

SYNTHÈSE DU 3-O-(D-1-CARBOXYÉTHYL)-2-DÉSOXY-2-GLYCOLAMIDO-D-GLUCOSE (ACIDE N-GLYCOLYLMURAMIQUE)*

PIERRE SINAÏ**

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

(Reçu le 17 avril, 1970)

ABSTRACT

The synthesis of amorphous 3-O-(D-1-carboxyethyl)-2-deoxy-2-glycolamido-D-glucose (*N*-glycolylmuramic acid), starting from benzyl 2-acetamido-4,6-*O*-benzylidene-3-O-(D-1-carboxyethyl)-2-deoxy- α -D-glucopyranoside, is described. This compound is identical with that isolated from the *Mycobacterium smegmatis* cell wall.

SOMMAIRE

La synthèse du 3-O-(D-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-2-glycolamido-D-glucose (acide *N*-glycolylmuramique), à l'état amorphe, est réalisée en partant du benzyl 2-acétamido-4,6-*O*-benzylidène-3-*O*-(D-1-carboxyéthyl)-2-désoxy- α -D-glucopyranoside. Ce composé est identique à celui isolé de la paroi cellulaire de *Mycobacterium smegmatis*.

INTRODUCTION

O-2-Acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3-*O*-(D-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-D-glucose [acide *N*-acétyl- β -D-glucosaminy-(1 \rightarrow 4)-*N*-acétylmuramique] est le disaccharide de base du glycane de la paroi de nombreuses bactéries¹. Son hydrolyse enzymatique fournit le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose et le 2-acétamido-3-*O*-(D-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-D-glucose (acide *N*-acétylmuramique). La configuration D de la chaîne latérale lactyle de ce dernier vient d'être établie sans ambiguïté². Au fur et à mesure de la progression dans l'étude de la composition du peptidoglycane de nombreuses parois bactériennes, de nouveaux composés, structuralement voisins, mais non identiques à l'acide *N*-acétylmuramique lui-même, ont été isolés et identifiés. Ce sont tous des 2-aminohexoses portant en position 3 un groupement *O*-lactyle, vraisemblablement de configuration D, par suite de l'analogie des procédés de synthèse avec ceux de l'acide *N*-acétylmuramique. C'est ainsi que la dégradation enzymatique de la paroi de *Staphylococcus aureus* conduit à l'isolement

*Une communication préliminaire a été présentée [Absir. Papers Amer. Chem. Soc. Meet., 158 (1969) CARB-21]. **Adresse actuelle : Laboratoire de Biochimie Structurale, Faculté des Sciences, 45-Orléans 02 (France).

du 2-acétamido-6-*O*-acétyl-3-*O*-(*D*-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-*D*-glucose (acide 6-*O*-acétyl-*N*-acétylmuramique)³, dont la structure⁴ a été confirmée par la synthèse des différents dérivés *O*-acétylés de l'acide *N*-acétylmuramique⁵.

De très petites quantités de 2-acétamido-3-*O*-(*D*-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-*D*-mannose (acide *N*-acétyl-*mannomuramique*) ont été isolées de la paroi de *Micrococcus lysodeikticus*⁶, la structure ayant de nouveau été confirmée par synthèse⁷. Cette même paroi renferme également des unités 2-amino-3-*O*-(*D*-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-*D*-glucose⁸ (acide muramique). D'autre part, le 2-acétamido-3-*O*-(*D*-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-*D*-galactose (acide *N*-acétyl-*galactomuramique*) obtenu par synthèse^{9,10} (ainsi que son analogue *L*-1-carboxyéthyl⁹), semblent être absent de la paroi bactérienne¹⁰. Enfin, l'amide interne de l'acide muramique vient d'être identifiée dans le cortex de certaines spores¹¹.

Dans ces dérivés possédant la structure de l'acide muramique le groupement amino en position 2 est soit libre, soit acétylé ou amidifié par le groupe carboxylique de la chaîne lactyle.

Une étude récente sur la structure du peptidoglycane de la paroi de *Mycobacterium smegmatis* a conduit à l'isolement et à l'identification d'un disaccharide constitué de 2-acétamido-2-désoxy-*D*-glucose et d'acide muramique *N*-glycolylé au lieu de *N*-acétylé¹². Si la présence d'acide *N*-glycolylneuraminique est assez fréquente dans divers tissus¹³, aucun dérivé glycolylé de sucre aminé n'avait jusqu'à présent été isolé de la paroi bactérienne. La synthèse ici décrite du 3-*O*-(*D*-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-2-glycolamido-*D*-glucose (acide *N*-glycolylmuramique) a fourni un composé en tous points identique au composé naturel.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

