

Note

Synthèse d'un (1→6)- β -D-glucane par polycondensation

DIDIER GAGNAIRE ET MICHEL VIGNON*

*Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, C.N.R.S.,
B. P. 53, 38041 Grenoble (France)*

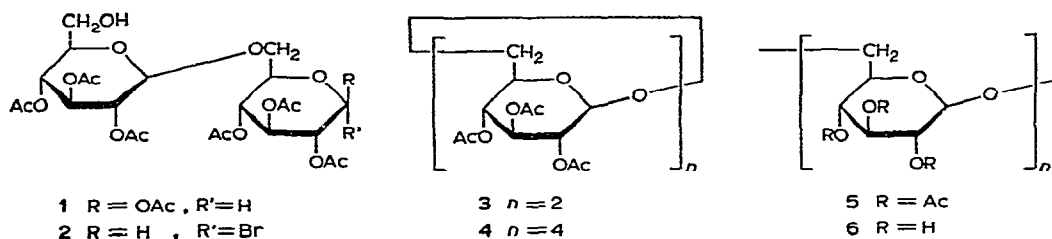
(Reçu le 3 mars 1976, accepté le 7 mai 1976)

La parution de l'article de Kochetkov¹ et Klimov concernant la synthèse de (1→6)-D-glucane nous amène à publier les résultats de nos travaux dans un domaine similaire. Nous préparons actuellement par synthèse des oligomères pour les étudier comme modèles de polymères en résonance magnétique nucléaire. On peut, avec Schuerch², distinguer deux groupes de méthodes qui permettent d'obtenir des oligosaccharides et des polysaccharides par synthèse chimique: (a) Les réactions de synthèse pas à pas qui permettent d'enchaîner des séquences de monomères éventuellement différents. (b) Les réactions de polymérisation qui permettent d'obtenir des oligo- ou polysaccharides stéréoréguliers. Parmi celles-ci on peut distinguer d'une part les réactions de polymérisation par ouverture cationique de cycles oxygénés qui donnent de bons résultats: c'est ainsi que Kochetkov et Bochkov³ obtiennent des polymères stéréoréguliers (dont les D.P. varient entre 20 et 60) par ouverture d'ortho-esters tricycliques et que Schuerch et coll.^{2,4} obtiennent des polymères α -D-(1→6) de D.P. très élevé par ouverture de 1,6-anhydro-D-hexoses tribenzylés en présence d'acides de Lewis. D'autre part, on peut distinguer les réactions de « self-condensation » d'une molécule bifonctionnelle; ce sont Husemann et Mueller⁵ qui les premiers ont réussi la polymérisation d'un monomère bifonctionnel et obtenu un dérivé de type cellulosique. Par la suite Haq et Whelan⁶, McGrath et coll.⁷, Kochetkov et coll.^{3,8} et Nesmeyanov et coll.⁹ ont réussi à obtenir des oligomères, mais avec des rendements faibles qui peuvent s'expliquer par l'instabilité éventuelle des molécules bifonctionnelles et par la présence de composés d'éliminations dans le milieu réactionnel (eau par exemple), ceux-ci entraînant l'arrêt de la polycondensation soit par désactivation de l'extrémité anomérique, soit par la migration d'esters.

Afin de limiter au maximum ces réactions parasites, nous avons préparé le bromure de 2,3,4-tri-*O*-acétyl-6-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyle (2) par action du bromure de titane sur le 1,2,3,4-tétra-*O*-acétyl-6-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranose¹⁰ (1) selon un procédé déjà décrit pour d'autres composés^{6,11}. Le dérivé 2 est obtenu cristallisé avec un bon

*Ce travail fait partie de la thèse de M. R. Vignon inventoriée au C.N.R.S. sous le n° A.O. 12590.

rendement et sa structure est confirmée par r.m.n.- ^1H à 250 MHz par les méthodes de double résonance et de double résonance inter-nucléaire (« INDOR ») et par les résultats de la spectrométrie de masse.



