

## INTERACTIONS GLYCANNE-PROTÉINE. SYNTHÈSE DES 4-MÉTHYLOMBELLIFÉRYL-(2-ACÉTAMIDO-2-DÉSOXY- $\beta$ -D-GLUCOPYRANOSIDE), -DI-N-ACÉTYL- $\beta$ -CHITOBIOSIDE ET -TRI-N-ACÉTYL- $\beta$ -CHITOTRIOSIDE. INTERACTION DE CES OSIDES AVEC LE LYSOZYME\*

FRANCIS M. DELMOTTE, JEAN-PAUL D. J. PRIVAT ET MICHEL L. P. MONSIGNY

*Centre de Biophysique Moléculaire, C.N.R.S. et Laboratoire de Chimie Biologique,  
Université d'Orléans, 45045 Orléans (France)*

(Reçu le 24 juin 1974; accepté le 30 septembre 1974)

### ABSTRACT

4-Methylumbelliferyl 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside, 2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (di-*N*-acetyl- $\beta$ -chitobioside), and *O*-(2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (tri-*N*-acetyl- $\beta$ -chitotrioside) were obtained in good yield from the corresponding peracetylated glycosyl chlorides by condensation with the sodium salt of 4-methylumbelliferone in *N,N*-dimethylformamide. The trisaccharide glycoside is hydrolyzed by lysozyme and is, therefore, a convenient substrate for this enzyme; the 4-methylumbelliferone produced can be determined by the increase of the fluorescence intensity at 442 nm. The intensity of the fluorescence of 4-methylumbelliferyl tri-*N*-acetyl- $\beta$ -chitotrioside is enhanced upon binding with lysozyme without modification of the position of the absorption maximum. The binding constant and the rate of hydrolysis of the trisaccharide glycoside by lysozyme are higher than those obtained with *p*-nitrophenyl tri-*N*-acetyl- $\beta$ -chitotrioside.

### SOMMAIRE

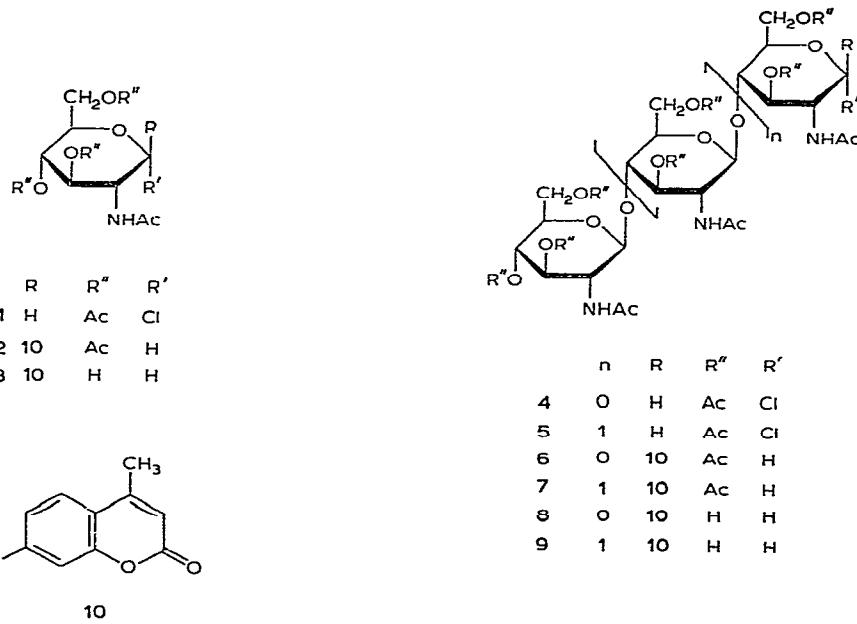
Les 4-méthylumbelliféryl-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside),-[2-acétamido-4-*O*-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside] (-di-*N*-acétyl- $\beta$ -chitobioside), et -[*O*-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside] (-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside) sont obtenus avec d'excellents rendements par condensation des chlorures de glycosides peracétylés correspondants et du sel de sodium de la 4-méthylumbelliféronne, en solution dans la

\*Ce travail a bénéficié d'une aide du Centre National de la Recherche Scientifique, A.T.P. Pharmacodynamie et Chimiothérapie, n° 5111.

*N,N*-diméthylformamide. Le 4-méthylombelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside est facilement hydrolysé par le lysozyme, et peut, de ce fait, constituer un substrat intéressant pour l'étude de l'activité catalytique de cette enzyme. La libération de la 4-méthylombelliférone peut être suivie en continu, en mesurant l'augmentation de fluorescence à 442 nm. L'intensité de fluorescence du 4-méthylombelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside est augmentée lors de sa fixation sur le lysozyme. Cette augmentation s'effectue sans modification de la position du maximum. L'affinité du 4-méthylombelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside pour le lysozyme et la vitesse d'hydrolyse de ce composé par le lysozyme sont plus élevées que celles obtenues avec l'homologue *p*-nitrophényle. Le groupement 4-méthylombelliféryle favorise la formation du complexe avec l'enzyme.

#### INTRODUCTION

Les 4-méthylombelliféryl-glycosides sont couramment utilisés comme substrats dans les études de l'activité enzymatique des glycosyl-hydrolases<sup>1-8</sup>. En outre, grâce aux propriétés spectrales du groupement 4-méthylombelliféryle, ces composés sont des ligands particulièrement intéressants pour les études d'interaction glucide-protéine. Dans le but de compléter l'étude sur les propriétés des protéines affines du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose, du di-*N*-acétylchitobiose et de ses oligomères<sup>9</sup>, nous avons synthétisé les 4-méthylombelliféryl-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosides) (2, 3), -[2-acétamido-4-*O*-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosides] (-di-*N*-acétyl- $\beta$ -chitobiosides) (6, 8) et -[*O*-



(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosides] (-tri-N-acétyl- $\beta$ -chitotriosides) (7, 9). Ces synthèses ont été réalisées dans des conditions analogues à celles décrites précédemment<sup>10</sup> pour la synthèse de *p*-nitrophényl-glycosides.

