

## OBTENTION ET ÉTUDE DE TROIS $O$ - $\alpha$ -D-MANNOPYRANOSYL-D-RIBOSES\*

A. ZUROWSKA, E. VILLARROYA ET F. PETEK

*Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris et Équipe de Recherche Associée « Osides et Osidases » du C N R S, 4, Avenue de l'Observatoire, Paris-VI (France)*

(Reçu le 22 novembre 1971, accepté après modification le 28 décembre 1971)

### ABSTRACT

In addition to being a hydrolase, an  $\alpha$ -D-mannosidase from *Vicia sativa* seeds is able to transfer the D-mannose residue from phenyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside to ketohexoses and pentoses. With D-ribose as acceptor and phenyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside as donor, three isomeric mannosides were isolated. The following structures, as determined by methylation, are proposed: 2-O-, 3-O-, and 5-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-ribose.

### SOMMAIRE

Une  $\alpha$ -D-mannosidase extraite des graines germées de *Vicia sativa* est capable, outre ses propriétés hydrolytiques, de catalyser le transfert du mannose, libéré à partir de phényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, sur les cétohexoses et les pentoses. Avec le D-ribose comme accepteur et le phényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside comme donneur, trois mannosides isomères ont été formés et isolés. Les structures suivantes, déterminées après méthylation, sont proposées: 2-O-, 3-O- et 5-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-ribose.

### INTRODUCTION

À partir des graines germées de *Vicia sativa* nous avons purifié une  $\alpha$ -D-mannosidase capable de transférer, à partir du phényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, un reste D-mannosyle sur des cétohexoses (D-fructose) et sur des pentoses (D-ribose).

Cette propriété qui diffère de celles des carbohydrases végétales étudiées jusqu'à ce jour dans notre laboratoire<sup>1-4</sup> nous a permis de synthétiser trois  $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-riboses. L'identification de la structure de chacun de ces mannosides est le sujet de ce rapport.

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

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Matériel et méthodes* — Le phényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside a été préparé selon la méthode de Hudson et Dale<sup>5</sup> et le *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside selon la méthode de Jermyn<sup>6</sup>. L'hydroxylapatite a été synthétisée selon Tiselius, Hjerten et Levin<sup>7,8</sup>. Le D-ribose et les adénosines 2', 3' et 5'-phosphates proviennent de la firme Sigma. L' $\alpha$ -D-mannosidase de *Vicia sativa* a été purifiée suivant la méthode que nous avons publiée antérieurement<sup>9</sup>.

Les D-ribose et D-mannose libérés après hydrolyse acide ont été dosés par la méthode de Somogyi<sup>10</sup> modifiée par Nelson<sup>11</sup>, le dosage est effectué en 2 étapes. Le réactif cupro-alcalin de Somogyi est réduit à l'ébullition par l'hexose ou le pentose. Ce réactif est fortement chargé en sulfate de sodium qui empêche la réoxydation de l'oxyde cuivreux formé. Celui-ci réduit ensuite le réactif arséno-molybdique de Nelson en donnant une coloration bleue due à des dérivés molybdeux. L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre à 650 nm. Le pouvoir réducteur des disaccharides a été déterminé d'une manière identique.

## RÉSULTATS

*Réaction de transfert* — Après différents essais de concentrations variées de donneur et d'accepteur ainsi que des durées variables de contact avec l'enzyme, nous avons retenu les conditions opératoires suivantes.

Dans un tube à essai nous avons introduit 1,6 g de D-ribose, 250 mg de phényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, 4 ml de solution d' $\alpha$ -D-mannosidase (activité spécifique 8  $\mu$ moles de phényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside hydrolysé par mg de protéine, par min à 37°) et 2 ml de tampon phosphate disodique 0,2M-acide citrique 0,1M de pH 4,3, le volume final est de 10 ml.

Le transfert commençant après 30 min et atteignant un maximum après 48 h, le mélange réactionnel a été incubé pendant 48 h à 37°, puis porté à 100° pendant 5 min afin d'inactiver l'enzyme. Après centrifugation, un échantillon des produits de l'incubation a été soumis à une chromatographie descendante sur papier, avec le solvant alcool butylique-pyridine-eau (9/5/4, v/v). Nous avons obtenu trois taches distinctes.

*Isolement des produits de transfert* — Les produits d'incubation ont été séparés par chromatographie sur colonne de charbon-Célite, suivant la méthode de Whistler et Durso<sup>12</sup>. Après adsorption, un lavage à l'eau a éliminé le D-mannose et le D-ribose libres ainsi que le phényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside en excès. L'éthanol à 3% a permis d'éluer 24 mg de composé 1, l'éthanol à 5% un mélange des composés 2 et 3. Cette dernière fraction a été concentrée sous vide, puis chromatographiée sur papier Whatman n° 3 avec le solvant alcool butylique-pyridine-eau (9/5/4, v/v). Nous avons séparé ainsi 14 mg de chacun des produits 2 et 3 qui ont été élués par l'eau et obtenus par lyophilisation.

