

SYNTHÈSE DE L'ACIDE 5-ACÉTAMIDO-3,5-DIDÉSOXY-4-*O*-MÉTHYL-D-*glycéro*-D-*galacto*-2-NONULOSONIQUE (ACIDE 4-*O*-MÉTHYL-N-ACÉTYLNEURAMINIQUE) PARTIE II*

JEAN-MARIE BEAU†, PIERRE SINAY‡

Laboratoire de Biochimie Structurale E R A 739, U E R de Sciences Fondamentales et Appliquées
45045 Orléans (France)

JOHANNIS P. KAMERLING ET JOHANNES F. G. Vliegenthart

Laboratoire de Chimie Organique, Université d'État d'Utrecht, Groesestraat 79,
Utrecht (Pays-Bas)

(Reçu le 25 mars 1977 - accepte sous forme modifiée le 31 octobre 1977)

ABSTRACT

3-Acetamido-3-deoxy-4,5,6,7-di-*O*-isopropylidene-D-*glycero*-D-*galacto*-heptose diethyl dithioacetal was transformed into 3-acetamido-3-deoxy-4,5,6,7-di-*O*-isopropylidene-2-*O*-methyl-aldehydo-D-*glycero*-D-*galacto*-heptose after *O*-methylation followed by desulfuration. A Wittig reaction with an excess of [ethoxy(ethoxycarbonyl)methylene]triphenylphosphorane in the presence of benzoic acid gave a mixture of ethyl 5-acetamido-3,5-dideoxy-2-*O*-ethyl-6,7,8,9-di-*O*-isopropylidene-4-*O*-methyl-D-*glycero*-D-*galacto*-non-2-enonate (23%) and the D-*glycero*-D-*talo* (22%) isomer. An ethoxymercuration-demercuration reaction, followed by acid hydrolysis, converted the former into ethyl 4-*O*-methyl-N-acetylneuraminate and the latter into the C-4 stereoisomer 4-*O*-Methyl-N-acetylneuraminic acid was then obtained in crystalline form and its structure ascertained by mass spectrometry and ¹H- and ¹³C-nuclear magnetic resonance.

SOMMAIRE

Le 3-acetamido-3-désoxy-4,5,6,7-di-*O*-isopropylidene-D-*glycero*-D-*galacto*-heptose diéthyl-dithioacétal est transformé en 3-acetamido-3-désoxy-4,5,6,7-di-*O*-isopropylidene-2-*O*-methyl-aldehydo-D-*glycero*-D-*galacto*-heptose par *O*-méthylation puis desulfuration. Une réaction de Wittig avec un excès de [éthoxy(éthoxycarbonyl)-

*Ce travail a bénéficié de subventions du Centre National de la Recherche Scientifique et de la Ligue Nationale Contre le Cancer. Une communication préliminaire a été présentée¹. Pour la partie I voir ref. 2.

†Boursier de la Ligue Nationale Française Contre le Cancer (1972-1973). Adresse actuelle: Biochemisches Institut im Fachbereich Medizin der Christian-Albrechts-Universität, 23 Kiel, Allemagne de l'Ouest.

‡Auquel doivent être adressées les demandes de renseignements ou de tirés-à-part.

méthylène]triphénylphosphorane en présence d'acide benzoïque conduit à un mélange de 5-acétamido-3,5-didésoxy-2-*O*-éthyl-6,7,8,9-di-*O*-isopropylidène-4-*O*-méthyl-D-glycéro-D-galacto-non-2-énonate d'éthyle (23 %) et de son isomère D-glycéro-D-talo (22 %). Une réaction d'éthoxymercuration-démercuration suivie d'une hydrolyse acide est effectuée sur ces deux isomères. Le premier est transformé en ester éthylique de l'acide 4-*O*-méthyl-*N*-acétylneuraminique, le second en stéréoisomère en C-4 de ce dernier. L'acide 4-*O*-méthyl-*N*-acétylneuraminique est ensuite obtenu à l'état cristallin et sa structure confirmée par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire- ^1H et ^{13}C .

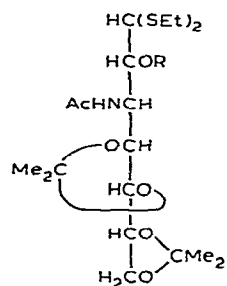
INTRODUCTION

Plusieurs méthodes d'accès aux acides 3-désoxy-aldulosoniques peuvent *a priori* être adaptées à la synthèse de l'acide 4-*O*-méthyl-*N*-acétylneuraminique. Si l'on choisit le 2-acétamido-2-désoxy-3,4,5,6-di-*O*-isopropylidène-aldéhyde-D-mannose³ comme aldéhyde de départ, la classique méthode de Kuhn et Baschang⁴ ne conduit pas aux résultats obtenus lorsque cet aldéhyde est condensé avec le sel de potassium du di(*tert*-butyl)oxaloacétate, aucun allongement de chaîne ne se produit et le seul dérivé isolé est un produit d'élimination le 2-acétamido-2,3-didésoxy-5,6-*O*-isopropylidène- α -D-érythro-hex-2-énofuranose³. Une adaptation des techniques de Kuhn *et al*⁵ et de Regna et de Caldwell⁶ nécessiterait la synthèse d'intermédiaires trop élaborés. Nous avons finalement eu recours à la méthode de Mirzayanova *et al*⁷ en utilisant comme produit de départ le 3-acétamido-3-désoxy-4,5,6,7-di-*O*-isopropylidène-D-glycéro-D-galacto-heptose diéthyl-dithioacetal (**1**) dont une synthèse a été publiée récemment². Une réaction similaire a été récemment effectuée pour réaliser une synthèse de l'acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique⁸.