La « self-condensation » de 2 dans l'acétonitrile à 0° (qui sont les conditions de glycosylation où l'on constate le moins de réactions parasites) en présence de sels de mercure¹² donne rapidement, à côté de deux oligomères cycliques 3 et 4, les oligomères linéaires 5 qui font l'objet de cette note. En fin de réaction, le mélange brut est acétylé successivement avec l'acétate d'argent et l'acide acétique, puis l'anhydride acétique et la pyridine; une chromatographie sur gel de silice permet de récupérer une fraction éluee avec de l'éthanol dont le R_F est <2 en c.c.m. (benzène-acétone 3:1, v/v). Cette fraction déposée sur une colonne de gel Sephadex L-H-20 (acétone) est éluee dans le volume mort (l'élution est contrôlée par la méthode au phénol-acide sulfurique¹³); la r.m.n.- ^{13}C et ^1H démontre la structure β -D-(1→6) du polysaccharide 5 (δ p.p.m./Me₄Si comme référence interne, C-1 à 101). Cette fraction polysaccharide est déacétylée et conduit à 6: la r.m.n.- ^1H et ^{13}C confirme la stéréochimie β -D-(1,2-*trans*) de la liaison glycosidique. L'hydrolyse de ce polysaccharide (0,5M HCl, 8 h) ne donne que du D-glucose d'après la chromatographie sur papier.

Le polysaccharide est méthylé par la méthode d'Hakomori¹⁴, hydrolysé, réduit par le borohydrure de sodium, puis acétylé. L'analyse en chromatographie phase gazeuse du mélange confirme l'existence de liaison (1→6) exclusivement dans le polysaccharide puisque l'on ne retrouve que du 1,5-di-*O*-acétyl-2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-glucitol et du 1,5,6-tri-*O*-acétyl-2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-glucitol.

Le pourcentage du 2,3,4,6-tétra- par rapport au 2,3,6-tri-*O*-méthyl-D-glucitol est de 1:8 (dosage quantitatif par c.p.g.), ce qui indique que l'on a un D.P. moyen de 9 et un poids moléculaire de ~1450. Nous obtenons par dosage r.m.n.- ^1H du composé 5, un résultat analogue; d'une part le proton H-1 (interglycosidique) résonne à δ 4,6 p.p.m. nettement séparé des autres protons, d'autre part le proton H-6 en α d'un groupement acétyle apparaît isolé vers δ 4,2-4,44 p.p.m. et correspond à l'extrémité de chaîne non-réductrice. Il est donc possible d'effectuer un dosage à partir des surfaces de ces deux massifs selon:

$$S_1(\text{H-1}) = 160; \quad S_2[\text{H-6}(\text{OAc})] = 18; \quad \text{D.P.} = \frac{S_1 + S_2}{S_2} = 10$$

PARTIE EXPERIMENTALE

Méthodes générales. — Les points de fusion, non corrigés, ont été mesurés sur un appareil Büchi-Tottoli. Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés à l'aide d'un polarimètre « Quick » Roussel-Jouan. Les spectres de r.m.n.- ^1H ont été enregistrés sur un spectromètre CAMECA 250 MHz; les spectres de r.m.n.- ^{13}C pour lesquels on effectue un découplage par bruit du proton ont été obtenus à 62,84 MHz sur un spectromètre CAMECA en transformée de Fournier (mémoire 16 K, largeur spectrale 12500 Hz). La durée de l'impulsion est de 10 μs (environ 70°) et l'intervalle entre les impulsions de 0,6 s (ce qui correspond au temps d'acquisition). Les constantes de couplage ont été déterminées par la technique du « Gated Decoupling » qui consiste à ne pas découpler les protons pendant le temps d'acquisition (temps de répétition: 1,6 s; temps de découplage: 1 s) afin de bénéficier de l'effet Overhauser. Les chromatographies sur couches minces (c.c.m.) ont été effectuées sur des plaques finies de Kieselgel F 254 (Merck, Darmstadt, Allemagne) de 0,25 mm d'épaisseur éluées par un mélange benzène-acétone 3:1 (v/v). Les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre MS-30 (AEI). Les analyses ont été effectuées par le Service Central de Microanalyse du C.N.R.S. Les chromatographies en phase gazeuse ont été réalisées sur un chromatographe Becker modèle 417 à double colonnes et détecteur à ionisation de flamme; colonnes (verre 2 m $\times$ 2 mm): 3 % ECNSS-M sur Gas Chrom-Q (100–120 mesh). Les surfaces des pics sont déterminées par un intégrateur digital (Hewlett-Packard 3370-B).

