

Note**Dérivés asymétriques du tréhalose.****II.*† Synthèse, conformation et affinité tréhalasique
du 6-désoxy- α,α -tréhalose****E. R. GUILLOUX,***Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Pharmacie, Paris (France)***J. DEFAYE,***Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Centre National de la Recherche Scientifique, Domaine Universitaire, CEDEX 53, 38-Grenoble (France)***R. H. BELL ET D. HORTON***Department of Chemistry, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210 (U. S. A.)*

(Reçu le 13 mai 1971; accepté le 11 juin 1971)

INTRODUCTION

Des travaux antérieurs¹⁻⁴ mentionnent l'intérêt, pour l'étude des tréhalases, des dérivés du tréhalose modifiés sur un seul des restes α -D-glucopyranosyle. Bien qu'un certain nombre de dérivés, monosubstitués^{1,2,5,6} ou modifiés⁷ sur un seul cycle du tréhalose, aient été préparés, la synthèse du 6-désoxy- α,α -tréhalose (3) restait un objectif essentiel, les facteurs stériques ne pouvant, comme dans le cas des dérivés monosubstitués⁴, être invoqués en cas d'inactivité de l'enzyme.

La préparation du 6-désoxy- α,α -tréhalose (3) a déjà été tentée⁶ sans succès, soit par réduction à l'aide de l'hydrure de lithium et d'aluminium du monosulfonate primaire correspondant, soit par clivage réductif des dérivés iodés ou thiocyanés sur ce même carbone. En particulier, l'utilisation du nickel de Raney d'activité W-2 pour la réduction du dérivé monoiodé avait, de même que les autres méthodes, uniformément conduit au 3,6-anhydro- α,α -tréhalose, bien que l'utilisation dans les mêmes conditions d'un nickel de Raney commercial d'activité non précisée ait conduit Birch⁸, partant du 2,2',3,3',4,4'-hexa-O-acétyl-6,6'-didésoxy-6,6'-diido- α,α -tréhalose, au dérivé didésoxy attendu.

Le présent travail a pour objet d'une part une réinvestigation de ce problème, et rapporte la synthèse du 6-désoxy- α,α -tréhalose (3) par deux méthodes distinctes, d'autre part l'étude de l'affinité tréhalasique de ce composé, seul dérivé du tréhalose qui soit, jusqu'à présent, un substrat pour la tréhalase.

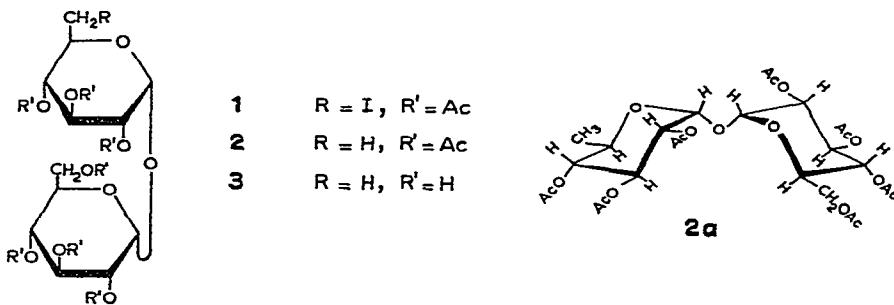
*Première partie, voir Réf. 6.

†Une partie de ce travail a fait l'objet d'une communication orale, E. Guilloux, J. Defaye et F. Percheron, (*Symposium sur le tréhalose, Paris, 24 août 1970*).

RÉSULTATS

La réduction du 2,2',3,3',4,4',6'-hepta-*O*-acétyl-6-désoxy-6-iodo- α,α -tréhalose (**1**), tentée dans les mêmes conditions qu'antérieurement⁶, mais avec un nickel de Raney commercial*, a conduit avec un rendement satisfaisant à un seul composé identifié au 2,2',3,3',4,4',6'-hepta-*O*-acétyl-6-désoxy- α,α -tréhalose (**2**). Devant ce résultat, des essais systématiques ont été répétés avec le nickel de Raney⁹ d'activité W-2 sur les dérivés monoiodés **1** et diiodés¹⁰, et ont permis de reproduire les résultats décrits par ailleurs^{6,8}. Il semble par conséquent que la réactivité vis-à-vis du nickel de Raney des dérivés monoiodés et diiodés du tréhalose ne soit pas identique, et que d'autre part la qualité du catalyseur utilisé joue un rôle essentiel.