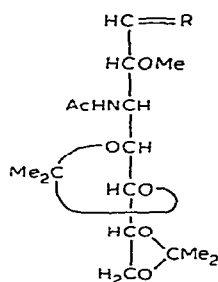
RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le 3-acétamido-3-désoxy-4,5,6,7-di-*O*-isopropylidène-D-glycéro-D-galacto-heptose diéthyl-dithioacetal² (**1**) est méthylé à 0° à l'aide d'iodure de méthyle dans le *N,N*-diméthylformamide en présence de baryte et d'hydroxyde de baryum octahydraté⁹. Dans ces conditions aucune alkylation sur les atomes de soufre ou d'azote n'est observée et l'éther monométhylique **2** est isolé à l'état cristallin avec un rendement d'environ 80 %. Sa désulfuration dans les conditions classiques donne quantitativement en 30 min l'aldéhyde amorphe **3** caractérisé par une semi-carbazone cristalline **4**.

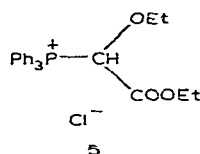
Le chlorure de [éthoxy(éthoxycarbonyl)méthyl]triphénylphosphonium (**5**) — qui servira à former l'ylide **6** nécessaire à la construction de la molécule — a été préparé par Engelhardt *et al*¹⁰, puis Mirzayanova *et al*¹¹. La méthode de ces derniers a été reprise, le 2-chloro-2-éthoxyacétate d'éthyle ayant été obtenu avec un excellent rendement par action¹² du pentachlorure de phosphore sur le 2,2-diéthoxyacétate d'éthyle¹³. Lorsque la réaction de Wittig entre le phosphorane **6** et l'aldéhyde **3** est



1 R = H
2 R = Me

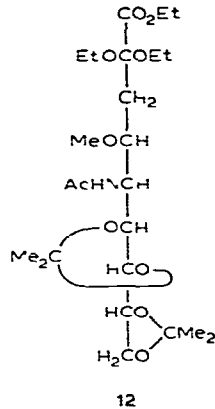
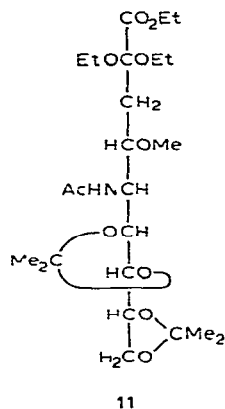
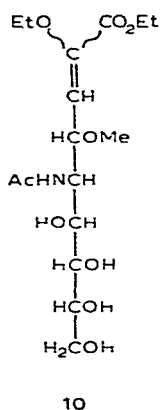
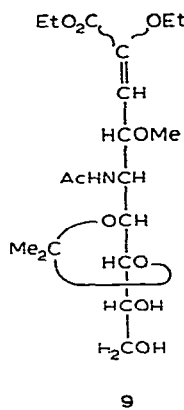
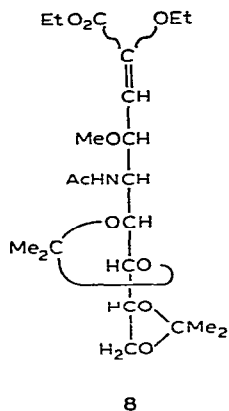
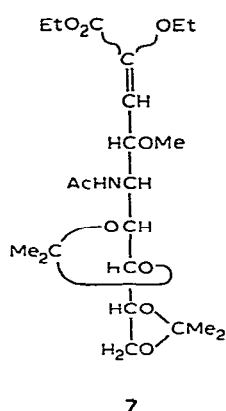


3 R = O
4 R = NNHCONH2

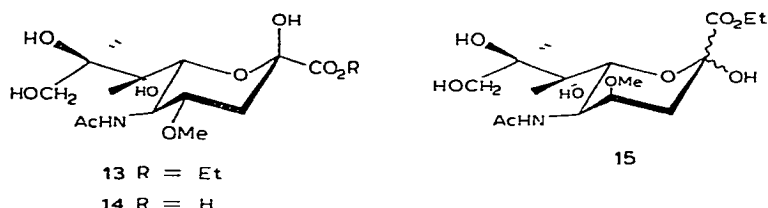


6

effectuée selon Mirzayanova *et al* ⁷, la condensation reste très incomplète, même après un temps prolongé de réaction. L'ylide 6 peut être considéré comme modérément stabilisé, la possibilité de délocalisation par résonance de la charge négative étant en partie compensée par la présence d'un groupement éthoxy. Nous pouvons donc attendre de cet ylides particulier une réactivité relativement faible, inférieure à celle d'un ylides du phosphore non stabilisé du type (alkoxyméthylène)triphenylphosphorane. Cependant nous avons pu obtenir une condensation satisfaisante en faisant agir un excès (5 equiv) d'ylide 6 sur l'aldéhyde 3 pendant 2 h à 70°, l'ylide lui-même étant formé au préalable, à 0°. De plus, l'addition d'acide benzoïque augmente très sensiblement le rendement en produits de condensation. Ce genre de catalyse, introduit par Ruchardt *et al* ¹⁴, permet une condensation entre un alkylidènephosphorane stabilisé et une cétone et est certainement dû à une protonation du groupement carbonyle. Dans les conditions optimales ainsi définies, la composition du milieu réactionnel (c c m avec le mélange éther diisopropylique-acétone, 3 l v/v) n'est néanmoins pas simple, six composés (A à F par ordre de R_F décroissants) étant présents. Le composé B (30%) cristallin, a été identifié avec le produit de condensation 7 attendu. L'analyse élémentaire ainsi que les données spectrales (1H et ^{13}C RMN), sont en accord avec une telle structure. Lors de la réaction de Wittig et surtout en présence d'acide benzoïque, une inversion partielle de configuration au niveau de l'atome de carbone voisin du groupement carbonyle peut se produire¹⁵. La réaction peut ainsi conduire à quatre isomères (configuration *Z* ou *E* au niveau de la double liaison, à laquelle s'ajoute la configuration *R* ou *S* au niveau de C-4). La configuration au niveau de C-4 de 7 a été déterminée sans ambiguïté après déprotection, comme nous le verrons plus loin. La configuration autour de la double liaison, dont la connaissance ne présente que peu d'intérêt dans le cadre de ce travail, n'a pas été déterminée. Le composé C (21%), également cristallin, a été identifié de la même façon avec 8, isomère du composé précédent, il a la configuration *D-glycéro-D-talo* et résulte d'une inversion de configuration au niveau de C-4. Son spectre ^{13}C RMN est pratiquement superposable à celui de 7. Quelques différences apparaissent dans le spectre de 1H RMN, en particulier pour les déplacements chimiques des deux protons éthyliques et allyliques (H-3 et H-4). Des éthers énoliques du type 7 et 8 ont été facilement hydrolysés par