Préparation des solutions de TiBr_4 . — Le produit commercial (Merck) est relativement impur et il est nécessaire de le purifier par sublimation (10^{-5} mm Hg) dans un montage spécialement conçu à cet effet. On peut ainsi obtenir des ampoules scellées sous vide de TiBr_4 qui se présente alors sous forme d'un solide jaune (lorsqu'il est impur, il est rouge). On prépare dans une boîte munie de gants des solutions de TiBr_4 à 1 mmol/ml (0,346 g par ml) dans le chloroforme ou le 1,2-dichloroéthane anhydre.

Bromure de 2,3,4-tri-O-acétyl-6-O-(2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyle (2). — La préparation du bromure 2 se fait à l'abri de l'humidité dans une boîte munie de gants. Le 1,2,3,4-tétra-O-acétyl-6-O-(2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranose 10 (1,28 g, 2,01 mmol) est dissous dans le chloroforme anhydre (20 ml). On ajoute alors 3 ml d'une solution de TiBr_4 (1,04 g) fraîchement préparée. Il y a apparition d'un léger précipité et d'une forte coloration rouge. Le ballon est sorti de la boîte à gants et maintenu pendant 5 min à 60°. On dilue par 30 ml de chloroforme et la phase organique est lavée deux fois par une solution froide de NaHCO_3 , puis deux fois à l'eau froide. On sèche la phase chloroforme avec Na_2SO_4 avant d'évaporer le solvant; le résidu est cristallisé dans l'éther éthylique anhydre. On récupère 0,615 g (46,7 %) de 2, p.f. 140° (déc.), $[\alpha]_D^{20} + 114^\circ$ (c 1, chloroforme); r.m.n. (250 MHz, chloroforme *d*): δ 6,65 (d, $J_{1,2}$ 4 Hz, H-1); 5,55 (t, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10$ Hz, H-3); 5,26 (t, $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 9,5$ Hz, H-3'); 5,16 (t, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10$ Hz, H-4); 5,02 (t, $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 9,5$ Hz, H-4'); 4,99 (q, $J_{1',2'} = 8$ Hz, $J_{2',3'} = 9,5$ Hz,

H-2'); 4,83 (q, $J_{1,2}$ 4 Hz, $J_{2,3}$ 10 Hz, H-2); 4,61 (d, $J_{1',2'}$ 8 Hz, H-1'); 4,24 (m, H-5); 4,02 (q, $J_{5,6a}$ 2,5 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,5 Hz, H-6a); 3,74 (m, H-6b); 3,7–3,5 (massif de m, 3 H, H-5', H-6'a et H-6'b); 2,15–1,97 (7 pics, 21 H, 7-OAc); s.m.: pas d'ion moléculaire, m/e 625 (0,1) [$M^+ - (CH_2OH^\bullet)$], 351 (12) (RS_1) (ref. 15), 289 (26) (NS_1) (réf. 15), 169 (100).

Anal. Calc. pour $C_{24}H_{33}BrO_{16}$: C, 43,85; H, 5,06; Br, 12,15. Trouvé: C, 44,02; H, 5,14; Br, 11,91.

