 4,84 Trouvé C, 49,90, H, 6,69, N, 4,79

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Professeur B Vallee, Boston, pour l'emploi du spectro-polarimètre Cary 60

RÉFÉRENCES

- 1 G BLIX ET R W JEANLOZ, dans R W JEANLOZ, *Amino Sugars*, Vol IA, Academic Press, New York, 1969, p 264
- 2 R E STRANGE ET L H KENT, *Biochem J*, 71 (1959) 333
- 3 R GIGG ET P M CARROLL, *Nature*, 191 (1961) 495
- 4 T OSAWA ET R W JEANLOZ, *J Org Chem*, 30 (1965) 448
- 5 R LAMBERT ET F ZILLIKEN *Chem Ber* 93 (1960) 2915
- 6 G D DIANA, *J Org Chem*, 35 (1970) 1910
- 7 Y MATSUSHIMA ET J T PARK, *J Org Chem*, 27 (1962) 3581
- 8 M R J SALTON, *The Bacterial Cell Wall*, Elsevier, Amsterdam, 1964
- 9 O HOSHINO, U ZEHAVI, P SINAY ET R W JEANLOZ, *J Biol Chem* 247 (1972) 381
- 10 P SINAY, M D A HALFORD, M S CHOUDHARY, P H GROSS ET R W JEANLOZ, *J Biol Chem*, 247 (1972) 391
- 11 H M FLOWERS ET R W JEANLOZ, *J Org Chem*, 28 (1963) 2983
- 12 P H GROSS ET R W JEANLOZ, *J Org Chem*, 32 (1967) 2759
- 13 M PARQUET ET P SINAY *Carbohydr Res* 18 (1971) 195
- 14 P SINAY ET R W JEANLOZ, *Carbohydr Res*, 10 (1969) 189
- 15 R GIGG ET C D WARREN, *J Chem Soc, C*, (1969) 295
- 16 P M CARROLL, *Nature*, 197 (1963) 694
- 17 P SINAY, J-M PETIT ET R W JEANLOZ, *7th Internat Svmpt Chem Nat Prod* (1970) D-21
- 18 D J TIPPER, *Biochemistry* 7 (1968) 1441
- 19 R W WHEAT, S KULKARNI, A COSMATOS, E R SCHEER ET R S STEELE, *J Biol Chem*, 244 (1969) 4921
- 20 A VEYRIERES ET R W JEANLOZ *Biochemistry*, 9 (1970) 4153
- 21 R W JEANLOZ E WALKER ET P SINAY, *Carbohydr Res*, 6 (1968) 184
- 22 J-M PETIT J R PUGNY ET P SINAY, resultats non publies
- 23 H M FLOWERS ET R W JEANLOZ, *J Org Chem* 28 (1963) 1564
- 24 E FISCHER ET K RASKE, *Ber*, 39 (1906) 3981
- 25 W E TREVELYAN, D P PROCTER ET J S HARRISON, *Nature*, 166 (1950) 444
- 26 N SHARON ET S SEIFTER, *J Biol Chem*, 239 (1964) PC2398