On sait enfin que la photolyse de dérivés halogénés est une bonne voie d'accès aux désoxysucres^{11,12}. Ce type de réaction est supposé minimiser les interactions du groupe hydroxyle en C-3 sur le dérivé monoiodé **1** lors du clivage du radical halogéné. Il a été appliqué avec succès et a conduit avec un rendement satisfaisant au 6-désoxy- α,α -tréhalose isolé sous la forme de son dérivé peracétylé **2** et identique en tous points au composé préparé précédemment par clivage réductif à l'aide du nickel de Raney.



La désacétylation selon Zemplén du dérivé peracétylé **2** conduit avec un rendement quantitatif au 6-désoxy- α,α -tréhalose (**3**) isolé sous la forme d'un hydrate cristallisant avec une molécule d'eau.

On connaît l'importance des conformations moléculaires lors des réactions enzyme-substrat. On peut logiquement attendre, comme cela a été montré dans le cas des octa-*O*-acétyl- α,α -tréhalose⁶ et 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-acétyl-6,6'-didésoxy- α,α -tréhalose¹³, une conformation *C1* (*D*) (**2a**) pour les deux systèmes cycliques. Toutefois cette conformation a été précisée par une étude à 100 MHz du spectre de r.m.n. du 2,2',3,3',4,4',6'-hepta-*O*-acétyl-6-désoxy- α,α -tréhalose (**2**). Ce spectre[†] (Fig. 1) montre deux systèmes de signaux nettement différenciés et globalement superposables,

*Nickel activé selon Raney, Réf. 25.820, Prolabo (Paris).

[†]Ce spectre a été réalisé au Centre d'Études Nucléaires de Grenoble (Service de Chimie Organique Physique) grâce à l'obligeance du Professeur D. Gagnaire que nous remercions également pour une discussion d'ensemble de ce problème.

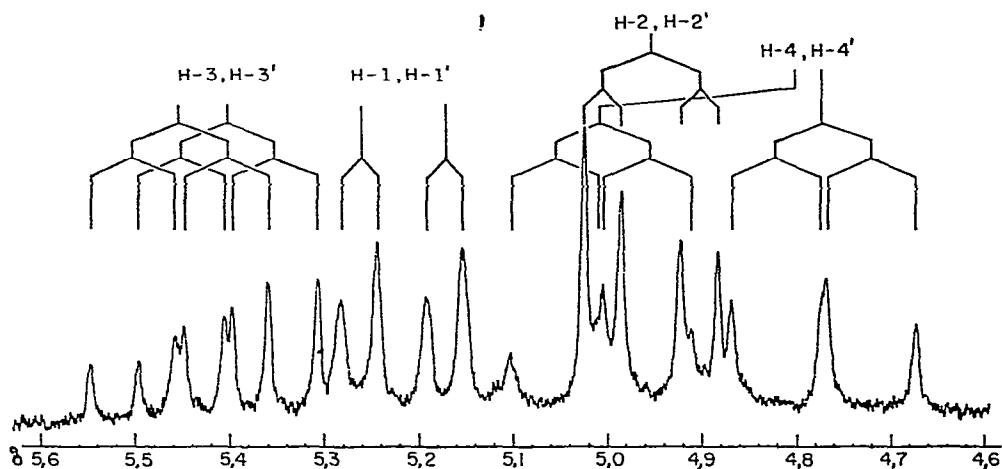


Fig. 1. Partie à champ faible du spectre de r.m.n. du 2,2',3,3',4,4',6'-hepta-O-acétyl-6-désoxy- α,α -tréhalose (2).

respectivement, aux spectres obtenus pour l'octa-*O*-acétyltréhalose et le 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-acétyl-6,6'-didésoxytréhalose. Les couplages $J_{1,2}$ et $J_{1',2'}$ de 3,8 Hz (δ 5,26 et 5,17 p.p.m., H-1 et H-1') confirment la configuration anomérique α,α . Entre δ 5,45 et 4,77 p.p.m. les protons en C-2, C-3 et C-4 des deux hétérocycles produisent bien les signaux attendus tous différenciés et interprétables (voir partie expérimentale). On remarque entre δ 4,31 et 3,79 p.p.m. des massifs de multiplets de 4 protons attribuables aux hydrogènes en C-5 et C-5' et les signaux du groupement CH_2 en C-6. Entre 2,06 et 2,00 p.p.m., un massif de singulets, chacun de 3 protons faiblement différenciés, est donné par les groupements acétoxy équatoriaux. On se souvient⁶ que le 2,2',3',4,4',6'-hexa-*O*-acétyl-3,6-anhydro- α,α -tréhalose montre, dans le même solvant et dans la même région du spectre, six singulets de 18 protons dont deux nettement différenciés par un déplacement de 0,13 p.p.m. à champ faible, ce qui avait conduit, conjointement avec l'application des règles d'Hudson, à attribuer la conformation *C1* (D)-*IC* (D) pour ce composé, résultat récemment confirmé¹⁴ par l'étude à haut champ du spectre de l'analogue dianhydro du tréhalose. À 1,19 p.p.m., un doublet de 3 protons est attribuable au méthyle porté par le carbone 5'.

