

ÉTUDE PAR R.M.N.- ^{13}C ET ^1H DU (1 \rightarrow 6)- β -D-GLUCANE ET DES OLIGOSACCHARIDES LINÉAIRES ET CYCLIQUES CORRESPONDANTS

DANIELLE BASSIEUX, DIDIER GAGNAIRE ET MICHEL VIGNON*

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

(Reçu le 13 juillet 1976; accepté sous forme modifiée le 6 octobre 1976)

ABSTRACT

The results of ^1H -n.m.r. and ^{13}C -n.m.r. studies of linear and cyclic oligosaccharides in the series of gentiodextrins, both in their hydroxylated and acetylated form, were compared to those obtained for the corresponding natural or synthetic polysaccharide. The ^{13}C -signals of each D-glucopyranose unit of acetylated oligosaccharides are more distinct than those of the parent hydroxylated compounds. In order to relate the change of the various signals with the degree of polymerization, gentiotriose undecaacetate, enriched in ^{13}C at C-1'', was prepared, as well as gentiotetraose tetradecaacetate selectively labeled at C-1'' and C-1'''. A (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan having a D.P. of ~ 10 was chemically prepared. During the course of the polycondensation, the 2,3,4,2',3',4'-hexa-O-acetyl-di- β -D-glucopyranosyl 1,6':6,1'-dianhydride, and the 2,3,4,2',3',4',2'',3'',4'',2''',3''',4''',2''',3''',4'''-dodeca-O-acetyl-tetra- β -D-glucopyranosyl 1,6''':6,1'''-tetraanhydride, respectively, were formed.

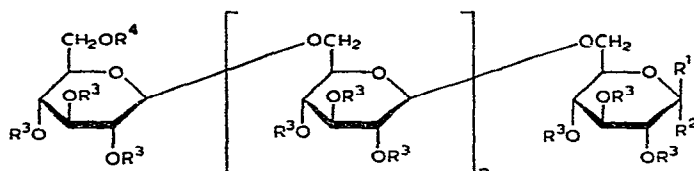
SOMMAIRE

Les résultats de l'étude r.m.n.- ^1H et ^{13}C des oligosaccharides linéaires ($n = 2, 3, 4, 6$) ou cycliques ($n = 2, 4$) hydroxylés ou acétylés dans la série des gentiodextrines sont comparés avec ceux du polysaccharide naturel ou synthétique correspondant. Les signaux des atomes de C de chaque unité D-glucopyranose restent longtemps distincts dans le cas des oligosaccharides acétylés, contrairement au cas des oligosaccharides hydroxylés correspondant. Afin d'observer l'évolution des différents signaux en fonction du D.P., nous avons préparé le gentiotriose undéca-acétate enrichi en ^{13}C sur C-1'' et le gentiotétraose tétradécaacétate enrichi en ^{13}C sur C-1'' ou C-1'''. Nous avons obtenu par polycondensation un (1 \rightarrow 6)- β -D-glucane de D.P. ≈ 10 ; au cours de la réaction se forment le 2,3,4,2',3',4'-hexa-O-acétyl-di- β -D-glucopyranosyl-1,6':6,1'-dianhydride et le 2,3,4,2',3',4',2'',3'',4'',2''',3''',4''',2''',3''',4'''-dodéca-O-acétyl-tétra- β -D-glucopyranosyl-1,6''':6,1'''-tétraanhydride.

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

1,2,3,4-tétra-*O*-acétyl-6-*O*-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranose (**4**) enrichi en ^{13}C sur C-1. Le disaccharide **6**, glycosylé par le bromure **1** ou par le bromure de 2,3,4-tri-*O*-acétyl-6-*O*-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranosyle (**8**), préparé¹⁰ à partir de **4**, fournit respectivement le trisaccharide **12** ou le tétrasaccharide **17**.