Mirzayanova *et al*⁷⁻¹¹ a l'aide d'une solution saturée d'acide perchlorique dans de l'ether ethylique. Placé dans ces conditions, l'enol **7** donne un melange tres complexe non analysable. En presence de resine acide ou d'acide acetique aqueux, le derive mono-isopropylidene **9** a été formé selectivement, comme ce fut le cas avec le 3-acétamido-3-désoxy-4,5,6,7-di-*O*-isopropylidene-D-glucéro-D-galacto-heptose diethyl-dithioacétal². L'action de l'acide trifluoroacetique aqueux¹⁶ conduit immédiatement a l'enol éther **10**. Devant les difficultés d'hydrolyse de l'ether enolique **7** en milieu acide, ce composé a été soumis à une ethoxymercuration-démercuration selon une technique voisine de celle proposée par Inglis *et al*¹⁷. L'éthoxymercuration (acétate mercurique et ethanol) n'est effective qu'en présence d'une quantité catalytique d'acide perchlorique. La présence du groupement éthoxycarbonyl rend en effet assez difficile la formation de l'ion mercurinium intermédiaire, qui ne se fait que grâce à l'excellent catalyseur électrophile qu'est le perchlorate mercurique. C'est d'ailleurs ce groupement éthoxycarbonyl qui est vraisemblablement responsable de la résistance particulière de l'ether énolique **7** à l'hydrolyse acide. Le composé **11** est, sans caractérisation détaillée, aussitôt hydrolysé par de l'acide trifluoroacetique aqueux,



conduisant à l'ester éthylique de l'acide 4-*O*-méthyl-*N*-acétylneuraminique (**13**) isolé sous forme cristalline. Un traitement alcalin suivi d'une purification sur une colonne de résine Dowex 1 sous forme formate livre finalement l'acide 4-*O*-méthyl-*N*-acétylneuraminique cherché (**14**) à l'état cristallin. D'une façon similaire, l'éther enolique **8** est transformé en composé **15** cristallin après éthoxymercuration-démercuration suivie d'un traitement à l'acide trifluoroacétique. L'acide 4-*O*-méthyl-*N*-acétylneuraminique donne une forte réaction avec le réactif periodate-thiobarbiturate, dans les conditions décrites par Warren¹⁸. Le coefficient d'extinction molaire à 549 nm du colorant forme est supérieur à celui de l'acide *N*-acétylneuraminique, les spectres d'absorption étant identiques*.

*Étude structurale de 13, 14 et 15*¹⁹ — Il a été récemment montré par Kamerling *et al*¹⁹ que la spectrométrie de masse de dérivé *O*-triméthylsilylés d'acides sialiques substitués fournissait les informations nécessaires à la détermination du type et de la position des substituants. Les sept fragments caractéristiques (A–G) obtenus ici sont indiqués dans le Tableau I. D'après les résultats de ce tableau et en se rapportant au travail de Kamerling *et al*¹⁹, il est évident que les trois composés **13**, **14** et **15** sont méthyles sur le groupement hydroxyle en C-4. Les deux stéréoisomères **13** et **15** présentent les mêmes fragmentations.

La chiralité du C-4 des trois composés **13**, **14** et **15** dont l'établissement non ambigu est capital dans le cadre de cette étude, est facilement déduite de la résonance magnétique protonique (90, 220 et 300 MHz). Dans le cas de **13** et **14**, les valeurs trouvées (220 MHz) pour les constantes de couplage des trois protons H-3, H-3' et H-4 ($J_{3,3'} = 13,0$ Hz, $J_{3,4} = 11,0$ Hz et $J_{3',4} = 4,8$ Hz) sont compatibles avec une configuration D au niveau de C-4 (Schéma I). Les constantes de couplage $J_{4,5}$ (9,0 Hz) et $J_{5,6}$ (10,4 Hz) indiquent une conformation 2C_5 du cycle pyranique. Dans le cas de **15**, les valeurs trouvées (300 MHz) ($J_{3,3'} = 15,0$ Hz, $J_{3,4} = 3,2$ Hz et $J_{3',4} = 2,0$ Hz) sont compatibles avec une configuration L de C-4. De plus, alors que les spectres de **13** et **14** sont en faveur de la présence de pratiquement un seul anomère dans la solution, le spectre de **15** (300 MHz) suggère la présence des deux anomères dans un rapport 1/1. Une explication réside dans la forte interaction 1,3-diaxiale (du type O//O) présente dans ce cas dans l'anomère β , qui conduit à sa destabilisation au profit de l'anomère α ayant un groupement hydroxyle anomère équatorial.

*La mesure des coefficients d'extinction a été réalisée dans le laboratoire du Professeur R. Schauer (Kiel, Allemagne de l'Ouest). Le mécanisme de formation de la coloration sera commenté dans un prochain article (J. M. Beau et R. Schauer).

**Cette partie du travail a été effectuée par J. P. Kamerling et J. F. G. Vliegthart.

Reste à déterminer l'anométrie de l'acide 4-*O*-méthyl-*N*-acétylneuraminique et de son ester éthylique. Les études de ^{13}C -n m r montrent²⁰⁻²² que le déplacement chimique de C-2 n'est pas caractéristique d'une des deux formes anomériques de l'acide sialique. Par contre, l'allure des cinq signaux situés vers 70 p p m semble

TABLEAU I

FRAGMENTS CARACTERISTIQUES A-G EN SPECTROMETRIE DE MASSE UTILISES POUR L'IDENTIFICATION D'ACIDES 4-*O*-METHYL-*N*-ACÉTYLNEURAMINIQUES

Composé ^a	Fragments ^b						
	A	B	C	D	E	F	G
NeuAc ^c	668	624	478	298	317	205	173
13	624 (-44)	566 (-58)	434 (-44)	312 (+14)	273 (-44)	205 (0)	115 (-58)
14	610 (-58)	566 (-58)	420 (-58)	298 (0)	259 (-58)	205 (0)	115 (-58)
15	624 (-44)	566 (-58)	434 (-44)	312 (+14)	273 (-44)	205 (0)	115 (-58)

^aPour la spectrométrie de masse 13 et 15 sont triméthylsilylés selon Kamerling *et al*¹⁹, le composé 14 est transformé en son ester méthyle puis triméthylsilylé. ^bEntre parenthèses figurent les incréments par rapport aux valeurs de NeuAc. ^cValeurs empruntées à Kamerling *et al*¹⁹. NeuAc = Acide *N*-acétylneuraminique.