L'affinité tréhalasique a été étudiée sur la tréhalase de *Pseudomonas* et sur la tréhalase de henneton en utilisant les conditions opératoires optimales pour ces deux enzymes. Les résultats indiquent que, bien que l'affinité des tréhalases soit dans les deux cas inférieure aux résultats obtenus par le tréhalose, le dérivé monodésoxy 3 constitue bien néanmoins un substrat pour les tréhalases.

Rappelons que, jusqu'ici, l'action des tréhalases sur un dérivé modifié du tréhalose n'avait pas été démontrée; le 6,6'-didésoxy- α,α -tréhalose n'est lui-même pas attaqué par l'enzyme¹⁵. Dans les mêmes conditions ont été testés également le 2-*O*-*p*-tolylsulfonyl- α,α -tréhalose, l' α -D-glucopyranosyl-2,3-anhydro- α -D-mannopyra-

noside, les 3-azido- et 3-amino- α -D-altropyranosyl- α -D-glucopyranoside*. Ces composés sont sans affinité pour les tréhalases utilisées.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthodes générales. — Les solutions ont été concentrées sous pression réduite à l'aide d'évaporateurs rotatifs « Büchi » à des températures ne dépassant pas 40°. La pureté de tous les composés a été vérifiée par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Les réactions ont été suivies sur ces mêmes plaques. Les microanalyses élémentaires ont été réalisées par le Laboratoire Central de Microanalyse du C.N.R.S. Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide du « Quick Polarimètre » de Roussel et Jouan. Le spectre de r.m.n. a été établi en solution dans le chloroforme-*d* sur un appareil HA-100 « Varian » par M. Nardin. Les déplacements chimiques (δ) sont mesurés à partir de la raie du tétraméthylsilane prise comme zéro de référence.

2,2',3,3',4,4',6'-Hepta-O-acétyl-6-désoxy- α , α -tréhalose (2). — (a) *Par action du nickel de Raney sur le dérivé monoiodé 1.* Le 2,2',3,3',4,4',6'-hepta-O-acétyl-6-désoxy-6-iodo- α , α -tréhalose⁶ (1) (505 mg, 0,676 mmole) dissous dans le méthanol (25 ml) est additionné de diéthylamine (75 μ l, 0,727 mmole) et hydrogéné à pression ordinaire en présence de nickel de Raney (250 mg) (produit commercial Prolabo conservé sous eau, sans spécification d'activité). Après quatre heures d'agitation, la quantité théorique d'hydrogène (15 ml, 0,676 mmole) est consommée. Le catalyseur est alors éliminé par filtration et le filtrat concentré sous pression réduite. Le résidu est repris par le chloroforme (30 ml) et la solution chloroformique, lavée par l'eau à trois reprises, et séchée, conduit après évaporation à une huile (243 mg, 59%) qui cristallise dans l'éthanol, p.f. 89–90°, $[\alpha]_D^{20} + 184^\circ$ (*c* 1, chloroforme); spectre de r.m.n. (100 MHz) (Fig. 1) : δ 5,45 d de d et 5,40 d de d ($J_{2,3} = J_{2',3'} = 10,2$ Hz, $J_{3,4} = J_{3',4'} = 9,0$ Hz, H-3, H-3'), 5,26 d et 5,17 d ($J_{1,2} = J_{1',2'} = 3,8$ Hz, H-1, H-1'), 4,77 d de d et 5,01 d de d ($J_{4,5} = J_{4',5'} = 10,0$ Hz, H-4, H-4'), 4,31–3,79 m de 4 protons (H-5, H-5', CH₂), 2,06 s, 2,05 s de 6 protons, 2,03 s, 2,025 s, 2,005 s, 2,00 s (OAc) et 1,17 d ($J_{5',6'} = 6,4$ Hz, CH₃).