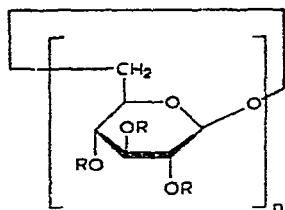
Le trisaccharide **13**, obtenu¹⁰ à partir du dérivé trichloroacétylé **11**, est glycosylé selon Helferich¹² par le bromure **1** pour donner le tétrasaccharide **18** enrichi en ^{13}C sur C-1'''. La libération sélective de l'ester trichloroacétique du dérivé¹⁰ **16** conduit à **19** qui est glycosylé, dans les conditions décrites ci-dessus, par le bromure **5** pour donner l'hexasaccharide **21**. Le bromure de 2,3,4-tri-*O*-acétyl-6-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranosyle¹³ (**7**) est autocondensé dans l'acétonitrile à 0° en présence de sels de mercure. On obtient d'une part les oligosaccharides linéaires attendus¹³ **25**, d'autre part deux oligosaccharides cycliques: le 2,3,4,2',3',4'-hexa-*O*-acétyl-di- β -D-glucopyranosyl 1,6':6,1'-dianhydride¹⁴ (**23**) résulte d'une réaction intramoléculaire du bromure **7** et correspond à un système tricyclique assez rigide, puisque les deux cycles à six atomes sont sous forme flexible; la réaction intermoléculaire de deux molécules de bromure **7** donne dans un



- 10 $n = 1$, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = R^4 = \text{Ac}$
 11 $n = 1$, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Ac}$, $R^4 = \text{CCl}_3\text{CO}$
 12 $n = 1$, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = R^4 = \text{Ac}$; ^{13}C en C-1''
 13 $n = 1$, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Ac}$, $R^4 = \text{H}$
 14 $n = 1$, $R^1, R^2 = \text{H}$, OH , $R^3 = R^4 = \text{H}$
 15 $n = 2$, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = R^4 = \text{Ac}$
 16 $n = 2$, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Ac}$, $R^4 = \text{CCl}_3\text{CO}$
 17 $n = 2$, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = R^4 = \text{Ac}$; ^{13}C en C-1''
 18 $n = 2$, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = R^4 = \text{Ac}$; ^{13}C en C-1'''
 19 $n = 2$, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Ac}$, $R^4 = \text{H}$
 20 $n = 2$, $R^1, R^2 = \text{H}$, OH , $R^3 = R^4 = \text{H}$
 21 $n = 4$, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = R^4 = \text{Ac}$
 22 $n = 4$, $R^1, R^2 = \text{H}$, OH , $R^3 = R^4 = \text{H}$

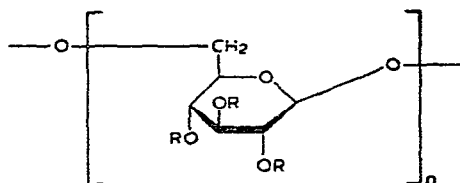
premier temps un tétrasaccharide qui, par cyclisation intramoléculaire, conduit au 2,3,4,2',3',4',2'',3'',4'',2''',3''',4''',2''''-dodéca-*O*-acétyl-tétra- β -D-glucopyranosyl-1,6''':6,1'''-tétraanhydride (**24**). La « self-condensation » du bromure **7** donne également une fraction d'oligosaccharides linéaires¹³ **25** de D.P. moyen ≈ 10 . On peut être étonné de ce D.P. qui est peu élevé; en fait au cours de la polycondensation plusieurs réactions parasites — acétylation du groupement hydroxyle primaire et désactivation de la position anomère avec formation de cyanure de glycosides (en effet, on a réaction de l'halogénure avec le cyanure mercurique) — sont susceptibles de se produire et donc de stopper la croissance de l'oligosaccharide. Les différents oligosaccharides à groupements hydroxyles libres **9**, **14**, **20**, **22**, et **26** ont été obtenus par méthanolyse¹⁵

à partir des dérivés acétylés correspondants. Tous les autres dérivés ont été préparés selon le mode opératoire précédemment décrit¹⁰.