Schéma 1

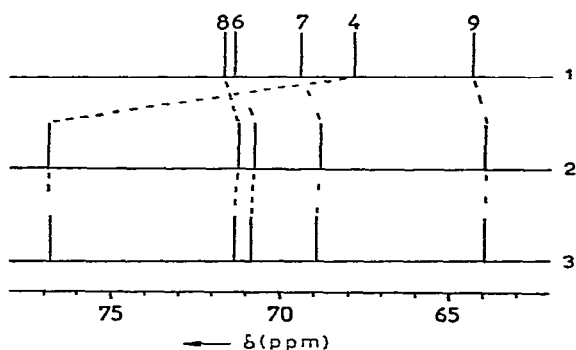


Fig 1 Corrélation des spectres de r m n - ^{13}C (voir Tableau II) de l'acide *N*-acétylneuraminique (1) de l'acide 4-*O*-méthyl-*N*-acétylneuraminique (2) et du 4-*O*-méthyl-*N*-acétylneuraminat d'éthyle (3). Les numéros au sommet des lignes correspondent aux atomes de carbone 1-9 de 1.

typique²³ des anomères α et β , aussi bien dans le méthanol- d_4 que dans l'eau- d_2 . Les déplacements chimiques des signaux ^{13}C de **13** et **14** sont donnés dans le Tableau II. Ils ont été calculés par rapport à une référence externe de tétraméthylsilane. Les valeurs trouvées pour l'acide *N*-acétylneuraminique sont identiques à celles publiées par Bhattacharjee *et al*.²¹ La Figure 1 montre la grande similitude de la région 70 p p m dans le cas des deux dérivés **13** et **14** et de l'acide *N*-acétylneuraminique, qui existe en solution sous la forme β , seul un pic a été déplacé de 9 p p m vers les champs faibles. Il s'agit de C-4, le remplacement d'un groupement hydroxyle par un groupement méthoxyle donnant lieu à un tel déplacement²⁴. Les signaux de C-3 et C-5 sont respectivement déplacés vers les champs forts d'environ 3,5 p p m et 2,2 p p m. Ces données confirment la substitution en C-4 et sont en faveur de l'anométrie β attendue pour **13** et **14** en solution aqueuse.

TABLEAU II

DONNÉES^a DE RMN- ^{13}C DE DIFFÉRENTS DÉRIVÉS DE L'ACIDE *N*-ACÉTYLNEURAMINIQUE DANS L'EAU LOURDE

Déplacement chimique	Acide <i>N</i> -acétylneuraminique		
	Non subst	Dérivé 4-O-méthyl	Ester éthylique du dérivé 4-O-méthyl
C-1	174,3	174,4	171,8
C-2	96,4	96,2	96,2
C-3	40,0	36,5	36,4
C-4	67,8	76,8	76,8
C-5	53,2	51,0	51,1
C-6	71,3	70,7	70,8
C-7	69,4	68,8	68,9
C-8	71,6	71,2	71,3
C-9	64,3	63,9	63,9
OMe		57,1	57,1
CH ₃ NAc	23,3	22,7	22,8
C=O	176,0	175,4	175,5
CH ₃ -CH ₂			13,9
CH ₃ -CH ₂			64,3

^aDéplacements chimiques (δ) indiqués en p p m par rapport au tétraméthylsilane (standard externe)

Finalement, une comparaison entre les spectres de dichroïsme circulaire des esters éthyliques **13** et **15** et les spectres issus de l'acide *N*-acétylneuraminique et de dérivés permet de déterminer sans ambiguïté que **13** possède la configuration de l'acide sialique. Cette étude sera présentée dans une prochaine publication.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Conditions générales — Voir ref. 2. De plus, les spectres de masse (70 eV) ont été enregistrés sur un spectromètre AEI-MS-902, les spectres de RMN- ^1H à 220 MHz

sur un spectromètre Varian HR-220 et à 300 MHz sur un spectromètre Varian HR-300 (TNO Laboratoire central, Delft, Bays-Bas) Les spectres de r m n - ^{13}C sont obtenus sur un spectromètre Varian XL-100-15 FT (25,16 MHz) Les spectres de dichroïsme circulaire sont mesurés avec un spectropolarimètre JASCO modèle 40 A (Department de Pharmacologie, Université de Kiel) en employant une cellule en quartz ayant un chemin optique de 0,1 cm Les ellipticités moléculaires (θ) ($\text{deg cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) sont calculées selon Adlet *et al* ²⁶ Les chromatographies en phase gazeuse (c p g) ont été effectuées au moyen d'un chromatographe Girdel (Modele 3000) muni d'un détecteur à ionisation de flamme et en utilisant une colonne en verre Pyrex de 3,40 m de 4% de OV-17 sur Gas-Chrom Q (80-100 mesh), avec un programme de 2° par min de 200° à 230°

3-Acétamido-3-désoxy-4,5,6,7-di-O-isopropylidène-2-O-méthyl-D-glycero-D-galacto-heptose diéthyl-dithioacétal (2) — Le 3-acétamido-3-désoxy-4,5,6,7-di-O-isopropylidène-D-glycero-D-galacto-heptose diéthyl-dithioacétal (1, 588 mg) est dissous dans du *NN*-diméthylformamide anhydre (13 ml), la solution étant agitée durant 2,5 h à 0° en présence de baryte (5,1 g) et d'hydroxyde de baryum octahydraté (1,28 g) De l'iodure de méthyle (0,17 ml) est ajouté et l'agitation est maintenue pendant 2,5 h à 0° Le milieu réactionnel est dilué avec du chloroforme (30 ml), les sels sont essorés et lavés avec du chloroforme L'évaporation du filtrat donne un résidu sirupeux colore Une chromatographie sur une colonne de gel de silice (30 g) à l'aide de benzène-acétate d'éthyle (1 l contenant 0,1 % de triéthylamine) donne 2 (545 mg, 90%), cristallisé dans de l'éther de pétrole (40-60°) (476 mg, 78,5%) p f 66-66,5°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -6,3^\circ$ (c 3,35, chloroforme) $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3320 (NH), 1660 (Amide I), 1520 cm^{-1} (Amide II)