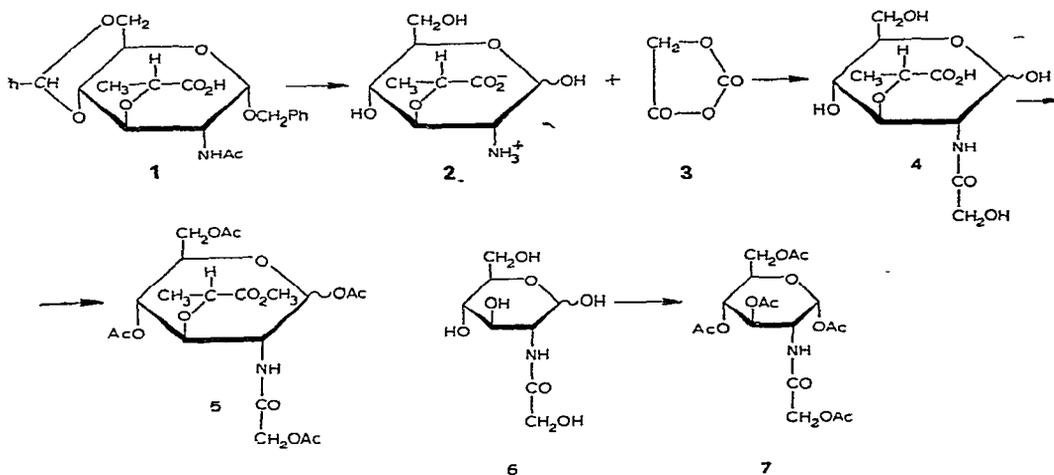
L'anhydride *O*-carboxyglycolique (3), préparé par action du phosgène sur l'acide glycolique en solution dans le dioxane anhydre¹⁴, est un excellent agent glycolylant des hexosamines¹⁵. En opérant au voisinage de la neutralité, sur le sucre complètement déprotégé, le rendement de l'acylation, évalué avant cristallisation, est quantitatif. Ce procédé a également été utilisé avec succès pour la synthèse du méthyl β -glycoside de l'acide *N*-glycolylneuraminique¹⁶, la réaction s'effectuant sans protection de la fonction carboxylique.

D'une façon analogue, la synthèse de l'acide *N*-glycolylmuramique (4) a été réalisée par l'action, à 0°, d'une solution d'acide muramique (2) dans le *p*-dioxane aqueux, sur un excès d'une solution *p*-dioxanique de 3.

Le composé 2 a été obtenu directement par hydrolyse chlorhydrique du benzyl 2-acétamido-4,6-*O*-benzylidène-3-*O*-(*D*-1-carboxyéthyl)-2-désoxy- α -*D*-glucopyranoside (1)¹⁷. Un mélange des anomères α et β de 1 peut d'ailleurs aussi bien être employé, ce qui évite une délicate cristallisation fractionnée¹⁸. Cet acide muramique brut est, après neutralisation du résidu de l'hydrolyse par Amberlite CG-4B (OH⁻), contaminé par plusieurs impuretés donnant une réaction positive à la ninhydrine¹⁹, ainsi que le montre une chromatographie sur papier au moyen du solvant A (voir partie expéri-

mentale). L'impureté principale, donnant une réaction positive à la ninhydrine, mais négative au nitrate d'argent²⁰, traduit la difficulté d'hydrolyse des glycosides des 2-acylamino-hexoses²¹. C'est cet acide non purifié que l'on traite directement avec 3. L'utilisation d'un acide muramique pur et cristallin, préparé en trois étapes²² à partir de 1, n'est pas nécessaire.

La solution *p*-dioxanique de 3 est préparée selon la méthode de Wirtz-Peitz *et al.*¹⁶, légèrement modifiée. Étant donné que 3 n'est isolé qu'à l'état d'huile brute et immédiatement mis en solution dans le *p*-dioxane, son pouvoir glycolylant a été au préalable soigneusement vérifié sur le 2-amino-2-désoxy-D-glucose. Le 2-désoxy-2-glycolylamido-D-glucose (6) obtenu¹⁵ a été transformé, par l'action de l'anhydride acétique dans la pyridine, en un mélange des pentaacétates α et β . Par cristallisation fractionnée l'anomère 7 prédominant a été obtenu à l'état pur et la configuration α -D



lui a été attribuée par suite de son pouvoir rotatoire spécifique élevé (+80,5° dans le méthanol), de l'examen de son spectre de r.m.n. (proton anomérique à δ 6,2 p.p.m., $J_{1,2}$ 3 Hz) et de sa migration sur plaque de gel de silice (dans le système chloroforme commercial contenant 1,5% de méthanol) plus grande que celle de l'autre anomère β -D*.

Après réaction, 4 est nettement séparé de l'acide glycolique présent dans le milieu par absorption sur une colonne Dowex-2 X-8 (Fig. 1) et il est obtenu sous forme d'un solide amorphe, mais homogène en chromatographie sur papier et sur plaque de cellulose. Il est transformé en un mélange anomérique de l'ester méthylique des tétraacétates 5 par action du diazométhane puis de l'anhydride acétique dans la pyridine.