23 $n = 2, R = \text{Ac}$

24 $n = 4, R = \text{Ac}$



25 $R = \text{Ac}$

26 $R = \text{H}$

Les oligosaccharides de synthèse (26) ont été comparés à un échantillon naturel de polysaccharide 26 (pustulane) obtenu par extraction du lichen *Umbilicaria pustulata*, selon le procédé de Lindberg et McPherson¹⁶.

Étude par résonance magnétique nucléaire. — L'analyse des spectres r.m.n.-¹H du D-glucose¹⁷, du gentiobiose¹⁸ et de leurs dérivés acétylés^{10,19} est dans l'ensemble connue. Nous donnons l'analyse du spectre du β -gentiotriose undécaacétate (10) que nous avons réalisée par double résonance inter-nucléaire (« Indor ») (Fig. 1). Dans le Tableau I sont reportés les déplacements chimiques des protons des différents composés peracétylés étudiés. Quand des protons apparaissent sous forme d'un multiplet complexe, nous avons indiqué les déplacements chimiques des extrémités du massif.

En ce qui concerne les spectres r.m.n.-¹³C, pour certains composés étudiés (3, 21, 23, 24 et 26) une série d'irradiations aux fréquences de résonance des protons permet d'attribuer les signaux des atomes de ¹³C sans ambiguïté. Pour les autres dérivés, en particulier les oligosaccharides, il est difficile d'attribuer les différents signaux ¹³C par irradiation sélective hétéronucléaire, car la plupart des protons résonnent à des fréquences trop rapprochées. Il s'est donc avéré utile de marquer certains sites afin de contrôler l'évolution de ces signaux en fonction du D.P. des oligosaccharides correspondants.

Nous avons marqué un des atomes de carbone anomères du gentiotriose undécaacétate et deux des atomes de carbone anomères du gentiotétraose tétradécaacétate. Il était possible de marquer la position anomère avec ²H ou ¹³C. Nous avons choisi le marquage ¹³C qui donne du point de vue r.m.n.-¹H les mêmes informations par suite de l'existence des couplages $J_{^{13}\text{C}-^1\text{H}}$, mais qui permet du point de vue r.m.n.-¹³C d'attribuer les signaux des atomes de carbone voisins par suite de l'existence du couplage $^1J_{^{13}\text{C}-^{13}\text{C}}$. Dans cet article nous nous sommes limités à l'enrichissement des atomes de carbone anomères; dans un trisaccharide, l'atome de carbone anomère de l'extrémité réductrice est facile à identifier; il suffit donc de préparer le trisaccharide 12 enrichi sur C-1" qui est le plus facile à obtenir. En ce qui concerne le β -gentiotétraose tétradécaacétate, il faut marquer deux des trois atomes

de carbone de jonctions (C-1', C-1'' ou C-1'''); nous avons évidemment préparé le gentiotétraose **17** enrichi en C-1'' et le tétramère **18** enrichi en C-1'''.

(a) *Spectres ^{13}C et ^1H des dérivés acétylés.* C'est dans cette série que le marquage au ^{13}C a été utilisé, le principe d'analyse qui suit présentant un caractère général. Quand un dérivé est enrichi en ^{13}C sur une position, on peut mesurer les constantes de couplages de cet atome de carbone avec les protons ou les atomes de carbone de la molécule (avec lesquels il est couplé) et utiliser ces valeurs pour identifier certains protons ou certains atomes de carbone.

Dans le cas du gentiotriose undécaacétate (**12**) enrichi en C-1'', on peut constater dans le spectre proton la disparition du signal H-1'' à δ 4.61 (d, $J_{1'',2''}$ 8 Hz) car chaque raie se trouve dédoublée par la présence du ^{13}C avec un écart $^1J_{^{13}\text{C}-1'', ^1\text{H}-1''} \simeq 162$ Hz; toutefois il subsiste un doublet de faible intensité qui correspond au dérivé non enrichi. Par ailleurs, on constate une modification dans la région du proton H-2'', car on a un couplage 2J entre le $^{13}\text{C}-1''$ et le proton H-2''.