Les rendements en bromure **2** sont extrêmement sensibles aux conditions opératoires: en particulier l'emploi de réactifs non fraîchement préparés ou l'utilisation de **1** en plus grande quantité conduit à rendre fortement majoritaire une impureté non identifiée de R_F légèrement inférieur au bromure **2**.

Synthèse du (1 → 6)-β-D-glucane. — La réaction de polycondensation se fait dans la boîte à gants; $Hg(CN)_2$ (0,3 g, 1,2 mmol) et $HgBr_2$ (10 mg) en solution dans l'acétonitrile (4 ml) sont maintenus à 0°. On ajoute lentement une solution du bromure **2** (1,05 g, 1,6 mmol) dans l'acétonitrile (6 ml). On maintient la température pendant 4 h à 0° avant de la laisser remonter lentement; on ajoute ensuite 5 ml d'acide acétique glacial et 0,3 g d'acétate d'argent. Le mélange est repris par du chloroforme, filtré, lavé par une solution de $NaHCO_3$ (2 fois) puis par l'eau. On sèche la phase organique sur Na_2SO_4 avant d'évaporer les solvants et de traiter le résidu par la pyridine (5 ml) et l'anhydride acétique (3 ml) pendant une nuit. On évapore les solvants (on effectue plusieurs entraînements successifs avec du toluène) et on dissout le mélange brut dans l'éthanol. Le composé **4** cristallise (55 mg, 6%), p.f. 212°, $[\alpha]_D^{20} -24^\circ$ (c 1, chloroforme). Les eaux-mères (1 g) sont évaporées et chromatographiées sur colonne de silice (benzène-éther éthylique); on récupère 117 mg (12,7%) de **3**¹⁶ p.f. 165°, $[\alpha]_D^{20} +85^\circ$ (c 5,1, chloroforme).

Anal. Calc. pour $C_{24}H_{32}O_{16}$: C, 50,00; H, 5,59. Trouvé: C, 49,91; H, 5,44.

On lave ensuite la colonne à l'éther pur, puis à l'éthanol pur. L'élution avec l'éthanol permet de récupérer une fraction d'oligomères (690 mg) qui présente plusieurs taches en c.c.m. Cette fraction est chromatographiée à nouveau sur silice (éther pur), puis on élue par un mélange éther-éthanol 19:1 (v/v) afin d'éliminer les oligomères les moins condensés. On récupère 250 mg (26,5%) de **5** (éthanol pur) d'un mélange qui présente 3 ou 4 taches très rapprochées et peu éluées en c.c.m. ($0 \leq R_F \leq 2$; benzène-acétone 3:1, v/v; dans ces conditions le gentiohexaose peracétylé a un $R_F = 0,28$); $[\alpha]_D^{20} -12^\circ$ (c 1, chloroforme). En r.m.n. (chloroforme-*d*; Me_4Si , réf. interne), le spectre-¹³C (62,84 MHz) laisse apparaître un massif à δ 170 (CO) et six signaux uniques à 101 (C-1), 73 (2 C), 71,2, 69,2 et 68,5 (C du squelette), 20,56 p.p.m. (OAc). Le spectre-¹H (250 MHz) a été réalisé à 50°: dans la région des ¹H du cycle on a 5 massifs centrés à δ 5,2 (H-3); 4,9 (2 H, H-4); 4,6 (H-1); 3,9 (1 H, probablement H-6a); 3,5–3,8 (2 H, probablement H-5 et H-6b); 1,9–2,1 p.p.m. (9 H, 3-OAc).

Le polysaccharide **5** est déacétylé (méthode de Zemplén¹⁷) et traité par une résine IR-120 (H⁺); la r.m.n.-¹H et -¹³C de **6** confirme la stéréochimie de la liaison glycosidique β-D-(1,2-*trans*), δ p.p.m./ Me_4Si comme référence externe, C-1 à 102,7;

δ p.p.m./sel de sodium de l'acide 2,2,3,3-tétradeutério-3-(triméthylsilyl)-propionique comme référence interne, C-1 à 104,1; $^1J_{\text{C-1-H-1}}$ 160 Hz.