Dans le cas de la concanavaline A, il a été démontré<sup>11</sup> que la fluorescence du 4-méthylombelliféryl- $\alpha$ -D-mannopyranoside était éteinte lors de sa fixation sur la protéine. Il paraissait intéressant d'étudier le comportement fluorométrique des composés 3, 8 et 9 en présence de lysozyme. En particulier, dans le cas du complexe lysozyme-tri-N-acétylchitotriose, les unités monosaccharidiques occupent<sup>12</sup> les sous-sites A, B et C. Pour les complexes non productifs des *p*-nitrophényl-trisaccharides et du lysozyme, une structure analogue a été proposée<sup>13</sup>; le groupement *p*-nitrophényle est localisé dans le sous-site D. Enfin le *p*-nitrophényl-tri-N-acétyl- $\beta$ -chitotrioside conduit partiellement à un complexe productif, et peut donc être hydrolysé lentement<sup>14</sup> par le lysozyme. Le 4-méthylombelliféryl-tri-N-acétyl- $\beta$ -chitotrioside devrait avoir le même comportement que le *p*-nitrophényl-tri-N-acétyl- $\beta$ -chitotrioside. Cependant le 4-méthylombelliféryl-glycoside présente deux avantages essentiels : le groupement 4-méthylombelliféryle est un marqueur fluorescent très sensible à l'environnement, et la 4-méthylombelliférone peut être détectée à des concentrations très inférieures à celles du *p*-nitrophénol.

Nous décrivons dans ce mémoire la préparation, les caractéristiques physiques et les propriétés spectroscopiques des 4-méthylombelliféryl-glycosides 3, 8 et 9, ainsi que leur interaction avec le lysozyme.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

La préparation des 4-méthylombelliféryl-glycosides à partir du sel de sodium de la 4-méthylombelliférone en solution dans la *N,N*-diméthylformamide s'effectue avec des rendements (65 %) supérieurs à ceux obtenus<sup>4</sup> dans un mélange acétone-solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (37 %). L'analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire permet d'affirmer d'une part que les composés obtenus sont les anomères  $\beta$  et d'autre part qu'ils ne renferment pas de 4-méthylombelliférone libre; en effet, en r.m.n., le doublet du proton anomérique de l'ose lié à l'aglycone est déplacé vers les bas champs et possède une constante de couplage  $J_{1,2}$  égale à 8 Hz. Pour les composés désacétylés (8, 9), les doublets des protons anomériques du pénultième et de l'antécédent pénultième ose sont partiellement résolus et facilement identifiables. Les fréquences de résonance des protons de la 4-méthylombelliférone subissent un déplacement chimique vers les bas champs lorsqu'elle est substituée sur son groupe hydroxyle phénolique. En spectroscopie infra-rouge, la bande d'absorption vers 990 cm<sup>-1</sup> correspond<sup>15</sup> à la vibration de la liaison C-H anomérique  $\beta$ .

En milieu neutre, les spectres d'absorption u.v. de la 4-méthylombelliférone et des 4-méthylombelliféryl-glycosides sont très semblables, et présentent un maximum au voisinage de 320 nm (Fig. 1). Par contre, les spectres de fluorescence de ces composés sont très différents : en effet, le maximum de fluorescence des 4-méthyl-

ombelliféryl-glycosides se situe à 372 nm, alors que celui de la 4-méthylombelliférone est aux environs de 442 nm (Fig. 2). Les rendements quantiques de fluorescence sont également très différents, puisque, à concentrations identiques, la 4-méthyl-ombelliférone présente un rendement 20 fois plus élevé que celui de ses dérivés glycosidiques. Les intensités de fluorescence mesurées aux longueurs d'onde d'émission maximale sont dans le rapport 1 à 17. En suivant la variation de fluorescence à 442 nm, il est possible de suivre l'apparition de la 4-méthylombelliférone libre, et de ce fait, de suivre en continu l'hydrolyse des 4-méthylombelliféryl-glycosides, et d'en déduire les paramètres cinétiques de l'enzyme.

Le 4-méthylombelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside est hydrolysé rapidement à 50° par de petites quantités de lysozyme (Fig. 3). La vitesse de libération de la 4-méthylombelliférone reste strictement constante pendant la première heure (Fig. 3A) et elle est strictement proportionnelle à la concentration d'enzyme présente dans le milieu (Fig. 3B). En l'absence de lysozyme, la quantité de 4-méthylombelliférone libérée en une heure reste inférieure au seuil de détection. Cette méthode peut donc être utilisée pour effectuer un dosage fluorométrique de l'activité du lysozyme. Elle présente par rapport au dérivé *p*-nitrophénylé correspondant<sup>14</sup> deux avantages très intéressants : d'une part, les quantités de lysozyme permettant de réaliser le dosage sont très inférieures (environ dix fois plus faibles, 50 à 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  au lieu de 5 mg/ml); et d'autre part la durée de l'hydrolyse est environ dix fois plus courte (30 min à 1 h