Dans le spectre ^{13}C , la position enrichie donne un signal très intense pour **12**, ce qui permet d'attribuer C-1'' (et par voie de conséquence d'en déduire C-1'). Par ailleurs, l'existence d'un couplage $^1J_{^{13}\text{C}-1'', ^{13}\text{C}-2''}$ de l'ordre de 45 Hz permet d'identifier C-2''.

De la même façon, les deux gentiotétraoses tétradécaacétates **17** et **18**, marqués au ^{13}C , permettent d'attribuer sans ambiguïté les protons H-1', H-1'' et H-1''', les atomes de carbone C-1', C-1'' et C-1''' ainsi que C-2'' et C-2'''.

On peut constater que les attributions non ambiguës (marquage et irradiation sélective) réalisées pour certains groupes de signaux sont parfois inattendues: par exemple, le cas des C-2 du tétramère **15** ou l'évolution des signaux relatifs aux protons H-1 pour ce même dérivé montrent combien il serait dangereux d'attribuer les signaux à l'aide d'un raisonnement analogique s'appuyant sur les positions des signaux correspondants du dimère **3** et du trimère **10**.

La discussion qui suit s'appuie dans toute la mesure du possible sur des attributions certaines, mais s'y ajoutent des attributions par analogie qui sont données à titre indicatif.

(i) *R.m.n.- ^1H .* Le spectre du gentiobiose octaacétate (**3**) a déjà été partiellement analysé¹⁰; des données supplémentaires figurent dans le Tableau I; dans ce travail, nous avons entièrement analysé le spectre r.m.n.- ^1H du gentiotriose undécaacétate (**10**) (Fig. 1). En effet, le dérivé **12** enrichi en ^{13}C en C-1'' permet comme on vient de le voir de déterminer H-1' et H-1''. Il est donc possible par la technique « Indor », en partant de H-1, H-1' et H-1'', d'attribuer tous les protons.

Si l'on compare les spectres de r.m.n.- ^1H des di-, tri-, tétra-, hexa- et polysaccharides acétylés (voir Tableau I), on observe en général une progression logique dans la série, le spectre se simplifiant au fur et à mesure que le D.P. augmente. En ce qui concerne l'évolution des signaux des protons H-1 glycosidiques (voir Tableau I) on s'aperçoit que les variations de déplacements chimiques sont relativement faibles

TABLEAU I

DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DES ^1H DES DI-, TRI-, TÉTRA-, HEXA- ET POLYSACCHARIDES FORMÉS D'UNITÉS PERACÉTYLÉES DU D-GLUCOSE LIÉES β -(1 \rightarrow 6)

Composé	Déplacements chimiques ^a					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 ^b
3	4,56 (1') 5,70 (1)	4,95 (2') 5,07 (2)	5,19 (3') 5,24 (3)	4,99 (4) 5,05 (4')	3,69 (5') 3,81 (5)	3,59 (6b) 3,95 (6a) 4,13 (6''b) 4,27 (6'a)
10	4,52 (1') 4,61 (1'') 5,70 (1)	4,91 (2') 4,95 (2'') 5,07 (2)	5,16 (3') 5,20 (3'') 5,24 (3)	4,89 (4') 5,04 (4) 5,05 (4')	3,63-3,72 (5') 3,68-3,78 (5'') 3,76-3,84 (5)	3,57 (6b) 3,62 (6'b) 3,86 (6'a) 3,98 (6a) 4,14 (6''b) 4,26 (6'a)
15	4,54 (1') 4,57 (1'') 4,60 (1''') 5,69 (1)	4,88-5,15 [4 H]	5,15-5,3 [4 H]	4,88-5,15 [4 H]	3,5-4,1 [4 H]	3,5-4,1 [6 H] 4,15 (6'''b) 4,30 (6'''a)
21	4,54 (1') 4,57 (1'') 4,61 [3 H] 5,72 (1)	4,88-5,15 [6 H]	5,15-5,3 [6 H]	4,88-5,15 [6 H]	3,55-4,06 [6 H]	3,55-4,06 [10 H] 4,14 (6'''b) 4,33 (6'''a)
25	4,60	4,92	5,2	4,92	3,5-4	3,5-4 ^c
23	4,76	4,98	5,12	6,00	3,87	3,67 (6b) 4,03 (6a)
24	4,73 4,90 ^d	5,02 4,98 ^d	5,24 5,22 ^d	5,02 4,96 ^d	3,5-4 3,8-4,1 ^d	3,5-4 3,8-4,1 ^d