Anal Calc pour $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_6\text{S}_2$ C 53,19 H 8,26 N, 3,10 S, 14,19 Trouve C, 53,37, H, 8,18 N, 3,20 S, 14,22

3-Acétamido-3-désoxy-4,5,6,7-di-O-isopropylidène-2-O-méthyl-aldehydo-D-glycero-D-galacto-heptose (3) — Une solution de 2 (828 mg) dans le mélange acétone-(33 ml)-eau (3,3 ml) est vigoureusement agitée pendant 30 min à température ambiante en présence d'oxyde mercurique jaune (2,8 g) et de chlorure mercurique (2,8 g) Les sels sont essorés, lavés avec de l'acétone et le filtrat évaporé Le résidu est chromatographié sur une colonne de gel de silice (18 g) à l'aide du mélange éther-acétone (13 l, v/v, contenant 0,1 % de triéthylamine), donnant l'aldehyde 3 (613 mg 97%) sous forme d'un sirop incolore $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -36^\circ$ (c 3,09 tétrachlorure de carbone) $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 3480 (NH), 1745 (C=O), 1695 (Amide I), 1510 cm^{-1} (Amide II)

Une analyse élémentaire satisfaisante n'a pu être obtenue pour cet aldehyde hygroscopique qui est caractérisé par la semi-carbazone cristalline décrite ci-dessous

Semi-carbazone du 3-acétamido-3-désoxy-4,5,6,7-di-O-isopropylidène-2-O-méthyl-D-glycero-D-galacto-heptose (4) — Une solution de l'aldehyde 3 (89 mg) dans de l'éthanol absolu (4 ml) contenant deux gouttes de pyridine et du chlorhydrate de semi-carbazide (30 mg) est chauffée à 45° pendant 15 min Le milieu réactionnel est chromatographié, après réduction du volume, sur une colonne de gel de silice (4 g) à l'aide de chloroforme-méthanol (9 l, v/v, contenant 0,1 % de triéthylamine), on isole

le dérive **4** (87 mg, 85 %) qui cristallise dans le mélange éther-éther de pétrole (40–60°) (79,3 mg, 76 %), p f 124–134° (fusion étalée et pâteuse), $[\alpha]_D^{20} +46^\circ$ (c 0,40, méthanol), $\nu_{\max}^{\text{CCl}_4}$ 3530 (NH₂), 3300–3240 (NH), 1700 (C=N), 1670–1650 (Amide I), 1650 (Amide II de NHAc), 1590 (Amide II de CONH₂)

Anal Calc pour C₁₇H₃₀N₄O₇ · 0,5 H₂O C, 49,63, H, 7,59, N, 13,62 Trouve C, 49,70 H, 7,53, N, 13,72

Chlorure d [éthoxy(éthoxycarbonyl)méthyl]triphenylphosphonium (5) — Le 2-chloro-2-éthoxyacetate d'éthyle¹² (3,65 g) est ajouté goutte à goutte à une solution de triphénylphosphine (8,6 g) dans du tétrahydrofurane anhydre (33 ml), la réaction étant effectuée selon Mirzayanova *et al*¹¹ Le sel de phosphonium **5** est ainsi obtenu (7,95 g 84 %), p f 132–135°, $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 1755 (ester), 1695, 750, 715 et 680 cm⁻¹ (Ph), litt¹¹ p f 127–129°

Anal Calc pour C₂₄H₂₆ClO₃P C, 67,21, H, 6,11 Cl, 8,27, P, 7,22 Trouvé C, 67,02, H, 6,19 Cl 8,55, P 7,21

Réaction de Wittig entre l'aldéhyde 3 et le phosphorane 6 — Une solution 1,43 M d'éthoxyde de sodium (42,7 ml, 61 mmol) est ajoutée à 0° et dans une atmosphère d'azote à une solution agitée de chlorure de phosphonium **5** (26,2 g 61 mmol) dans de l'éthanol anhydre (40 ml) Après 15 min, une solution de l'aldéhyde **3** (4,2 g, 12,2 mmol préalablement desséchée par plusieurs évaporations d'une solution benzenique) et d'acide benzoïque (400 mg) dans de l'éthanol anhydre (40 ml) est ajoutée goutte à goutte durant 15 min le milieu réactionnel étant maintenu à 70° Après 3 h d'agitation à cette température et évaporation des solvants, le résidu est extrait à l'aide d'un mélange éther-éther de pétrole (40–60°) (73, v/v, 200 ml) La phase organique est filtrée afin d'éliminer l'oxyde de triphénylphosphine et le solvant est évaporé Une chromatographie du résidu sur couche mince de gel de silice (éther diisopropylique-acétone 3/1, v/v) montre la présence de six composés A, B, C, D, E et F (par ordre de R_f décroissants) Ils sont séparés après plusieurs chromatographies sur colonne de gel de silice à l'aide du mélange éther diisopropylique-acétone (3/1 v/v, contenant 0,1 % de triéthylamine)

5-Acétamido-3,5-didesoxy-2-O-éthyl-6,7,8,9-di-O-isopropylidène-4-O-méthyl-D-glycéro-D-galacto-non-2-enonate d'éthyle (7) (produit B) — Les fractions pures de la chromatographie (1,70 g 29,4 %) sont cristallisées de l'éther de pétrole (40–60°) (1,35 g 23 %) p f 109–110° $[\alpha]_D^{20} +45^\circ$ (c 0,85, chloroforme) $\nu_{\max}^{\text{CCl}_4}$ 3480 (NH), 1735 (ester), 1690 (Amide I) 1650 (enol éther) et 1510 cm⁻¹ (Amide II), r m n (chloroforme-*d*) δ 1,26–1,42 (18 H, C-Me), 2,02 (3 H s, Ac) 3,40 (3 H, s, OMe), 4,75 (1 H, dd J_{3,4} 9 Hz J_{4,5} 1 Hz H-4) 5,97 (1 H NH) 6,13 (1 H, d, J_{3,4} 9 Hz H-3 éthylenique) le reste du spectre n'a pas été analysé, il comprend un massif complexe entre 3,90 et 4,80