*Pour tous les dérivés des 2-acétamido-2-désoxy-D-hexoses examinés par l'auteur au moyen d'une chromatographie sur couche mince de gel de silice dans des systèmes chloroforme-méthanol, un anomère α migre d'avantage que l'anomère β correspondant.

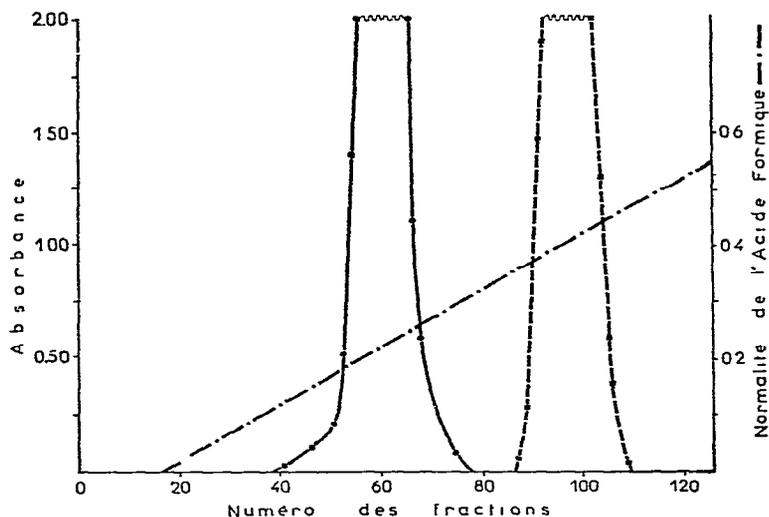


Fig. 1. Purification du 3-*O*-(*D*-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-2-glycolamido-*D*-glucose (4). Colonne Dowex 2 X-8, HCO_2^- , élution au moyen d'un gradient d'acide formique (—●—). Le composé 4 (●—●) est complètement élué de la colonne avant l'acide glycolique (■—■). Les détails de cette chromatographie se trouvent dans la partie expérimentale.

L'examen du spectre de r.m.n. de 5 (proton anomérique à δ 5,6 p.p.m., $J_{1,2}$ 3 Hz) montre la prédominance de l'anomère α -*D*, environ 85% d'après l'intensité des taches chromatographiques obtenues sur une plaque mince de gel de silice. La cristallisation de 5 n'a pas été possible, mais l'analyse des spectres de r.m.n. et i.r. confirme totalement la structure.

Le spectre de masse de cet acide *N*-glycolylmuramique synthétique (4), perdeutérométhylé selon la technique de Coggins et Benoiton²⁴, est tout à fait conforme à la structure et montre de plus que la méthylation a bien été totale (pic moléculaire *M* à 411 et *M* - $\text{CH}_3\text{-CH-COOC D}_3$ à *m/e* 305). Il est identique à celui de l'acide *N*-glycolylmuramique naturel¹². Il a de plus été comparé à celui de l'acide *N*-acétylmuramique, également perdeutérométhylé selon la même technique (Fig. 2). On remarque des pics identiques (en particulier *m/e* 302) et une série de pics homologues, séparés par 33 unités *m/e* (148 et 181, 207 et 240, 272 et 305). Les fragmentations donnant lieu à ces pics ont déjà été discutées¹².

À des fins d'analyse quantitative, la réaction colorée de Morgan-Elson a été effectuée sur 4 en employant les conditions de Reissig *et al.*²³ ainsi que celles de Jourdian et Roseman¹⁵ (Tableau I). La teneur en groupe glycolyl de 4 a de plus été déterminée par hydrolyse acide de ce dernier, selon Mårtensson *et al.*²⁵, l'acide glycolique libéré étant extrait en continu à l'éther, puis dosé au moyen du réactif d'Eegriwe^{26,27} fraîchement préparé, selon Mårtensson *et al.*²⁵. Cette extraction en continu à l'éther doit être effectuée pendant plusieurs jours, 48 heures étant nécessaires pour extraire 94% d'acide glycolique²³. Cette extraction a été employée car un dosage direct d'acide glycolique après hydrolyse acide donne une valeur trop forte, par suite d'une interférence de l'acide muramique libéré²⁹.