^aEn p.p.m. par rapport à Me₄Si en réf. interne dans le chloroforme-*d*. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux numéros des protons; les chiffres entre crochets suivis de la lettre H à leur nombre (déterminé d'après l'intensité relative des signaux). Le symbole prime (') se rapporte à l'unité voisine de l'unité terminale réductrice, le symbole seconde (') à l'unité suivante, et ainsi de suite. ^bPour H-6, a et b se réfèrent aux protons à bas champ et haut champ respectivement. ^cLa largeur des raies et la présence de signaux de faible intensité (qui correspondent à des unités terminales) ne permettent pas l'analyse des trois protons H-5, H-6a et H-6b. ^dEn p.p.m. par rapport à Me₄Si en réf. interne dans l'acétone-*d*₆.

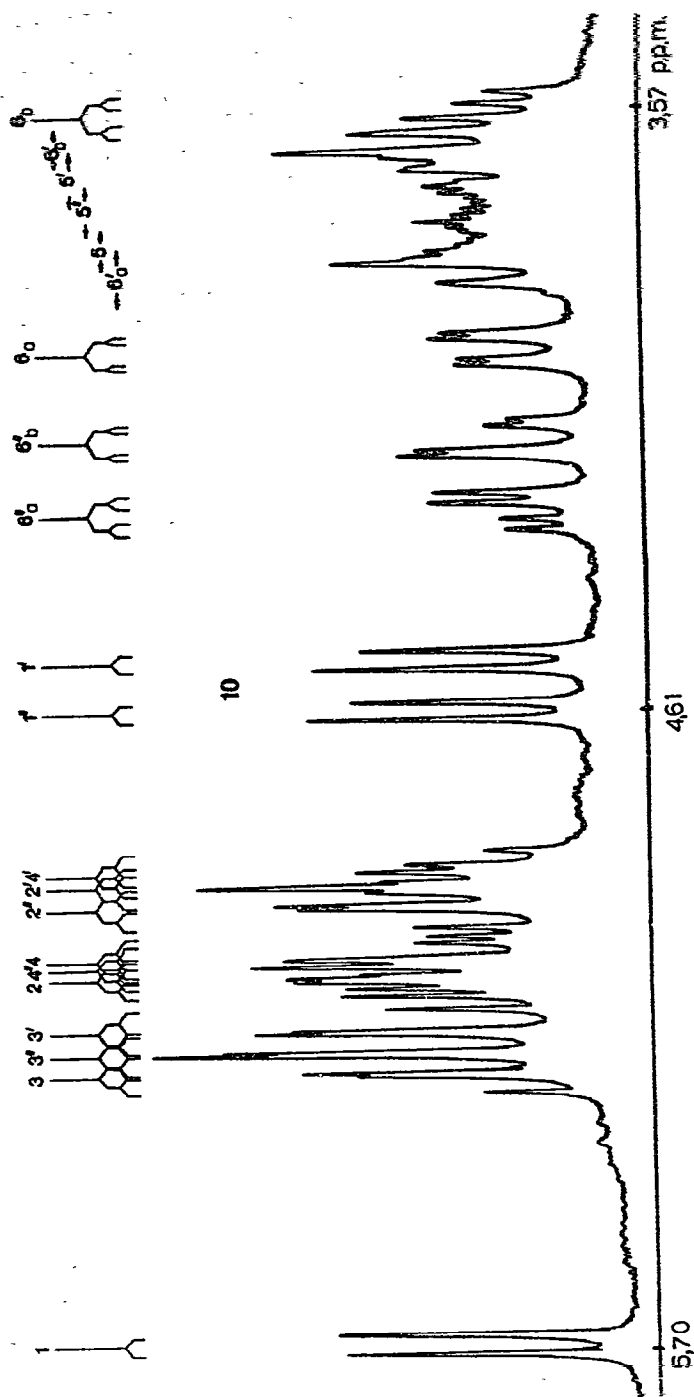


Fig. 1. Spectre r.m.n. ^1H à 250 MHz du β -gentiotriose undécanoate dans le chloroforme- d .