*Méthylation* — *Préparation des O-méthyl-D-riboses standards* Le 2,3,5-tri-O-

méthyl-D-ribose a été obtenu à partir de D-ribose, le 2,5-di-*O*-méthyl-D-ribose a partir d'adenosine 3'-phosphate, le 3,5-di-*O*-méthyl-D-ribose à partir d'adénosine 2'-phosphate et le 2,3-di-*O*-méthyl-D-ribose à partir d'adénosine 5'-phosphate par méthylation selon le procédé de Hakomori<sup>13</sup> suivie d'hydrolyse pendant 5 h à 100° avec de l'acide chlorhydrique 5M

*Méthylation des produits de transfert* Le procédé de Hakomori étant trop drastique pour nos composés nous avons préféré utiliser la méthode de Kuhn et Brossmer<sup>14</sup>. Nous avons opéré sur 10 mg de chacun de ces produits. Les dérivés méthylés furent ensuite hydrolysés pendant 1 h à 100° dans l'acide chlorhydrique M

*Chromatographie en couche mince* Après hydrolyse, les produits méthylés sont chromatographiés sur film Kodak 301 V, préalablement lavé par du tampon phosphate 0,2M de pH 6,8 (phosphates mono- et disodique), en méthode ascendante dans le mélange alcool propylique-acétate d'éthyle-pyridine-eau (50 10 4 5, v/v)<sup>15</sup>. Les dérivés méthylés sont révélés par l'oxalate d'aniline<sup>16</sup>

Après méthylation et hydrolyse acide, les produits de transfert ne libèrent que deux composés méthylés : un tétra-*O*-méthyl-D-mannose et un di-*O*-méthyl-D-ribose. Le tableau I résume les  $R_F$  obtenus avec les D-ribooses *O*-méthylés de référence et ceux observés avec les di-*O*-méthyl-D-ribooses libérés par les produits 1, 2 et 3

TABLEAU I

C C M DES *O*-METHYL-D-RIBOSES STANDARDS ET DES *O*-METHYL-D-RIBOSES PROVENANT DES PRODUITS 1, 2 ET 3 APRES MÉTHYLATION ET HYDROLYSE<sup>a</sup>

<i>Di-O-méthyl-D-ribose standard</i>	$R_F$	<i>O-Méthyl-D-ribose isolé du produit de transfert méthylé</i>
2,3-	0,59	Composé 3
2,5-	0,63	Composé 1
3,5-	0,67	Composé 2

<sup>a</sup>C c m sur film Kodak 301 V (pour détails, voir la Partie Expérimentale)

La comparaison des vitesses de migration des di-*O*-méthyl-D-ribooses de référence avec celles des produits de transfert permet de constater que le di-*O*-méthyl-D-ribose issu du composé 1 migre comme le 2,5-di-*O*-méthyl-D-ribose, celui du composé 2 comme le 3,5-di-*O*-méthyl-D-ribose et celui du composé 3 comme le 2,3-di-*O*-méthyl-D-ribose

## DISCUSSION

Avec le D-ribose comme accepteur et le phényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside comme donneur, une  $\alpha$ -D-mannosidase des graines germées de *Vicia sativa* catalyse le transfert de radicaux D-mannosyles sur les différents groupes hydroxyles du D-ribose, la liaison entre les deux sucres étant possible en trois points, elle conduit à la synthèse de trois disaccharides

L'hydrolyse acide des trois produits de transfert libère une molécule de D-mannose pour une molécule de D-ribose : ces disaccharides sont donc trois  $\alpha$ -D-mannosyl-D-riboses isomères

L'hydrolyse enzymatique libère également une quantité équivalente de molécules de D-ribose et de D-mannose

Ces trois disaccharides sont homogènes en chromatographie. Ils sont très hygroscopiques et très stables après lyophilisation. Ils sont reducteurs et dextrogyres. Les pouvoirs rotatoires  $[\alpha]_D^{20}$  sont respectivement  $+54^\circ$  (c 1,4, eau)  $+42^\circ$  (c 1,4, eau) et  $+22^\circ$  (c 1,4, eau) pour **1**, **2** et **3**

L'hydrolyse acide après méthylation, comme nous venons de le voir ci-dessus, libère deux composés méthylés : un tétra-*O*-méthyl-D-mannose et un di-*O*-méthyl-D-ribose. Les expériences de méthylation ont suggéré que le résidu de D-mannose était lié par son carbone 1 à différents groupes hydroxyles du D-ribose : liaison 1 $\rightarrow$ 3 dans le produit **1**, 1 $\rightarrow$ 2 dans le produit **2** et 1 $\rightarrow$ 5 dans le produit **3**. L'ensemble des expériences suggère les structures suivantes : 2-*O*- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-ribose (**1**), 3-*O*- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-ribose (**2**) et 5-*O*- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-ribose (**3**)

#### RÉFÉRENCES

- 1 C. ANAGNOSTOPOULOS, J.-E. COURTOIS ET F. PETEK, *Arch. Sc. Biol. (Bologna)*, 39 (1955) 631
- 2 J.-E. COURTOIS ET F. PETEK, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 39 (1957) 715
- 3 J.-E. COURTOIS, F. PETEK ET T. DONG, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45 (1963) 95
- 4 F. PETEK ET J.-E. COURTOIS, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1964) 1093
- 5 C. S. HUDSON ET J. K. DALE, *J. Amer. Chem. Soc.*, 37 (1915) 1280
- 6 M. A. JERMYN, *Aust. J. Chem.*, 8 (1955) 403
- 7 A. TISELIUS, S. HJERTEN ET O. LEVIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 132
- 8 O. LEVIN, *Methods Enzymol.* 5 (1962) 27
- 9 F. PETEK ET E. VILLARROYA, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 725
- 10 M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 61
- 11 N. NELSON, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 375
- 12 R. L. WHISTLER ET D. S. DURSO, *J. Amer. Chem. Soc.*, 72 (1950) 677
- 13 S. HAKOMORI, *J. Biochem. (Tokyo)*, 55 (1964) 205
- 14 R. KUHN ET R. BROSSMER, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 1667
- 15 J. DOLY ET F. PETEK, *Compt. Rend.*, 263 (1966) 1341
- 16 S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 164 (1949) 443