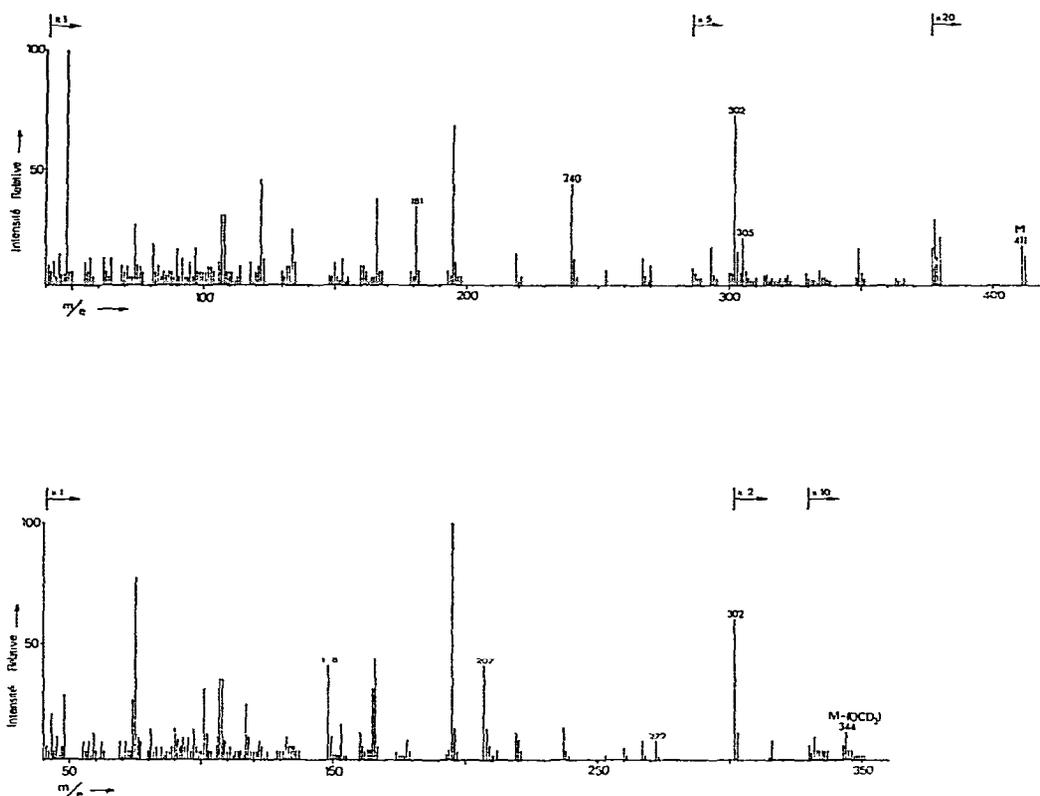


Fig. 2. Comparaison des spectres de masse, après perdeutériométhylation, du 3-*O*-(*D*-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-2-glycolamido-*D*-glucose (4) synthétique (diagramme supérieur) et du 2-acétamido-3-*O*-(*D*-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-*D*-glucose (acide *N*-acétylmuramique) (diagramme inférieur).

TABLEAU I

ABSORBANCES DE DIVERS DÉRIVÉS DU 2-AMINO-2-DÉSOXY-*D*-GLUCOSE LORS DE LA RÉACTION DE MORGAN-ELSON^a.

| Dérivés de 2-amino-2-désoxy- <i>D</i> -glucose | Modification de Reissig et al ^{2,3} | | Modification de Jourdan et Roseman ^{1,5} |
|--|--|--------|---|
| | 20 min | 35 min | |
| 2-Acétamido- | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 2-Glycolamido- | 0,86 | 0,94 | 0,58 ^b |
| 3- <i>O</i> -(Carboxyéthyl)-2-glycolamido- | 0,67 | 0,74 | 0,69 |

^aCes valeurs sont relatives à une quantité équimoléculaire de 2-acétamido-2-désoxy-*D*-glucose, testée dans des conditions identiques. ^b Jourdan et Roseman ont observé 0,56.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Conditions générales. — Les points de fusion sont mesurés au moyen d'un bloc chauffant équipé d'un microscope (Reichert) et sont corrigés. Les rotations optiques

sont déterminées au moyen d'un polarimètre Perkin-Elmer (Modèle 141). Les spectres sont enregistrés avec les appareils suivants : spectrophotomètre Perkin-Elmer (Modèle 457) pour l'infrarouge (en suspension dans le Nujol); spectromètres Varian A-60 ou Jeol 60 pour la résonance nucléaire magnétique; spectromètre AEI (Modèle MS 9) pour la spectrométrie de masse (après perdeutériométhylation des composés). Les absorbances des solutions colorées sont mesurées au moyen d'un appareil Jobin et Yvon (Modèle Maroc IV).

L'homogénéité des composés préparés est contrôlée par chromatographie sur des plaques recouvertes de gel de silice Prolabo ou de cellulose MN 300 (épaisseur 0,25 mm). Les mélanges utilisés pour les chromatographies sur cellulose sont les suivants : alcool butylique-pyridine-eau (6:4:3), mélange A; alcool butylique-acide acétique-eau (5:1:2), mélange B; alcool butylique-acide acétique-eau (50:12:25), mélange C. Les plaques de gel de silice sont révélées par vaporisation d'acide sulfurique concentré et chauffage sur plaque électrique. Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Service Central de Micro-analyses du C.N.R.S. (Thiais, France).