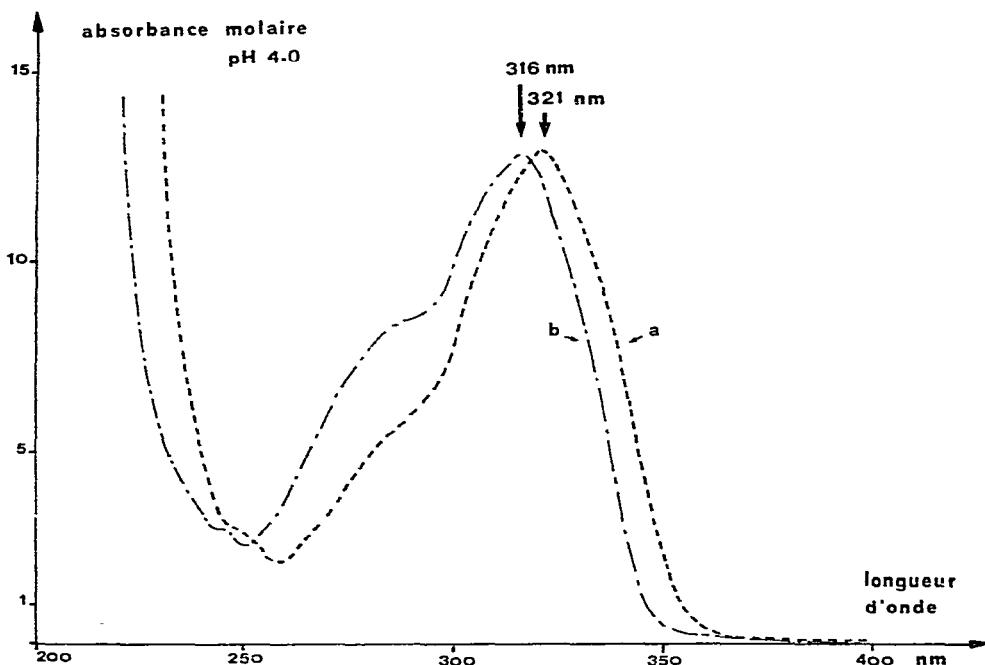


Fig. 1. Spectre d'absorption de la 4-méthylombelliférone (a) et du 4-méthylombelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside (b) dans un tampon acétate de sodium 0,1M, pH 4,0.

au lieu de quelques dizaines d'heures). En outre, puisque la libération de la 4-méthylumbelliférone est une fonction linéaire du temps, il est possible d'effectuer le dosage selon la méthode habituelle, c'est-à-dire après alcalinisation du milieu réactionnel à pH 10,3 (soit par une mesure de la fluorescence à 442 nm, soit par une mesure de l'absorption u.v. à 372 nm).

La constante d'association entre le lysozyme et le 4-méthylumbelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside, déterminée à pH 4,0 et à 50°, à partir des vitesses de libération de la 4-méthylumbelliférone (voir Matériel et Méthodes) est égale à  $5,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Cette valeur est forte, comparée à la valeur de  $1,25 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  trouvée pour le *p*-nitrophénol-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside<sup>14</sup> dans un tampon citrate de sodium 40mM de pH 5,1 à 40°. Cette différence ne peut pas être expliquée par la seule différence de pH, car à pH 4,0 l'affinité du lysozyme pour le trisaccharide n'est que deux fois plus forte<sup>12</sup> qu'à pH 5,1. Cette différence ne peut pas non plus être expliquée par la différence de température, puisque l'augmentation de température a pour effet de diminuer la constante d'association. L'explication la plus probable reste une participation du

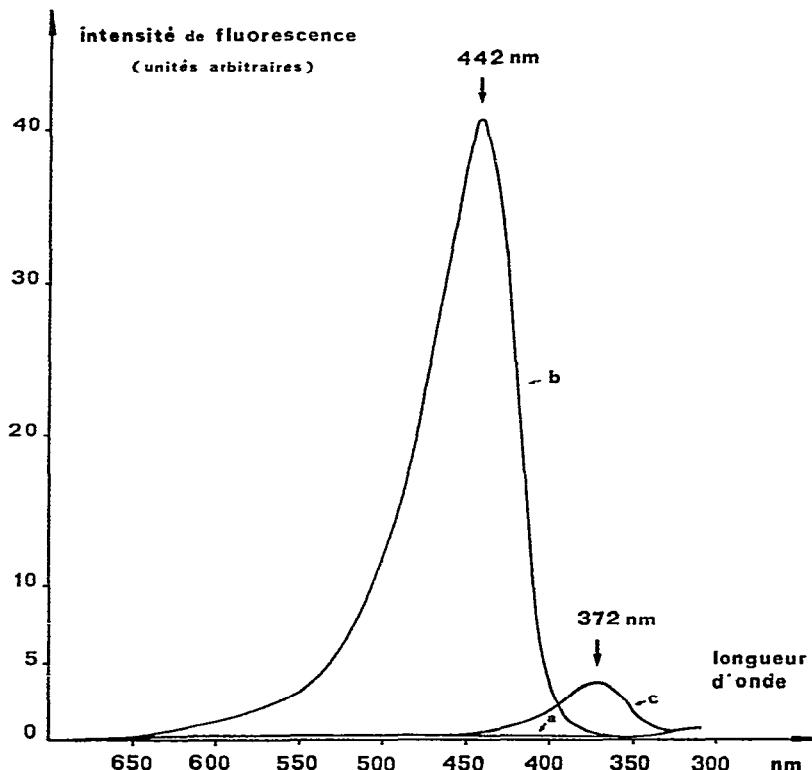


Fig. 2. Spectres de fluorescence : (a) tampon acide acétique-hydroxyde de sodium 0,1M, pH 4,0; (b) 4-méthylumbelliférone, concentration  $12,35 \mu\text{M}$ ,  $A_{1\text{cm}}^{335\text{ nm}}$  0,116; (c) 4-méthylumbelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside, concentration  $17,85 \mu\text{M}$ ,  $A_{1\text{cm}}^{335\text{ nm}}$  0,116. Longueur d'onde d'excitation : 335 nm. Les surfaces entre les courbes b et a d'une part et c et a d'autre part, sont proportionnelles aux rendements quantiques des composés b et c, respectivement.