Anal. Calc. pour C₂₆H₃₆O₁₇ : C, 50,32; H, 5,80. Trouvé : C, 50,42; H, 5,87. (b) *Par photolyse du dérivé monoiodé 1.* Le composé 1 (647 mg) est partiellement dissous dans le méthanol absolu (25 ml) et additionné d'hydroxyde de potassium (113 mg). La dissolution de 1 est complète après 5 min d'agitation à température ambiante. La solution est alors soumise à la photolyse pendant 3,5 h avec une lampe à vapeur de mercure (Hanovia type L, modèle 679 A, équipée d'un système de refroidissement par eau). Un courant d'azote continu est introduit dans la solution pendant toute la durée de l'essai. Après évaporation du méthanol, le résidu est dissous dans la pyridine (30 ml) et la solution additionnée d'anhydride acétique (5 ml) est agitée à température ambiante pendant deux jours. Le mélange réactionnel est alors

*Ces quatre composés ont été préparés dans le laboratoire du Dr. A. C. Richardson, Queen Elizabeth College, et nous ont été aimablement transmis pour ces essais.

versé dans l'eau glacée et agité pendant 4 h. L'huile qui se forme est séparée par décantation de la solution aqueuse et dissoute dans le dichlorométhane. La solution est lavée par l'hydrogénocarbonate de potassium aqueux, séchée et évaporée. Le résidu sirupeux (294 mg, 54,9%) présente essentiellement un seul composant par c.c.m. La cristallisation dans l'éthanol absolu conduit à des aiguilles dont les constantes physiques et le spectre de r.m.n. sont en tous points identiques à ceux du composé décrit sous (a).

6-Désoxy- α,α -tréhalose (3). — Le dérivé péracétylé précédent 2 (145 mg, 0,234 mmole) est dissous dans une solution méthanolique (10 ml) de méthanolate de sodium (0,2M). Après 12 h, le méthanolate en excès est décomposé par addition d'eau (5 ml) et la solution hydro-alcoolique débarrassée des cations minéraux par agitation avec une résine échangeuse (Dowex-50W X8, 20-50 mesh). L'acide acétique résiduel est éliminé par agitation en présence de résine échangeuse Permutit « Biodeminrolit ». L'évaporation de la solution conduit à un composé vitreux qui est repris par l'eau (60 mg). La lyophilisation de la solution donne une poudre hygroscopique, p.f. 115-117°, $[\alpha]_D^{24} + 155^\circ$ (*c* 0,45, eau).

Anal. Calc. pour $C_{12}H_{22}O_{10} \cdot H_2O$: C, 41,86; H, 7,02. Trouvé : C, 41,89; H, 6,95.

Par dessiccation à 80° pendant 8 h sous une pression de 0,01 mm de mercure, le 6-désoxy- α,α -tréhalose (3) perd son eau de cristallisation; p.f. 116-118°, $[\alpha]_D^{25} + 166,5^\circ$ (*c* 0,51, eau).

Anal. Calc. pour $C_{12}H_{22}O_{10}$: C, 44,17; H, 6,79. Trouvé : C, 44,35; H, 6,75.

Essai comparatif de l'activité de la tréhalase de haneton sur le tréhalose et le 6-désoxytréhalose. — Le milieu réactionnel (0,2 ml) est composé de tampon McIlvaine (20MM, pH 6,25), 17,5 μ g de protéine enzymatique purifiée⁴ et de concentrations variables de tréhalose ou de 6-désoxy- α,α -tréhalose (10MM, 5MM, 2,5MM, 1,25MM, 0,625MM et 0,312MM). L'incubation est d'une heure à 37° pour le 6-désoxy- α,α -tréhalose et de 0,5 h à 37° pour le tréhalose. Le D-glucose libéré est dosé par la D-glucose oxydase (Boehringer, degré de pureté I, dépourvue d'activité tréhalasique et α -D-glucosidasique). Ces conditions conduisent à une constante de Michaelis de 2,0MM pour le 6-désoxy- α,α -tréhalose et de 0,6MM pour le tréhalose, avec des v_{max} (exprimées en μ moles de substrat hydrolysé par min et par mg de protéine enzymatique) de 0,304 pour le tréhalose et de 0,03 pour le 6-désoxy- α,α -tréhalose.