Anal Calc pour C₂₂H₃₃NO₉ C 57,50, H, 8,12, N 3,05 Trouvé C, 57,72 H 8,24 N 3,24

5-Acétamido-3,5-didesoxy-2-O-éthyl-6,7,8,9-di-O-isopropylidène-4-O-méthyl-D-glycéro-D-talo-non-2-enonate d'éthyle (8) (produit C) — Les fractions pures de la chromatographie (1,25 g 21,6 %) sont cristallisées de éther-éther de pétrole (40–60°)

p f 89–94° (fusion pâteuse), $[\alpha]_D^{20} + 17^\circ$ (c 2,05, chloroforme), $\nu_{\max}^{\text{CCl}_4}$ 3480 (NH), 1735 (ester), 1685 (Amide I) et 1510 cm^{-1} (Amide II), r m n (chloroforme-*d*) δ 1,27–1,43 (18 H, C-Me), 2,02 (3 H, s, Ac), 3,38 (3 H, s, OMe), 4,59 (1 H, dd, $J_{3,4} 9 \text{ Hz}$, $J_{4,5} 3 \text{ Hz}$, H-4), 6,05 (1 H, d, $J_{\text{NH},\text{H}5} 8 \text{ Hz}$, NH), 6,45 (1 H, d, $J_{3,4} 9 \text{ Hz}$, H-3 éthylénique), le reste du spectre n'a pas été analysé

Anal Calc pour $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{NO}_9$ C, 57,50, H, 8,12, N, 3,05 Trouvé C, 57,55, H, 8,06, N, 3,09

Le composé D (100 mg, 1,7%) n'a pas été identifié Le composé E (850 mg, 20%) est identifié à l'aldéhyde de départ (3) Il est issu principalement de la décomposition, lors de la chromatographie sur colonne, du composé A qui n'a pu ainsi être isolé Le produit F est de l'oxyde de triphénylphosphine, qui n'a pas été totalement éliminé lors du traitement

5-Acétamido-3,5-didésoxy-2-O-éthyl-6,7-O-isopropylidène-4-O-méthyl-D-glycero-D-galacto-non-2-énonate d'éthyle (9) — Une solution de 7 (38,8 mg) dans le mélange *p*-dioxanne (2 ml)–eau (1 ml) est agitée pendant 3 h à température ambiante en présence de résine Dowex 50 W (X-4, 20–50 mesh, H^+ , ~1,3 g de résine humide) La résine est essorée et le filtrat évapore Le résidu (31 mg) est chromatographié sur une colonne de gel de silice (3 g) à l'aide de benzène–acétone (1 l, v/v, contenant 0,1% de triéthylamine), donnant 9 (27 mg, 71%), cristallisé de l'éther éthylique (23,7 mg, 67%), p f 148–149°, $[\alpha]_D^{20} + 30^\circ$ (c 0,74, méthanol), $\nu_{\max}^{\text{NuJol}}$ 3620–3400 (OH), 3350 (NH), 1735 (ester), 1665 (Amide I et énol-éther) et 1555 cm^{-1} (Amide II)

Anal Calc pour $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{NO}_9$ C, 54,40, H, 7,93, N, 3,34 Trouvé C, 54,28, H, 7,96, N, 3,25

5-Acétamido-3,5-didésoxy-2-O-éthyl-4-O-méthyl-D-glycero-D-galacto-non-2-énonate d'éthyle (10) — Le dérivé di-*O*-isopropylidène 7 (71 mg) est dissous dans le mélange acide trifluoroacétique–eau (9 l, v/v, 1 ml) et la solution est immédiatement évaporée sous vide Les traces d'acide sont éliminées par de nombreuses additions d'eau, suivies d'évaporation Le résidu chromatographie sur une colonne de gel de silice (4 g) à l'aide de chloroforme–méthanol (9 l, v/v) donne 10 (36,7 mg, 63%) qui cristallise de l'acétate d'éthyle (21,2 mg, 50%) p f 135,5–136,5°, $[\alpha]_D^{20} - 8,5^\circ$ (c 0,55, méthanol–eau, 4 l, v/v) $\nu_{\max}^{\text{NuJol}}$ 3320 (large bande, OH et NH) 1735 (ester), 1650 (Amide I, énol éther) et 1565 cm^{-1} (Amide II)

Anal Calc pour $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_9$ C, 50,65 H, 7,70, N, 3,69 Trouvé C, 50,59, H, 7,79, N, 3,79

4-O-Méthyl-N-acétylneuramate d'éthyle (13) — À une solution de 7 (550 mg) dans de l'éthanol absolu (5 ml) à -15° est ajoutée une solution éthanolique (25 ml) d'acétate mercurique (400 mg) contenant une quantité catalytique d'acide perchlorique (0,4 ml d'une solution éthanolique d'acide perchlorique à 0,6%) Après 3 h à 0° , le milieu réactionnel est refroidi à -20° Une solution aqueuse M d'hydroxyde de sodium (3,6 ml) et une solution aqueuse 0,17M de borohydrure de sodium (3,6 ml) sont ajoutées Au bout de 10 min, le milieu réactionnel est neutralisé (pH 7) à l'aide d'acide acétique à 4% (environ 7 ml), filtré et évapore Le résidu est dissous dans du chloroforme, et la solution obtenue est lavée avec de l'eau, séchée (MgSO_4) et le