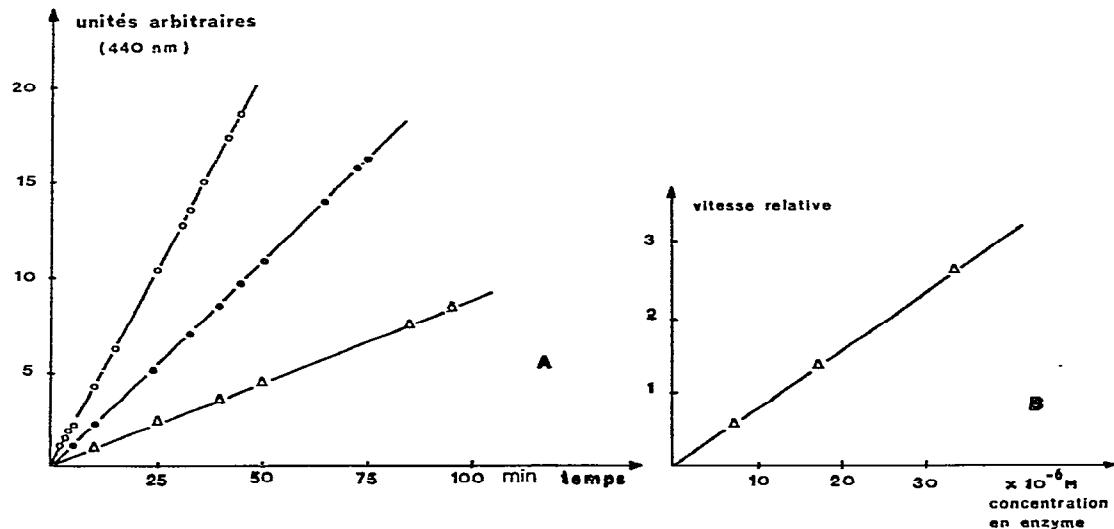


Fig. 3. A. Hydrolyse du 4-méthylumbelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside (0,18 mM) dans un tampon acide acétique-hydroxyde de sodium 0,1M, pH 4,0, à 50°. Concentration en lysozyme : -  $\Delta$ -  $\Delta$ -  $\Delta$ -, 7,04  $\mu$ M, -  $\bullet$ -  $\bullet$ -  $\bullet$ -, 17,24  $\mu$ M, -  $\circ$ -  $\circ$ -  $\circ$ -, 33,33  $\mu$ M. B. Variation de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration en enzyme. La vitesse est calculée à partir de la quantité de 4-méthylumbelliférone libérée en 15 min ou, indifféremment, à partir de la pente des courbes de la Fig. A.

groupe 4-méthylumbelliféryle dans la liaison avec le lysozyme. Cette dernière proposition est en effet étayée par le fait que l'intensité de fluorescence du 4-méthylumbelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside est augmentée lorsque ce glycoside se fixe sur le lysozyme (Fig. 4). La modification du spectre ne s'accompagne pas de déplacement du maximum d'émission, qui reste à 372 nm. Ce comportement (l'augmentation de la fluorescence) est inverse de celui observé<sup>11</sup> dans le cas de la concanavaline A; la fixation du 4-méthylumbelliféryl- $\alpha$ -D-mannopyranoside sur la protéine s'accompagnait d'une extinction totale de la fluorescence.

La constante d'association entre le lysozyme et le 4-méthylumbelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside, déterminée à partir de l'accroissement de l'intensité de fluorescence, est égale à  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Dans le cas des 4-méthylumbelliféryl-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside) et -di-*N*-acétyl- $\beta$ -chitobioside, aucune augmentation de fluorescence n'a pu être décelée aux concentrations utilisées. Ce résultat implique que, pour ces deux composés, la constante d'association est beaucoup plus faible (inférieure à  $10^2 \text{ M}^{-1}$ ) ou que le groupement 4-méthylumbelliféryle se trouve placé dans une position différente, par rapport au cas du 4-méthylumbelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside. La vitesse maximale d'hydrolyse du 4-méthylumbelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside obtenue avec une concentration en lysozyme de 17,25  $\mu$ M est 0,08  $\mu$ M/min, soit une vitesse de 19  $\mu$ M/h pour une solution de lysozyme à la concentration de 1 mg/ml. Le *p*-nitrophényl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside est hydrolysé, à pH 5,1 et à 40°, avec une vitesse maximale de 0,02  $\mu$ M/h pour

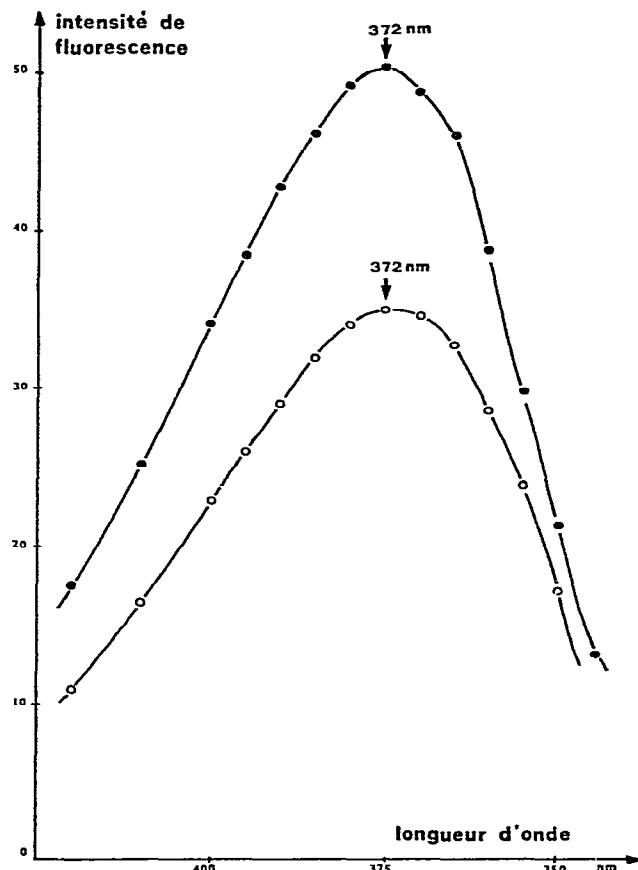


Fig. 4. Spectres de fluorescence du 4-méthylumbelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside (11,3 $\mu$ M): -○-○-○-, seul, -●-●-●-, en présence de lysozyme de blanc d'œuf de poule (26,4 $\mu$ M). Longueur d'onde d'excitation 335 nm; tampon citrate-phosphate de sodium 0,1M, pH 5,75, à 25°.