Anhydride O-carboxyglycolique (3). — On fait barboter, à environ 0°, un courant de phosgène (J. T. Baker Co.) dans 100 ml de *p*-dioxane anhydre, jusqu'à absorption de 103 g. Dans cette solution, maintenue à +5°, est versée, goutte à goutte et à l'abri de l'humidité, une solution d'acide glycolique anhydre (25,8 g) dans le *p*-dioxane anhydre (100 ml). Le mélange obtenu est agité magnétiquement pendant 24 h à température ambiante puis soumis, pendant plusieurs heures, à une évaporation sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif, à +60°. Le résidu huileux obtenu est dissous, après refroidissement à température ambiante, dans l'éther anhydre (330 ml) et cette solution est immédiatement purifiée par passage sur une colonne de gel de silice Davison (45 g, 60–200 mesh, grade 950) et élution à l'éther. Après évaporation de l'éluat, on obtient un résidu huileux (26,7 g) qui est aussitôt dissous dans le *p*-dioxane anhydre (200 ml). Ce réactif glycolylant, conservé à –25° et à l'abri de l'humidité, a été utilisé, lors des réactions suivantes, moins d'une semaine après sa préparation.

2-Désoxy-2-glycolamido-D-glucose (6). — Le pouvoir glycolylant de la solution dioxanique précédente est vérifié par glycolylation du chlorhydrate de 2-amino-2-désoxy-D-glucose, selon la méthode de Jourdian et Roseman¹⁵, légèrement modifiée. Le chlorhydrate (1,08 g) et l'hydrogénocarbonate de potassium (0,6 g) sont dissous dans un mélange d'eau (10 ml) et de méthanol (2 ml). On y verse très lentement, à 0° et avec agitation magnétique, le réactif glycolylant (20 ml) fraîchement préparé. Après l'addition de chaque goutte, le pH a tendance à baisser et est maintenu autour de 6,5 par introduction de petites quantités d'hydrogénocarbonate de potassium (le pH du milieu réactionnel est constamment contrôlé au pH mètre). L'addition totale se fait en 2 h environ. Le mélange est ensuite agité magnétiquement à 0° pendant une heure supplémentaire, à la suite de laquelle la valeur du pH est d'environ 9,5. Un test à la ninhydrine montre alors la disparition totale du 2-amino-2-désoxy-D-glucose. Cette solution est passée successivement sur une colonne de résine Dowex 50-W (X-4, 20–50 mesh, H⁺), en quantité suffisante pour éliminer totalement les ions potassium,

puis sur une colonne Dowex-1 (X-8, 20–50 mesh, CO_3^{2-}). L'éluat final, ainsi que les eaux de lavage, sont évaporés, donnant un résidu solide blanc (970 mg, 63%). Après une recristallisation dans l'éthanol absolu, p.f. 164–169°; lit.¹⁵ : p.f. 184–190° après trois recristallisations et R_{GNAC} 0,76, pour une chromatographie descendante sur papier Whatman No. 1, au moyen du mélange C. Le produit est homogène en chromatographie ascendante sur plaque de cellulose, avec un R_{GNAC} 0,87 dans le mélange A et 0,75 dans le mélange B. Une chromatographie descendante sur papier Whatman No. 1 donne un R_{GNAC} 0,82 dans le mélange C. Les plaques et le papier sont révélés au moyen de réactifs au nitrate d'argent²⁰ et au *p*-diméthylaminobenzaldéhyde³⁰ ou au moyen d'un examen sous u.v., après traitement alcalin³¹. Les résultats de la réaction de Morgan–Elson sont indiqués dans le Tableau I.

2-(Acétoxyacétamido)-1,3,4,6-tétra-O-acétyl-2-désoxy- α -D-glucopyranose (7).

— Le composé 6 (298 mg) est introduit dans de la pyridine anhydre (5 ml) et de l'anhydride acétique (3 ml) est ajouté. Après une nuit à température ambiante et à l'abri de l'humidité, la solution est versée dans un gros excès d'eau glacée. Ce mélange est aussitôt extrait au chloroforme, les extraits chloroformiques étant lavés à l'eau, séchés sur sulfate de sodium et évaporés. Les traces de pyridine sont éliminées au moyen de plusieurs entraînements au toluène anhydre. Le résidu sirupeux incolore obtenu (474 mg, 85%) est un mélange des anomères, ainsi que le montre une chromatographie sur couche mince de gel de silice dans le mélange chloroforme–méthanol (197:3, v/v). Une cristallisation dans acétate d'éthyle–éther donne un mélange $\alpha + \beta$ (216 mg, 40%). Les eaux mères sont évaporées, donnant un sirop incolore (253 mg, 45%), homogène sur couche mince (tache correspondant au R_f le plus élevé, suggérant une configuration anomérique α -D). Une cristallisation de ce sirop dans acétate d'éthyle–éther donne 7 (125 mg, 22%), p.f. 92–93,5°, $[\alpha]_D^{20} + 80,5^\circ$ (*c* 1,32, méthanol); $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3370 (NH), 1750 (OAc), 1680 (Amide I), 1530 cm^{-1} (Amide II). Données de r.m.n. (chloroforme-*d*, tétraméthylsilane comme référence externe) : τ 8–7,7 (15 protons, Ac); 6,1–5,3 (6 protons, H-2, H-5 et les deux $-\text{CH}_2-$); 5–4,6 (2 protons, H-3 et H-4); 3,8 (1 proton H-1, $J_{1,2}$ 3 Hz); 3,7 (1 proton, NH). Les deux massifs à 6,1–5,3 et 5–4,6 ne peuvent pas être analysés facilement³². La constante de couplage $J_{1,2}$ indique une configuration α -D³³.