solvant évapore Le diéthylacétal du 5-acétamido-3,5-didésoxy-6,7 8,9-di-O-isopropylidène-4-O-méthyl-D-glycéro-D-galacto-2-nonulosonate d'éthyle (**11**) est ainsi obtenu sous forme d'un sirop incolore (590 mg, 97,5%), ν_{\max}^{film} 3300 (NH), 1740 (ester), 1640 (Amide I), 1530 cm^{-1} (Amide II) Ce composé n'est pas caractérisé plus avant et est aussitôt dissous dans un mélange acide trifluoroacétique-eau (9 l, v/v, 10 ml), les solvants étant évaporés au bout de 30 min Les traces d'acide sont éliminées par plusieurs additions d'eau suivies d'évaporations, la solution aqueuse finale étant neutralisée jusqu'à pH 4 au moyen de résine Dowex 1 (X-2, 20-50 mesh, OH^-) La résine est ensuite essorée et le filtrat évapore, donnant un résidu solide blanc (278 mg, 66%) qui est cristallisé de eau-éthanol-éther éthylique, donnant l'ester **13** (160 mg, 38% par rapport à **7**), p f 198-201°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -21^\circ$ (c 0,36, eau), r m n - ^1H (D_2O , 90 MHz) δ 1,50 (3 H, t, J 7,5 Hz, CH_3CH_2), 2,00 (1 H, dd, $J_{3-3} 13$ Hz, $J_{3-4} 11$ Hz, H-3), 2,20 (3 H, s, Ac), 2,65 (1 H, dd, $J_{3-3} 13$ Hz, $J_{3'-4} 4,8$ Hz, H'-3), 3,50 (3 H, s, OMe), 4,40 (q, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$), le reste du spectre n'a pas été analysé r m n - ^{13}C (D_2O) voir Tableau II, d c [entre parenthèses figurent les valeurs des ellipticités moléculaires (θ) 10^{-3} a la longueur d'onde considérée] \nearrow 186 (o), 197,5 (+37, max), 205 (+3,15), 220 (épaule, +265), 250 (+0,3) nm [spectres pris en solution aqueuse (0,5-4 10^{-3}M) a la température ambiante]

Anal Calc pour $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_9$ C, 47,86, H, 7,17, N 3,99, O, 40,98 Trouve C, 47,47, H, 7,12, N, 4,06, O, 41,22

Après triméthylsilylation²⁵, un pic unique est obtenu en c p g, $t_{\text{NeuAc}} 1,20$

Acide 4-O-méthyl-N-acétylneuraminique (14) — *A* À partir de la résine basique avant servi à la préparation de **13** (voir ci-dessus) La résine Dowex 1 (X-2) est lavée avec de l'eau puis avec une solution 0,3M d'acide formique (300 ml) L'évaporation des éluants donne un résidu (108 mg) qui est purifié par chromatographie (colonne 22x0,9 cm) de résine Dowex 1 (X-8 100-200 mesh, HCO_2^-) avec élution par une solution 0,1M d'acide formique (100 ml) L'évaporation des fractions positives au test de Warren¹⁸ donne **14** à l'état pur (69,3 mg) il est cristallisé de isopropanol-eau (27,2 mg) noircissement à partir de 160°, pas de fusion nette, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -28,4^\circ$ (c 0,25, eau), r m n - ^1H (D_2O , 90 MHz) δ 1,85 (1 H, dd, $J_{3-3} 13$ Hz, $J_{3-4} 11$ Hz, H-3), 2,10 (3 H, s, Ac), 2,55 (1 H, dd, $J_{3-3} 13$ Hz, $J_{3-4} 4,8$ Hz, H'-3), 3,45 (3 H, s, OMe) spectre de r m n - ^{13}C (D_2O) voir Tableau II, d c 187 (-3,4), 191,5 (o), 195 (épaule, +2,9), 203 (+4,7, max) nm

Anal Calc pour $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_9$ C, 44,58, H, 6,59, N, 4,33 Trouve C, 44,38, H, 6,77, N, 4,44

Après triméthylsilylation²⁵ et injection immédiate, un pic unique est obtenu en c p g, $t_{\text{NeuAc}} 1,13$

Ce composé est positif au réactif periodate-thiobarbiturate, les conditions de la réaction étant essentiellement celles décrites par Warren¹⁸, avec extraction finale du colorant avec de la cyclohexanone Pour 100 μl d'une solution à doser d'acide 4-O-méthyl-N-acétylneuraminique, nous utilisons 20 μl d'une solution d'acide periodique (H_3PO_4 , 75 ml, H_2O , 25 ml, H_5IO_6 , 5,7 g), 200 μl d'une solution d'arsénite de sodium (5 g d'arsénite de sodium et 100 ml d'une solution 0,5M de

sulfate de sodium) et 200 μ l d'une solution d'acide thiobarbiturique (0,9 g d'acide thiobarbiturique dans 100 ml d'une solution 0,5M de sulfate de sodium) Le colorant est extrait avec 500 μ l de cyclohexanone À 549 nm, le coefficient d'absorption molaire est égal à 74 000 Dans les mêmes conditions, l'acide *N*-acétylneuraminique donne ϵ 52 000

B À partir de 11 — Le dérivé di-*O*-isopropylidène **11** (80 mg) est dissous dans le mélange acide trifluoroacétique-eau (9 l, v/v, 1 ml), la solution étant immédiatement évaporée Les traces d'acide sont éliminées par plusieurs additions d'eau suivies d'évaporations Le résidu est traité pendant 20 min avec une solution 0,1M d'hydroxyde de sodium (5 ml), à température ambiante Le milieu réactionnel est neutralisé avec un excès de résine Dowex 50 W (X-4, 50–100 mesh, H^+), la résine est essorée et lavée avec de l'eau Le filtrat est évaporé et le résidu (45 mg) est purifié par chromatographie à l'aide d'une colonne (17 \times 0,9 cm) de résine Dowex 1 (X-8, 100–200 mesh, HCO_2^-) et elution à l'aide d'un gradient linéaire d'acide formique (de 0,1M à 0,5M) Les fractions donnant un test positif à la réaction de Warren¹⁸ sont rassemblées et évaporées, donnant **14** (13 mg, 25,5%), identique au dérivé préparé par la méthode A