la même concentration en enzyme<sup>14</sup>. Puisque la constante d'association du 4-méthylumbelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside et la vitesse d'hydrolyse de ce composé sont élevées par rapport au dérivé *p*-nitrophénylé, il semble que le groupement 4-méthylumbelliféryle présente, pour le sous-site E, une affinité particulière qui favorise la formation du complexe productif.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Méthodes générales.* — Les points de fusion ont été déterminés à l'aide du microscope à platine chauffante Leitz, et ne sont pas corrigés. Les pouvoirs rotatoires optiques ont été mesurés sur le polarimètre Perkin-Elmer modèle 141. Les spectres infra-rouge ont été enregistrés, en utilisant, d'une manière générale, des pastilles de bromure de potassium, sur un spectromètre Perkin-Elmer modèle 257. Les spectres

d'absorption en ultra-violet ont été tracés à l'aide d'un spectrophotomètre Carry 14. Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été réalisés à température ambiante, sur le spectromètre Brüker à 90 MHz en utilisant le diméthyl sulfoxyde-*d*<sub>6</sub>. Les signaux du tétraméthylsilane ont été pris comme référence interne pour la mesure des déplacements chimiques ( $\delta$ ). Toutes les évaporations ont été effectuées sous pression réduite à 35–40° avec un évaporateur rotatif Büchi. Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur Silicagel G (Merck), la révélation étant obtenue par chauffage des plaques après pulvérisation d'acide sulfurique à 5%. Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur un spectrofluoromètre Jobin et Yvon. La longueur d'onde d'excitation, sauf indication contraire, était de 335 nm. Les concentrations en protéine et en osides étaient telles que l'absorbance totale de la solution ( $A_{1\text{ cm}}^{335\text{ nm}}$ ) était inférieure à 0,1. Les spectres ont été corrigés pour tenir compte de la réponse des photomultiplicateurs et du monochromateur d'émission. Bien que le maximum de l'intensité de fluorescence soit obtenu avec une excitation à 316 nm, les expériences ont été réalisées en utilisant une excitation à 335 nm de façon à pouvoir travailler dans une gamme de concentrations plus étendue, et de façon à ne pas être gêné par l'absorption résiduelle du lysozyme à plus courte longueur d'onde.

Le lysozyme de blanc d'œuf de poule « cristallisé pour analyse » (Boehringer, Manheim, R.F.A.) présente les caractéristiques suivantes : pd. mol., 14.300 et  $E_{1\text{ cm.}}^{1\% \text{ 280 nm.}}$ , 26,4.

Les études d'interaction ont été réalisées à 25° dans un tampon citrate-phosphate de sodium 0,1M, à pH 5,75. La concentration des 4-méthylombelliféryl-glycosides était voisine de 10 $\mu$ M. La fluorescence des glycosides était mesurée à 372 nm après chaque addition d'une solution de lysozyme mM. Les variations d'intensité de fluorescence ont été utilisées pour calculer la constante d'association, dans les conditions analogues à celles précédemment décrites<sup>9</sup>.

L'hydrolyse du 4-méthylombelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside (9) a été mise en évidence en mesurant la variation de fluorescence à 442 nm en fonction du temps. Le composé 9 (0,18mM) et le lysozyme (0,5mM) étaient dissous dans un tampon<sup>16</sup> acide acétique-hydroxyde de sodium 0,1M à pH 4,0. La solution de glycoside était placée dans le porte-cuve thermostaté<sup>17</sup> à 50°. Cette température a été choisie parce qu'elle correspond au maximum de l'activité hydrolytique<sup>17</sup> du lysozyme; à un pH égal ou supérieur à 4,0 la protéine est parfaitement stable<sup>18</sup> jusqu'à une température égale ou supérieure à 60°. Après stabilisation de l'émission de fluorescence, l'enzyme était ajoutée et la variation de fluorescence en fonction du temps était mesurée à 442 nm. La constante d'association du lysozyme et du 4-méthylombelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside a été déterminée à 50°, à partir des vitesses de libération de la 4-méthylombelliférone par le lysozyme 17,25 $\mu$ M en solution dans le tampon acide acétique-hydroxyde de sodium 0,1M de pH 4,0, en fonction de la concentration en 4-méthylombelliféryl-tri-*N*-acétyl- $\beta$ -chitotrioside (14,5 à 49,4 $\mu$ M). La constante d'association a été déterminée en portant les valeurs de l'inverse de la vitesse en fonction des valeurs de l'inverse de la concentration en substrat libre. La concentration en substrat libre était déterminée par le calcul, en prenant, pour le premier calcul,

une valeur arbitraire de la constante d'association, puis pour le calcul suivant, la constante approchée trouvée précédemment; après quatre itérations, la constante déterminée était identique à la constante utilisée pour calculer la valeur de la concentration en substrat libre.

*Synthèse des 4-méthylombelliféryl-glycosides.* — La 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (4-méthylombelliférone) (Koch-Light Laboratories, Ltd.) a été utilisée sans purification; p.f. 187-188°; spectre i.r. :  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3160 (OH, composé chélaté), 3070 (CH, Ph), 2800 (CH), 1680 (C=O, δ-lactone), 1600 (C=C, Ph), 1370 et 1160 (OH et C-O, phénol), 870 et 850  $\text{cm}^{-1}$  (CH, Ph); spectre de r.m.n. : 2,37 (1 s, 3 p 1  $\text{CH}_3$ ), 6,08 (1 s, 1 p, 1 H sur C-3), 6,68 (1 s, 1 p, 1 H sur C-8), 6,76 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz), 7,51 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz), 10,40 (1 s, 1 p, 1 OH).

*4-Méthyl-2-oxo-benzo[b]pyrann-7-olate de sodium* (4-méthylombelliférone, sel de sodium). — La 4-méthylombelliférone (17,6 g, 0,1 mol) est dissoute dans l'hydroxyde de sodium M (100 ml). La solution limpide obtenue est lyophilisée; on obtient ainsi un résidu jaune identifié au sel de sodium de la 4-méthylombelliférone, p.f. 164-168°, puis 181-182°; spectre i.r. :  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1710 (C=O, δ-lactone), 1600 (C=C, Ph), 830 et 810  $\text{cm}^{-1}$  (CH, Ph); spectre de r.m.n. : 2,18 (1 s, 3 p, 1  $\text{CH}_3$ ), 5,44 (1 s, 1 p, 1 H sur C-3), 5,91 (1 s, 1 p, 1 H sur C-8), 6,14 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz), 7,09 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz).