Anal. Calc. pour $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_{12}$: C, 48,32; H, 5,63; N, 3,13. Trouvé : C, 48,14; H, 5,83; N, 3,16.

3-O-(D-1-carboxyéthyl)-2-désoxy-2-glycolamido-D-glucose (acide N-glycolyl-muramique) (4). — Le benzyl 2-acétamido-4,6-*O*-benzylidène-3-*O*-(D-1-carboxyéthyl)-2-désoxy- α -D-glucopyranoside¹⁷ (I, 4,8 g) est hydrolysé au moyen d'acide chlorhydrique 6M (80 ml) pendant 3 h 30 min à 100–105°. Après refroidissement, la solution est extraite à l'éther, puis évaporée. La majeure partie de l'acide chlorhydrique est éliminée par des additions d'eau, suivies d'évaporations. Le résidu (2,1 g) est dissous dans l'eau (60 ml) et neutralisé à pH 6 (contrôle au pH mètre), au moyen de résine Amberlite CG-4B (OH^- , type I, 100–200 mesh). La résine est ensuite filtrée et le filtrat évaporé à sec, donnant un résidu jaune clair (1,98 g). Des chromatographies descendantes sur papier Whatman No. 1 montrent la présence dans ce

résidu, en plus de l'acide muramique (2), de plusieurs produits secondaires. L'impureté principale, révélable à la ninhydrine, mais non au nitrate d'argent²⁰, a un $R_{\text{acide muramique}}$ égal à 2,1 dans le mélange A et à 1,7 dans le mélange B.

Une partie de cet acide muramique brut (1 g) est dissoute dans un mélange eau-*p*-dioxane (1:1, v/v; 24 ml), une petite quantité d'hydrogénocarbonate de potassium étant ajoutée de façon à ajuster le pH à 6,5. On verse très lentement, à 0° et avec agitation magnétique, le réactif glycolylant (16 ml) fraîchement préparé, le pH étant maintenu entre 6,5 et 7 par addition de petites quantités d'hydrogénocarbonate de potassium. Cette opération demande environ une heure. L'agitation est encore maintenue pendant 1 h 30 min à 0°, le pH s'élevant lentement à 9,4. Un test à la ninhydrine montre alors la disparition totale de l'acide muramique, avec apparition d'un composé donnant une réaction de Morgan-Elson positive.

On se débarrasse des ions potassium par passage sur une colonne (2,2 × 46,5 cm) de résine Dowex 50-W (X-4, 20-50 mesh, H⁺) qui est ensuite lavée à l'eau, le volume final recueilli étant d'environ 400 ml. Cette solution est alors versée au sommet d'une colonne (2,6 × 78 cm) de résine Dowex 2 (X-8, 200-400 mesh, HCO₂⁻) que l'on élue, après passage des 400 ml, par un gradient linéaire d'acide formique (2500 ml d'acide formique 0,8M et 2500 ml d'eau). Des fractions de 30 ml sont recueillies. Les fractions 46 à 73, positives à la réaction de Morgan-Elson selon Jourdian et Roseman¹⁵ et négatives au réactif d'Eegriwe selon Mårtensson²⁵, sont groupées, la solution résultante étant concentrée à l'évaporateur rotatif à 40° jusqu'à un volume d'environ 200 ml. De l'eau est alors ajoutée et on concentre de nouveau à 200 ml, cette opération étant répétée plusieurs fois, afin d'éliminer la majeure partie de l'acide formique. La lyophilisation de la solution finale fournit 4 (600 mg, 50%), solide blanc amorphe, très hygroscopique, qui n'a pu être cristallisé, $[\alpha]_D^{20} +53,5 \rightarrow +56^\circ$ (au bout de 24 h, *c* 2,22, éthanol 50%); $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}} 3300$ (large bande, OH), 1730 (CO₂H), 1640 (Amide I), 1550 cm⁻¹ (Amide II).

Anal. Calc. pour C₁₁H₁₉NO₉·H₂O : C, 40,37; H, 6,42; N, 4,28. Trouvé : C, 39,74; H, 6,40; N, 4,66.