Essai comparatif d'activité de la tréhalase de Pseudomonas sur le tréhalose et le 6-désoxy- α,α -tréhalose. — Le milieu réactionnel (0,3 ml) est composé du tampon phosphate monosodique-phosphate disodique (2,0MM, pH 6,45), 4,7 μ g de protéine purifiée^{1,6} et de concentrations variables de tréhalose ou de 6-désoxy- α,α -tréhalose (80MM, 40MM, 20MM, 10MM, 5MM et 2,5MM). L'incubation est de 3 h à 28° pour les deux substrats. Comme dans le cas précédent, le D-glucose libéré est dosé par la méthode à la D-glucose oxydase. La constante de Michaelis obtenue dans ces conditions est de 40MM pour le 6-désoxy- α,α -tréhalose et de 20MM pour le tréhalose. Les v_{max} sont de 1,166 pour le tréhalose et 0,233 pour le 6-désoxy- α,α -tréhalose.

Essais d'hydrolyse des 2-O-p-tolylsulfonyl- α,α -tréhalose, α -D-glucopyranosyl-

2,3-anhydro- α -D-mannopyranoside, 3-azido- et 3-amino- α -D-altropyranosyl- α -D-glucopyranoside. — (a) *Avec la tréhalase de Pseudomonas.* Le milieu réactionnel est constitué de tampon phosphate monosodique-disodique (pH 6,5, 10MM, 0,05 ml), de protéine enzymatique purifiée¹⁶ (0,1 ml, 3,9 μ g) et de substrat (0,2M, 0,1 ml). Les témoins renferment de l'eau distillée (0,1 ml) à la place de la solution enzymatique. L'incubation est réalisée à 28°.

(b) *Avec la tréhalase de henneton.* Le milieu réactionnel renferme l'enzyme purifiée⁴ (17,5 μ g) en solution dans le tampon précédent (0,1 ml) et le substrat (0,1M, 0,1 ml). Les témoins substrats renferment de l'eau distillée (0,1 ml) à la place de la solution enzymatique. L'incubation est réalisée à 37°.

Dans les deux cas, le D-glucose éventuellement libéré est dosé par le réactif à la D-glucose oxydase sur le prélèvement (0,1 ml) réalisé après des temps de 1 h et de 24 h d'incubation. Les résultats sont contrôlés de façon systématique par des chromatographies sur papier [solvant alcool butylique-pyridine-eau (9:5:4); papier « Schleicher & Schüll » 2043 b Mgl]. Ces essais ne montrent aucune libération de glucose avec les composés mentionnés.

RÉFÉRENCES

- 1 B. HELFERICH ET F. VON STRYK, *Ber.*, 74 (1941) 1794.
- 2 F. PERCHERON ET E. GUILLOUX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1964) 543.
- 3 J. E. COURTOIS, F. PERCHERON ET E. GUILLOUX, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 266 (1967) 2111.
- 4 E. GUILLOUX, J. E. COURTOIS ET F. PERCHERON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 1915.
- 5 R. ROBINSON ET W. T. J. MORGAN, *Biochem. J.*, 22 (1928) 1277.
- 6 E. R. GUILLOUX, F. PERCHERON ET J. DEFAYE, *Carbohyd. Res.*, 10 (1969) 267.
- 7 F. ARCAMONE ET F. BIZIOLI, *Gazz. Chim. Ital.*, 87 (1957) 896; S. FUKUI ET R. M. HOCHSTER, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41 (1963) 2363.
- 8 G. G. BIRCH, *J. Chem. Soc., C*, (1966) 1072.
- 9 R. MOZINGO, *Org. Syn., Coll. Vol.*, 3 (1955) 181.
- 10 H. BREDERECK, *Ber.*, 63 (1930) 959.
- 11 W. W. BINKLEY ET R. W. BINKLEY, *Carbohyd. Res.*, 11 (1969) 1.
- 12 R. H. BELL, Ph. D. Dissertation, The Ohio State University, 1970.
- 13 G. BIRCH ET A. C. RICHARDSON, *Carbohyd. Res.*, 8 (1968) 411.
- 14 G. BIRCH, C. K. LEE ET A. C. RICHARDSON, *Carbohyd. Res.*, 16 (1971) 235.
- 15 M. A. ARCILA, J. E. COURTOIS, E. GUILLOUX ET V. MOUMRIKOFF, *Biochimie*, à paraître.
- 16 M. A. ARCILA, E. GUILLOUX ET J. E. COURTOIS, *C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, 267 (1968) 1779.