*Anal.* Calc. pour  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NaO}_3 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$  : C, 57,97; H, 3,86; Na, 11,11. Trouvé : C, 57,61; H, 4,35; Na, 10,96.

*4-Méthylombelliféryl-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranoside)* (2). — À une suspension de 4-méthylombelliférone (sel de sodium) (1,09 g, 5,48 mmol) dans la *N,N*-diméthylformamide (15 ml), on ajoute progressivement 1 (1 g, 2,74 mmol). Le milieu réactionnel est maintenu 16 h sous agitation à l'abri de la lumière; ce mélange est ensuite précipité dans l'eau glacée (75 ml). Très rapidement il se forme un gel épais que l'on centrifuge pendant 20 min à 4000*g*. Le surnageant est éliminé, le culot est repris dans l'eau glacée (40 ml), et la suspension obtenue est centrifugée dans les mêmes conditions. Cette opération est répétée plusieurs fois, jusqu'à l'obtention d'un surnageant limpide et incolore. Le culot est séché (1,05 g) puis repris dans l'éthanol chaud (80 ml). Cette solution éthanolique, filtrée à chaud, donne par refroidissement des microaiguilles blanches (0,90 g, 65%); le produit est homogène en c.c.m. dans le système-solvant chloroforme-méthanol (9:1, v/v) ( $R_F$  0,71); p.f. 259-260°;  $[\alpha]_{589}^{25} -19,2^\circ$  et  $[\alpha]_{546}^{25} -23,6^\circ$  (c 0,9, chloroforme);  $[\alpha]_{589}^{25} -6,3^\circ$  et  $[\alpha]_{546}^{25} -7,1^\circ$  (c 1,4, *N,N*-diméthylformamide); litt.<sup>4</sup> : p.f. 254-255°,  $[\alpha]_{589}^{20} -18,9^\circ$  (c 1, chloroforme); spectre i.r. :  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3280 (NH), 3070 (CH, Ph), 2950 et 2880 (CH), 1740 (OAc), 1720 (C=O, δ-lactone), 1660 (Amide I), 1615 (C=C, Ph), 1535 (Amide II), 1230 (C-O), 900 (β-glycoside), 875, 860, 820 et 800  $\text{cm}^{-1}$  (CH, Ph); spectre de r.m.n. : 1,76 (1 s, 1 × 3 p, 1 NHAc), 1,93 (1 s, 1 × 3 p, 1 OAc), 1,99 (1 s, 1 × 3 p, 1 OAc), 2,06 (1 s, 1 × 3 p, 1 OAc), 2,39 (1 s, 1 × 3 p, 1  $\text{CH}_3$ , 10), 5,45 (1 d, 1 p,  $J$  8 Hz, anomérie β), 6,22 (1 s, 1 p, 10), 6,97 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz, 10), 7,08 (1 s, 1 p, 10), 7,67 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz, 10), 8,07 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz, 1 NH).

*Anal.* Calc. pour  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}$  : C, 57,03; H, 5,35; N, 2,77. Trouvé : C, 56,76; H, 5,44; N, 2,90.

*4-Méthylombelliféryl-[2-acétamido-4-O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranoside] (4-méthyl-ombelliféryl-di-N-acétyl-β-chitobioside pentaacétate) (6).* — Le composé **4** (1 g, 1,53 mmol) est ajouté progressivement à une suspension de 4-méthylombelliférone (sel de sodium) (0,9 g, 4,55 mmol) dans la *N,N*-diméthylformamide (15 ml). La réaction est maintenue pendant 16 h sous agitation à 25°. Le mélange réactionnel est ensuite versé dans l'eau glacée (50 ml). Le gel blanc formé est centrifugé comme pour **2**. Le culot obtenu est repris par l'acétone (50 ml), et la solution concentrée à siccité à l'évaporateur rotatif. Le résidu blanc, ainsi séché, est remis en suspension dans l'acétone (50 ml) et la suspension portée à reflux pendant 1 h. Après concentration à 20 ml, la suspension est filtrée et l'insoluble est séché. On obtient ainsi **6** (0,92 g, 76%) homogène en c.c.m. dans le système-solvant chloroforme-méthanol (9:1, v/v) ( $R_F$  0,66), p.f. 285-286°,  $[\alpha]_{589}^{25} -16,1^\circ$  et  $[\alpha]_{546}^{25} -20,2^\circ$  (*c* 1, *N,N*-diméthylformamide); spectre i.r. :  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3290 (NH), 3070 (CH, Ph), 2940 et 2870 (CH), 1745 (OAc), 1720 (C=O, δ-lactone), 1660 (Amide I), 1615 (C=C, Ph), 1535 (Amide II), 1230 (C-O), 900 (β-glycoside), 860 et 810  $\text{cm}^{-1}$  (CH, Ph); spectre de r.m.n. : 1,78 (1 s, 2 × 3 p, 2 NHAc), 1,91 (1 s, 1 × 3 p, 1 OAc), 1,99 (1 s, 1 × 3 p, 1 OAc), 2,02 (1 s, 1 × 3 p, 1 OAc), 2,06 (1 s, 1 × 3 p, 1 OAc), 2,08 (1 s, 1 × 3 p, 1 CH<sub>3</sub>, **10**), 2,38 (1 s, 1 × 3 p, 1 CH<sub>3</sub>, **10**), 5,31 (1 d, 1 p, *J* 8 Hz, anomérie β), 6,19 (1 s, 1 p, **10**), 6,87 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, **10**), 6,96 (1 s, 1 p, **10**), 7,60 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, **10**), 7,94 (2 d, 2 × 1 p, *J* 9 Hz, 2 NH).