Ce produit est homogène en chromatographie ascendante sur plaque de cellulose, avec un R_{GNAC} 0,62 dans le mélange A et 1,25 dans le mélange B. Une chromatographie descendante sur papier Whatman No. 1 donne un R_{GNAC} 1,30 dans le mélange C. Des valeurs dans d'autres mélanges ont été publiées¹². Les réactifs utilisés pour révéler cet acide sont les mêmes que ceux employés pour le 2-désoxy-2-glycolylamido-D-glucose. Une chromatographie sur plaque de gel de silice dans le mélange acétone-méthanol (1:2) indique la présence d'une très légère impureté ayant un R_F élevé.

Le dosage des groupes *N*-glycolyl est effectué de la façon suivante : 4 (9,95 mg) est hydrolysé pendant 2 h à 100° au moyen d'acide sulfurique 1M (2 ml)²⁵. Cette solution est extraite en continu à l'éther pendant 6 jours. La couche étherée est ensuite évaporée, le résidu étant repris dans l'eau (50 ml). Le dosage de l'acide glycolique dans cette solution est effectué au moyen du réactif d'Eegriwe fraîchement préparé (10 mg de 2,7-dihydroxynaphtalène dans 100 ml d'acide sulfurique con-

centré) selon Mårtensson *et al.*²⁵. La valeur moyenne trouvée est égale à 93% de la quantité théorique.

2-(Acétoxyacétamido)-1,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-3-O-[D-1-(méthoxycarbonyl)-éthyl]-(α,β)-D-glucopyranose (5). — Ce dérivé a été préparé en vue d'étudier son spectre de r.m.n. en dissolvant **4** (39,6 mg) dans du méthanol (1,5 ml) et en ajoutant un excès d'une solution fraîchement préparée de diazométhane dans l'éther. On laisse réagir pendant 15 min à température ordinaire et 24 h à 0° (le 2-désoxy-2-glycolamido-D-glucose ne réagit pas dans ces conditions). Une chromatographie sur gel de silice, dans le mélange acétone-méthanol (3:1), indique la disparition totale de **4** et la formation d'un seul produit. Ce produit est également homogène sur plaque de cellulose (ayant un R_{GNAC} égal à 1,45 dans le mélange A et à 1,59 dans le mélange B) et sur papier Whatman No. 1 (R_{GNAC} 1,60 dans le mélange C). Les réactifs utilisés furent le nitrate d'argent²⁰ et le réactif de Sharon et Seifter³¹.

Le résidu sirupeux de cette estérification (40,6 mg) est dissous dans la pyridine (0,5 ml) et on ajoute de l'anhydride acétique (0,4 ml). On laisse réagir pendant 38 h à température ambiante et à l'abri de l'humidité. L'ensemble est alors versé dans un excès d'eau glacée, le mélange étant aussitôt extrait au chloroforme. Les extraits chloroformiques sont lavés à l'eau, séchés sur sulfate de sodium et évaporés. Le résidu est chromatographié sur une colonne de gel de silice (5 g). Les fractions éluées à l'acétate d'éthyle sont groupées, donnant un sirop incolore (23 mg) que l'on n'a pu cristalliser. Une chromatographie sur plaque de gel de silice dans le mélange chloroforme-méthanol (98,5:1,5 v/v) indique la présence des deux anomères, le composé ayant le R_F le plus élevé étant très nettement prédominant. Un spectre de r.m.n. a été effectué sur ces 23 mg (chloroforme-*d*, le pic du proton chloroformique à τ 2,73 étant pris comme référence) : τ 8,66, 8,55 (doublet de 3 protons, $J_{2,3}$ 7 Hz, Me de la chaîne lactyle); 8-7,7 (groupe de 3 pics avec 12 protons, Ac); 6,2 (1 singulet de 3 protons, Me ester); 6-5,8 (2 protons, H-6); 5,7-5,8 (proton H-2, de la chaîne lactyle, obtenu par découplage); entre 6,3 et 5,5 se trouvent également H-2 et H-5; 5,4 (singulet de 2 protons, méthylène glycolique); 5,05-4,7 (2 protons, H-3 et H-4); 4,4 (1 proton H-1, $J_{1,2}$ 3 Hz); 1,7 (1 proton, NH). La valeur de la constante de couplage $J_{1,2}$ indique la prédominance de la configuration α ³³.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie Monsieur Canet pour l'enregistrement du spectre de r.m.n. du dérivé de l'acide *N*-glycolylmuramique, le Docteur D. W. Thomas pour l'enregistrement et l'interprétation des spectres de masse (Institut des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette), Messieurs les Professeurs E. Lederer et S. David pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

RÉFÉRENCES

- 1 R. W. JEANLOZ, N. SHARON ET H. M. FLOWERS, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 13 (1963) 20; N. SHARON, T. OSAWA, H. M. FLOWERS ET R. W. JEANLOZ, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 223; J. M. GHUYSEN, *Bacteriol. Rev.*, 32 (1968) 426.