(<0,1 p.p.m.) et que le signal du polysaccharide apparaît à champ faible (4,6 p.p.m.). Pour le tri- et le tétrasaccharide ce sont les protons H-1 du cycle de l'unité terminale non réductrice qui représentent le meilleur modèle pour le polysaccharide 25 (4,61 et 4,60 p.p.m. respectivement). Les deux protons méthyléniques de l'extrémité non réductrice (en position vicinale d'un groupe acétate) donnent des signaux parfaitement individualisés (entre 4,14 et 4,33 p.p.m.) dans 3, 10, 15, ainsi que dans l'hexasaccharide 21 ou le polysaccharide 25 obtenu par « autocondensation », ce qui nous a permis une évaluation¹³ de son D.P. par un dosage r.m.n.-¹H.

Dans le polysaccharide acétylé, le proton H-3 est celui qui résonne à champ faible, H-2 et H-4 apparaissant alors sous forme d'un seul massif. Le tétramère cyclique 24 est un bon modèle pour le polysaccharide (1→6)- β -D-glucane d'après la r.m.n.-¹H, car les protons correspondants ont des déplacements chimiques et des constantes de couplages comparables (à l'exception de H-1).

(ii) R.m.n.-¹³C. À 62,84 MHz, les signaux des C-1 des oligosaccharides acétylés engagés dans une liaison glycosidique sont tous individualisés. Grâce aux dérivés marqués 12, 17 et 18 ces signaux (schématisés sur la Fig. 2) sont identifiés jusqu'au tétramère. Dans le cas du polysaccharide 25 on a un signal C-1 à 101 p.p.m.: c'est donc le C-1''' (unité terminale non réductrice) du tétrasaccharide qui apparaît comme le meilleur modèle pour le polysaccharide 25.

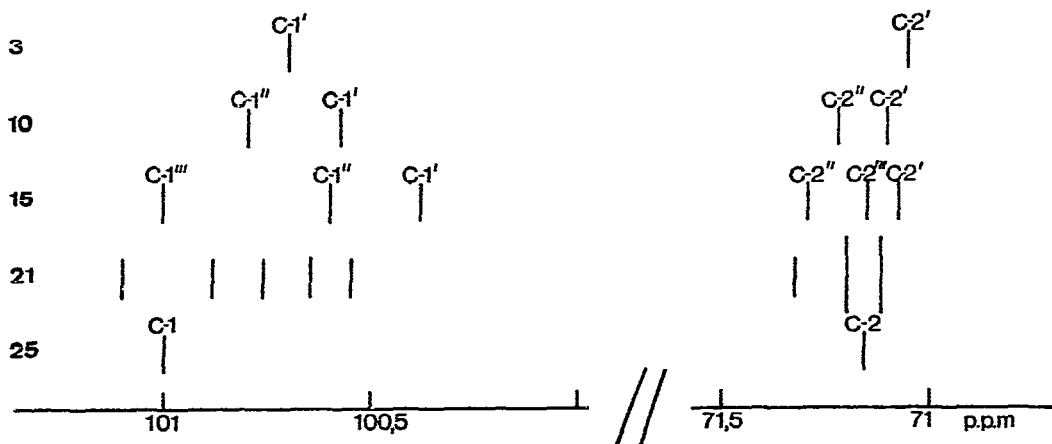


Fig. 2. Évolution des signaux C-1 et C-2 en fonction du D.P. de l'oligosaccharide.