*Anal.* Calc. pour C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub> : C, 54,55; H, 5,56; N, 3,54. Trouvé : C, 54,34; H, 5,66; N, 3,54.

*4-Méthylombelliféryl-[O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acétamido-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-2-acétamido-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranoside] (4-méthyl-ombelliféryl-di-N-acétyl-β-chitotrioside heptaacétate) (7).* — À une suspension de 4-méthylombelliférone (sel de sodium) (0,55 g, 2,78 mmol) dans la *N,N*-diméthylformamide (15 ml), on ajoute progressivement **5** (0,94 g, 1 mmol). Le milieu réactionnel est maintenu pendant 16 h sous agitation à 25°. Le composé **7** (0,44 g, 40%) isolé, puis purifié comme **6** est homogène en c.c.m. dans le système-solvant chloroforme-méthanol (9:1, v/v) ( $R_F$  0,51), p.f. 292-293°,  $[\alpha]_{589}^{25} -0,1^\circ$  et  $[\alpha]_{546}^{25} -1,5^\circ$  (*c* 1, *N,N*-diméthylformamide); spectre i.r. :  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3300 (NH), 3070 (CH, Ph), 2940 et 2870 (CH), 1745 (OAc), 1720 (C=O, δ-lactone), 1660 (Amide I), 1615 (C=C, Ph), 1535 (Amide II), 1230 (C-O), 900 (anomérie β), 840 et 800  $\text{cm}^{-1}$  (CH, Ph); spectre de r.m.n. : 1,78 (1 s, 3 × 3 p, 3 NHAc), 1,92 (1 s, 1 × 3 p, 1 OAc), 1,98 (1 s, 2 × 3 p, 2 OAc), 2,02 (1 s, 1 × 3 p, 1 OAc), 2,03 (1 s, 1 × 3 p, 1 OAc), 2,09 (1 s, 2 × 3 p, 2 OAc), 2,38 (1 s, 1 × 3 p, 1 CH<sub>3</sub>, **10**), 5,31 (1 d, 1 p, *J* 8 Hz, anomérie β), 6,19 (1 s, 1 p, **10**), 6,87 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, **10**), 6,96 (1 s, 1 p, **10**), 7,60 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, **10**), 7,94 (3 d, 3 × 1 p, *J* 9 Hz, 3 NH).

*Anal.* Calc. pour C<sub>48</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>O<sub>25</sub> : C, 53,38; H, 5,65; N, 3,89. Trouvé : C, 52,93; H, 5,77; N, 3,86.

*4-Méthylombelliféryl-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranoside) (3).* — À une

suspension de **2** (0,85 g) dans le méthanol (48 ml), on ajoute une solution de méthano-late de sodium 0,5M (2 ml). Après 30 min, le mélange réactionnel devient limpide, puis **3** cristallise progressivement. Après 10 h d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est maintenu pendant 16 h à 4°. Le méthanolate de sodium est éliminé par addition d'une goutte d'acide acétique glacial. Le dérivé cristallin **3** obtenu est filtré, lavé au méthanol ( $3 \times 10$  ml), puis séché à l'étuve à 50° sous pression réduite en présence de pentaoxyde de phosphore (0,48 g, 75 %), p.f. 219–220°,  $[\alpha]_{589}^{25} - 14,0^\circ$  et  $[\alpha]_{546}^{25} - 14,6^\circ$  (*c* 1, *N,N*-diméthylformamide); litt.<sup>4</sup> : p.f. 212–214°,  $[\alpha]_{589}^{20} - 14,5^\circ$  (*c* 0,1, eau); spectre i.r. :  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3390 (OH), 3300 (NH), 3070 (CH, Ph), 2920 et 2880 (CH), 1720 (C=O, δ-lactone), 1650 (Amide I), 1620 (C=C, Ph), 1530 (Amide II), 890 (anomérie β), 880 et 810  $\text{cm}^{-1}$  (CH, Ph);  $\nu_{\text{max}}^{\text{Me}_2\text{SO}}$  3410 (OH), 3300 (CH, Ph), 2900 et 2850 (CH), 1720 (C=O, δ-lactone), 1670 (Amide II), 1610  $\text{cm}^{-1}$  (C=C, Ph); spectre de r.m.n. : 1,86 (1 s, 1 × 3 p, 1 NHAc), 2,38 (1 s, 1 × 3 p, 1 CH<sub>3</sub>, **10**), 5,11 (1 d, 1 p, *J* 8 Hz, anomérie β, **10** glycoside), 6,16 (1 s, 1 p, **10**), 6,83 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, **10**), 6,92 (1 s, 1 p, **10**), 7,58 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, **10**), 7,73 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, 1 NH); spectre u.v. :  $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$  316 nm,  $\epsilon_{1\text{cm},\text{H}_2\text{O}}^{1\%}$  338.

*Anal.* Calc. pour C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>8</sub> : C, 56,99; H, 5,58; N, 3,69. Trouvé : C, 56,79; H, 5,42; N, 3,79.

**4-Méthylombelliféryl-[2-acétamido-4-O-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl]** (*4-méthylombelliféryl-di-N-acétyl-β-chitobioside*) (**8**). — On ajoute 2 ml de méthanolate de sodium 0,5M à une suspension de **6** (0,9 g) dans le méthanol anhydre (98 ml). Le mélange réactionnel devient limpide après 1 h, puis le dérivé désacétylé précipite progressivement. Le protocole est ensuite identique à celui utilisé pour **7**. Le produit cristallin blanc **8** est filtré, lavé au méthanol ( $3 \times 10$  ml), et séché (0,49 g, 75 %), p.f. 240–241°,  $[\alpha]_{589}^{25} - 20,6^\circ$  et  $[\alpha]_{589}^{25} - 23,6^\circ$  (*c* 1, *N,N*-diméthylformamide); spectre i.r. :  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3400 (OH), 3300 (NH), 3070 (CH, Ph), 2980 et 2860 (CH), 1720 (C=O, δ-lactone), 1650 (Amide I), 1620 (C=C, Ph), 1550 (Amide II), 890 (anomérie β), 850 et 800  $\text{cm}^{-1}$  (CH, Ph); spectre de r.m.n. : 1,79 (1 s, 1 × 3 p, 1 NHAc), 1,83 (1 s, 1 × 3 p, 1 NHAc), 2,38 (1 s, 1 × 3 p, 1 CH<sub>3</sub>, **10**), 4,33 [1 d, 1 p, *J* 8 Hz, anomérie β-(1→4)], 5,11 (1 d, 1 p, *J* 8 Hz, anomérie β, **10** glycoside), 6,17 (1 s, 1 p, **10**), 6,87 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, **10**), 6,92 (1 s, 1 p, **10**), 7,60 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, **10**), 7,76 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, 1 NH), 7,82 (1 d, 1 p, *J* 9 Hz, 1 NH); spectre u.v. :  $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$  316 nm,  $\epsilon_{1\text{cm},\text{H}_2\text{O}}^{1\%}$  220.