Méthylation du polysaccharide. — Le polysaccharide 6 est méthylé trois fois selon la méthode d'Hakomori¹⁴ et ensuite hydrolysé (acide trifluoroacétique 2M), réduit au NaBH₄, puis acétylé; on récupère du 1,5-di-*O*-acétyl-2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-glucitol et du 1,5,6-tri-*O*-acétyl-2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-glucitol (rapport 1:8) qui sont identifiés en c.p.g. et en spectrométrie de masse couplée à la c.p.g.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur H. Reutenauer du Laboratoire Grenoblois de Résonance Magnétique Nucléaire pour la réalisation des spectres de r.m.n., Mademoiselle Bassieux pour sa collaboration technique tout au long de ce travail et Monsieur Bosso pour la réalisation des spectres de masse.

RÉFÉRENCES

- 1 N. K. KOCHETKOV ET E. M. KLIMOV, *Carbohydr. Res.*, 44 (1975) 138-141.
- 2 C. SCHUERCH, *Acc. Chem. Res.*, 6 (1973) 184-191.
- 3 N. K. KOCHETKOV ET A. F. BOCHKOV, *Recent Dev. Chem. Nat. Carbon Compd.*, 4 (1971) 137-146; N. K. KOCHETKOV ET A. F. BOCHKOV, *Carbohydr. Res.*, 9 (1969) 61-69.
- 4 E. R. RUCKEL ET C. SCHUERCH, *J. Org. Chem.*, 31 (1966) 2233-2239.
- 5 E. HUSEMANN ET G. J. MUELLER, *Makromol. Chem.*, 91 (1966) 212-230.
- 6 S. HAQ ET W. J. WHELAN, *J. Chem. Soc.*, (1956) 4543-4549; *Chem. Ind. (London)*, (1955) 600.
- 7 D. MCGRATH, E. E. LEE ET P. S. O'COLLA, *Carbohydr. Res.*, 11 (1969) 453-461.
- 8 N. K. KOCHETKOV, A. F. BOCHKOV ET J. G. YAZLOVETSKY, *Carbohydr. Res.*, 5 (1967) 243-244; A. F. BOCHKOV, I. V. OBRUCHNIKOV, V. M. KALINEVICH ET N. K. KOCHETKOV, *Tetrahedron Lett.*, (1975) 3403-3406.
- 9 V. A. NESMEYANOV, S. E. ZURABYAN ET A. YA. KHORLIN, *Tetrahedron Lett.*, (1973) 3213-3216.
- 10 G. EXCOFFIER, D. GAGNAIRE ET M. VIGNON, *Carbohydr. Res.*, 46 (1976) 201-213.
- 11 G. ZEMPLÉN ET A. GERECs, *Ber.*, 64 (1931) 1545-1554; H. M. FLOWERS, *Carbohydr. Res.*, 2 (1966) 188-196.
- 12 B. HELFERICH ET J. ZIRNER, *Chem. Ber.*, 95 (1962) 2604-2611.
- 13 M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS ET F. SMITH, *Nature*, 168 (1951) 167; *Anal. Chem.*, 28 (1956) 350-356.
- 14 S. HAKOMORI, *J. Biochem. (Tokyo)*, 55 (1964) 205-208.
- 15 O. S. CHIZHOV, N. K. KOCHETKOV, N. N. MALYSHEVA, A. I. SHIYONOK ET V. L. CHASCHIN, *Org. Mass Spectrom.*, 5 (1971) 1145-1155; 1157-1167.
- 16 D. GAGNAIRE, V. TRAN ET M. VIGNON, *Chem. Commun.*, 1 (1976) 6-7.
- 17 G. ZEMPLÉN, A. GERECs ET I. HADACsY, *Ber.*, 69 (1936) 1827-1829.