- 2 D. J. TIPPER, *Biochemistry*, 7 (1968) 1441; A. VEYRIÈRES ET R. W. JEANLOZ, *Abstr. Papers Amer. Chem. Soc. Meet.*, 158 (1969) CARB-17.
- 3 J. M. GHUYSEN ET J. L. STROMINGER, *Biochemistry*, 2 (1963) 1119.
- 4 D. J. TIPPER, J. M. GHUYSEN ET J. L. STROMINGER, *Biochemistry*, 4 (1965) 468; D. J. TIPPER ET J. L. STROMINGER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22 (1966) 48.
- 5 T. OSAWA, P. SINAŮ, M. HALFORD ET R. W. JEANLOZ, *Biochemistry*, 8 (1969) 3369.
- 6 R. W. JEANLOZ, *Pure Appl. Chem.*, 14 (1967) 57; O. HOSHINO ET R. W. JEANLOZ, *Abstr. Papers Intern. Congr. Biochem.*, (1967) D-54; O. HOSHINO, U. ZEHAVI, P. SINAŮ, M. HALFORD ET R. W. JEANLOZ, résultat non publié.
- 7 P. SINAŮ, R. W. JEANLOZ ET P. GROSS, *Abstr. Papers Amer. Chem. Soc. Meet.*, 156 (1968) CARB-21.
- 8 D. MIRELMAN ET N. SHARON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24 (1966) 237; D. MIRELMAN ET N. SHARON, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 3414.
- 9 P. SINAŮ ET R. W. JEANLOZ, *Carbohydr. Res.*, 10 (1969) 189.
- 10 R. W. WHEAT, S. KULKARNI, A. COSMATOS, E. R. SCHEER ET R. S. STEELE, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 4921.
- 11 A. D. WARTH, *Fed. Proc.*, 28 (1969) 657; *Diss. Abstr.*, 30 (1969) 495; A. D. WARTH ET J. L. STROMINGER, *Proc. Nat. Acad. Sciences, U. S.*, 64 (1969) 528.
- 12 J. F. PETTIT, A. ADAM, J. WIETZERBIN-FALSZPAN ET E. LEDERER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35 (1969) 478; A. ADAM, J. F. PETTIT, J. WIETZERBIN-FALSZPAN, P. SINAŮ, D. W. THOMAS ET E. LEDERER, *Fed. Eur. Biol. Soc. Letters*, 4 (1969) 78.
- 13 A. GOTTSCHALK, *The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances*, Cambridge University Press, Cambridge, 1960.
- 14 W. H. DAVIES, *J. Chem. Soc.*, (1951) 1357.
- 15 G. W. JOURDIAN ET S. ROSEMAN, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2442.
- 16 F. WIRTZ-PEITZ, R. SCHAUER ET H. FAILLARD, *Z. Physiol. Chem.*, 350 (1969) 111.
- 17 H. M. FLOWERS ET R. W. JEANLOZ, *J. Org. Chem.*, 28 (1963) 2983.
- 18 P. H. GROSS ET R. W. JEANLOZ, *J. Org. Chem.*, 32 (1967) 2759.
- 19 Y. MATSUSHIMA ET J. T. PARK, *J. Org. Chem.*, 27 (1962) 3581.
- 20 W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER ET J. S. HARRISON, *Nature*, 166 (1950) 444.
- 21 P. G. JOHANSEN, R. D. MARSHALL ET A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 77 (1960) 239.
- 22 T. OSAWA ET R. W. JEANLOZ, *J. Org. Chem.*, 30 (1965) 448.
- 23 J. L. REISSIG, J. L. STROMINGER ET L. F. LELOIR, *J. Biol. Chem.*, 217 (1965) 959.
- 24 J. COGGINS ET L. BENOITON, *Abstr. Papers Amer. Chem. Soc. Meet.*, 156 (1968) BIOL-18.
- 25 E. MÅRTENSSON, A. RAAL ET L. SVENNERHOLM, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 124.
- 26 E. EEGRIWE, *Z. Anal. Chem.*, 89 (1932) 121.
- 27 V. P. CALKINS, *Anal. Chem.*, 15 (1943) 762.
- 28 K. F. LEWIS ET S. WEINHOUSE, *Methods Enzym.*, 3 (1957) 269.
- 29 A. ADAM, résultat non publié.
- 30 C. T. SPIVAK ET S. ROSEMAN, *J. Amer. Chem. Soc.*, 81 (1959) 2403.
- 31 N. SHARON ET S. SEIFTER, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) PC 2398.
- 32 T. D. INCH, J. R. PLIMMER ET H. G. FLETCHER JR., *J. Org. Chem.*, 31 (1966) 1825.
- 33 R. U. LEMIEUX, R. K. KULLNIG, H. J. BERSTEIN ET W. G. SCHNEIDER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 80 (1958) 6098.

Carbohydr. Res., 16 (1971) 113-122