*Anal.* Calc. pour C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> : C, 53,61; H, 5,84; N, 4,81. Trouvé : C, 53,50; H, 5,72; N, 4,90.

**4-Méthylombelliféryl)-[O-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranoside]** (*4-méthylombelliféryl-tri-N-acétyl-β-chitotrioside*) (**9**). — Dans les conditions décrites pour **8**, la *O*-désacétylation de **7** (0,27 g) dans le méthanol anhydre (48 ml) en présence de méthanolate de sodium 0,5M (2 ml) libère **9** (0,19 g, 96 %); p.f. 262–263°,  $[\alpha]_{589}^{25} - 3,6^\circ$  et  $[\alpha]_{546}^{25} - 5,4^\circ$  (*c* 1, diméthyl sulfoxyde). Dans la *N,N*-diméthylformamide (*c* 1), **9** forme un gel. Spectre i.r. :  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3400 (OH), 3300 (NH) 3070 (CH, Ph), 2980 et 2860 (CH), 1720 (C=O, δ-lactone), 1650 (Amide I), 1620

(C=C, Ph), 1550 (Amide II), 890 (anomérie  $\beta$ ), 850 et 800  $\text{cm}^{-1}$  (CH, Ph); spectre de r.m.n. : 1,76 (1 s,  $1 \times 3$  p, 1 NHAc), 1,79 (1 s,  $1 \times 3$  p, 1 NHAc), 1,81 (1 s,  $1 \times 3$  p, 1 NHAc), 2,38 (1 s,  $1 \times 3$  p, 1  $\text{CH}_3$ , 10), 4,27 [1 d, 1 p,  $J$  8 Hz, anomérie  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)], 4,33 [1 d, 1 p,  $J$  8 Hz, anomérie  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)], 5,06 (1 d, 1 p,  $J$  8 Hz, anomérie  $\beta$ , 10 glycoside), 6,13 (1 s, 1 p, 10), 6,82 (1 s, 1 p,  $J$  9 Hz, 10), 6,87 (1 s, 1 p, 10), 7,57 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz, 10), 7,73 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz, 1 NH), 7,76 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz, 1 NH), 7,80 (1 d, 1 p,  $J$  9 Hz, 1 NH); spectre u.v. :  $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$  316 nm,  $\varepsilon_{1\text{cm},\text{H}_2\text{O}}^{1\%}$  163.

*Anal.* Calc. pour  $\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{18}$  : C, 51,97; H, 5,99; N, 5,35. Trouvé : C, 52,05; H, 6,17; N, 5,45.

#### REMERCIEMENT

Nous remercions Madame Annie Heitz pour son aide technique dans la réalisation des spectres de r.m.n.

#### RÉFÉRENCES

- 1 A. R. MEAD, J. N. SMITH ET R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.*, 61 (1955) 569-574.
- 2 N. CONSTANTZAS ET J. KOCOUREK, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 24 (1959) 1099-1103.
- 3 J. W. WOOLEN, R. HEYWORTH ET P. G. WALKER, *Biochem. J.*, 78 (1961) 111-116.
- 4 D. H. LEABACK ET P. G. WALKER, *Biochem. J.*, 78 (1961) 151-156.
- 5 D. ROBINSON, *Comp. Biochem. Physiol.*, 12 (1964) 95-105.
- 6 D. ROBINSON ET J. L. STIRLING, *Biochem. J.*, 107 (1968) 321-327..
- 7 P. A. ÖCKERMAN, *Clin. Chim. Acta*, 23 (1969) 479-482.
- 8 A. L. ROSENTHAL ET A. SAIFER, *Anal. Biochem.*, 55 (1973) 85-92.
- 9 J.-P. PRIVAT, F. DELMOTTE, G. MIALONIER, P. BOUCHARD ET M. MONSIGNY, *Eur. J. Biochem.*, 47 (1974) 5-14.
- 10 F. M. DELMOTTE ET M. L. P. MONSIGNY, *Carbohydr. Res.*, 36 (1974) 219-226.
- 11 B. R. DEAN ET R. B. HOMER, *Biochim. Biophys. Acta*, 322 (1973) 141-144.
- 12 D. M. CHIPMAN, V. GRISARO ET N. SHARON, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 4388-4394.
- 13 A. YA. KHORLIN, E. A. SHASHKOVA ET S. E. ZURABYAN, *Carbohydr. Res.*, 21 (1972) 269-273.
- 14 T. OSAWA ET Y. NAKAZAWA, *Biochim. Biophys. Acta*, 130 (1966) 56-63.
- 15 S. A. BARKER, E. J. BOURNE, M. STACEY ET D. H. WHIFFEN, *J. Chem. Soc.*, (1954) 171-176.
- 16 K. HAYASHI, T. IMOTO ET M. FUNATSU, *J. Biochem. (Tokyo)*, 54 (1963) 381-387.
- 17 K. HAYASHI, M. KUGIMIYA ET M. FUNATSU, *J. Biochem. (Tokyo)*, 64 (1968) 93-97.
- 18 K. HAMAGUCHI ET H. SAKAI, *J. Biochem. (Tokyo)*, 57 (1965) 721-732.