5-Acétamido-3,5-didesoxy-4-O-méthyl-D-glycero-D-talo-2-nonulosonate d'éthyle (15) — Le composé **8** (635 mg) est traité comme décrit pour la préparation de **15** Après ethoxymercuration-démmercuration, le diéthylacétal du 5-acétamido-3,5-didesoxy-6,7,8,9-di-*O*-isopropylidène-4-*O*-méthyl-D-glycero-D-talo-2-nonulosonate d'éthyle (**12**) est obtenu sous forme d'un sirop incolore (640 mg, 92%), r m n (chloroforme-*d*) δ 1,22–1,45 (21 H, m, C-Me), 1,98 (3 H, s, Ac), 2,18 (2 H, d, J_{3-4} 6,5 Hz, H-3 et H-3'), 3,30 (3 H, s, OMe), 3,40–3,68 (6 H, m, $O-CH_2CH_3$), 4,50 (1 H, o, J_{4-5} 3 Hz, J_{5-6} 7 Hz, J_{NH-H5} 9 Hz, H-5), 5,72 (1 H, d, NH) Ce composé n'a pas été caractérisé plus avant et est aussitôt hydrolysé pendant 10 min avec le mélange acide trifluoroacétique-eau (9 l, v/v, 10 ml) à température ambiante La solution est évaporée, les traces d'acide étant éliminées par plusieurs additions d'eau puis de mélange eau-méthanol-toluène, suivies d'évaporations puis finalement par neutralisation à 0° à l'aide de résine Dowex 1-X 8 (20–50 mesh, CO_3^{2-}) La résine est essorée, lavée avec de l'eau et le filtrat évaporé Le résidu (348 mg) est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice (13 g) à l'aide de chloroforme-éthanol (6 l, v/v), donnant l'ester **15** (100 mg, 24,5%), cristallise dans acétate d'éthyle-éther. p f 112,5–113,5°, suivi d'une résolidification et d'une nouvelle fusion à 158–160° $[\alpha]_D^{20} -103^\circ$ (c 0,17, eau) Le spectre de r m n a été enregistré à 300 MHz dans l'eau lourde sans référence interne La partie à haut champ montre un doublement des signaux OMe, Ac, H-3, H'-3 et CH_3-CH_2 , on en déduit la présence des deux anomères α et β en solution aqueuse, J_{3-3} 15,0 Hz, J_{3-4} 3,2 Hz, J_{3-4} 2,0 Hz D c λ 185 (–31,2), 203 (o), 212 (+8,2, max) nm

Anal Calc pour $C_{14}H_{25}NO_9$ C, 47,86, H, 7,17, N, 3,99 Trouve C, 47,91, H, 7,16, N, 4,07

Après triméthylsilylation²⁵, le produit est homogène en c p g, t_{NeuAc} 1,20

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Docteur J Preuner (Département de Pharmacologie Université de Kiel, Allemagne de l'Ouest), dans le laboratoire duquel des études détaillées de dichroïsme circulaire ont pu être réalisées. Le Professeur Brossmer est remercié pour la communication personnelle de mesures de dichroïsme circulaire aimablement effectuées sur différents dérivés.

RÉFÉRENCES

- 1 J-M BEAU ET P SINAY, *Actual Chim* (1975) 48
- 2 J-M BEAU ET P SINAY, *Carbohydr Res*, 65 (1978) 1-10
- 3 J-M BEAU, P ROLLIN ET P SINAY *Carbohydr Res*, 53 (1977) 187-195
- 4 R KUHN ET G BASCHANG, *Justus Liebigs Ann Chem*, 659 (1962) 156-163
- 5 R KUHN, D WEISER ET H FISCHER *Justus Liebigs Ann Chem*, 628 (1959) 207-239
- 6 P P REGNA ET B P CALDWELL *J Am Chem Soc* 66 (1944) 243-244
- 7 M N MIRZAYANOVA, L P DAVYDOVA ET G SAMOKHVALOV, *J Gen Chem USSR*, 40 (1970) 663-666
- 8 E HELLWIG, H BERNER ET F M UNGER *Int Symp Carbohydr Chem* 8 (1976) 4D-7
- 9 R KUHN ET H TRISCHMANN, *Chem Ber*, 94 (1961) 2258-2263
- 10 M ENGELHARDT, M PLIENINGER ET P SCHREIBER, *Chem Ber* 97 (1964) 1713-1715
- 11 M N MIRZAYANOVA, L P DAVYDOVA ET G I SAMOKHVALOV, *Dokl Akad Nauk USSR* 173 (1967) 367-369
- 12 B MYLO *Ber* 44 (1911) 3211-3215
- 13 H GROSS ET J FREIBERG, Brevet allemand 1 274 102, *Chem Abstr*, 70 (1969) 3274x
- 14 C RICHARDT, S EICHLER ET P PANSE, *Angew Chem Int Ed Engl* 2 (1963) 619
- 15 J M J TRONCHET ET J M CHALET *Carbohydr Res*, 24 (1972) 263-281
- 16 J E CHRISTENSEN ET L GOODMAN, *Carbohydr Res* 7 (1968) 510-512
- 17 G R INGLIS, J C P SCHWARTZ ET L MCLAREN, *J Chem Soc* (1962) 1014-1019
- 18 L WARREN *J Biol Chem* 234 (1959) 1971-1975
- 19 J P KAMERLING, J F G Vliegenhart, C VERSLUIS ET R SCHAUER, *Carbohydr Res* 41 (1975) 7-17
- 20 J HAVERKAMP, R SCHAUER, M WEMER, J P KAMERLING ET J F G Vliegenhart *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 356 (1975) 1575-1583
- 21 A K BHATTACHARJEE, H J JENNINGS, C P KENY, A MARTIN ET I C P SMITH *J Biol Chem* 250 (1975) 1926-1932
- 22 V ESCHENFELDER, R BROSSMER ET H FRIEBOLIN *Tetrahedron Lett* (1975) 3069-3072
- 23 J P KAMERLING ET J F G Vliegenhart, résultats non publiés
- 24 D E DORMAN ET J D ROBERTS *J Am Chem Soc*, 92 (1970) 1355-1361
- 25 H P BUSCHER, J CASALS-STENZEL ET R SCHAUER *Eur J Biochem*, 50 (1974) 71-82
- 26 A J ADLER, N J GREENFIELD ET G D FASMAN, *Methods Enzymol* 27 Part D (1973) 675-735