Les signaux des C-2 se situent entre 71 et 71,5 p.p.m. (à l'exception du C-2 de l'extrémité réductrice qui est toujours un peu à l'écart, aux alentours de 70,40–70,50 p.p.m.). Grâce aux dérivés enrichis il est possible d'attribuer ces atomes de carbone jusqu'au tétramère (Fig. 2). Dans le spectre du gentiohexaose (21), on peut attribuer le signal à 70,49 p.p.m. au C-2; pour ce qui est des autres atomes de carbone, on ne peut pas se prononcer, mais on constate la présence de deux signaux d'intensité double à 71,12 et 71,20 p.p.m. voisins du signal du C-2 du polysaccharide acétylé

(71,16 p.p.m.). Comme on peut le voir dans le cas du tétrasaccharide **15** (Fig. 2), l'évolution des signaux des C-2 est différente de celles des C-1 : cependant c'est encore l'atome de carbone de l'unité terminale non réductrice qui apparaît comme étant le meilleur modèle pour l'interprétation des données du polysaccharide **25**.

Les signaux des C-3 et C-5 des dérivés acétylés se situent entre 72 et 74 p.p.m. Le signal vers 72-72,2 p.p.m., qui se différencie des autres signaux par son déplacement chimique plus faible, correspond en effet au C-5 de l'unité terminale non réductrice. On peut constater que les signaux des C-3 du gentiobiose **3** ou du gentiotriose **10** ne sont pratiquement pas déplacés, alors que les signaux des C-5 vont encore subir beaucoup de variations dans leurs déplacements chimiques. Dans l'hexamère, on a un signal très intense à 72,92 p.p.m. qui correspond à 7 des 12 atomes de carbone C-3 et C-5, et dans le polysaccharide **25** les signaux des C-3 et C-5 sont confondus (72,94 p.p.m.).

Les signaux des C-4 (68,57 p.p.m.) et C-4' (68,53 p.p.m.) du gentiobiose (**3**) sont pratiquement confondus; dans le spectre du gentiotriose (**10**) on observe un signal supplémentaire à 69,18 p.p.m. que l'on peut donc attribuer au C-4' de l'unité intermédiaire, les signaux à 68,45 et 68,55 p.p.m. correspondant aux C-4 et C-4'' des deux unités terminales. Pour le gentiotétraose (**15**), on observe deux signaux pratiquement confondus à 69,13 et 69,18 p.p.m. que l'on peut attribuer aux C-4' et C-4'', les signaux à 68,60 et 68,67 p.p.m. correspondent aux C-4 et C-4''' des deux unités terminales. Ces attributions sont établies d'après le spectre de l'hexamère **21** pour lequel on observe un seul signal à 69,25 p.p.m. (et dont l'intensité correspond à 4 atomes de carbone); on retrouve le signal du C-4 dans le polysaccharide à 69,33 p.p.m. (voir Tableau II).

Les signaux des atomes de carbone primaires non engagés dans une liaison glycosidique (CH_2OH ou CH_2OAc) sont nettement différenciés de ceux des atomes de carbone secondaires du squelette; dans tous les mono- et disaccharides déjà étudiés⁶ ces atomes de carbone résonnent aux environs de 62 p.p.m. Ceci se vérifie très bien pour les oligosaccharides acétylés **10**, **15** et **21** de D.P. supérieur, le signal du C-6 de l'unité terminale non réductrice apparaît à 61,95 p.p.m. dans le dimère et le trimère, à 62,09 p.p.m. dans le tétramère et l'hexamère. Quand ces atomes sont engagés dans une liaison glycosidique, leurs signaux sont déplacés de 4 à 6 p.p.m. vers les champs faibles dans la région où résonnent les C-4 terminaux: à 67,48 et 68,16 p.p.m. dans le trisaccharide **10**; à 67,39, 68,13 et 68,38 p.p.m. dans le tétrasaccharide **15**. Dans le polysaccharide **25**, on observe un signal unique à 68,55 p.p.m.

(b) Spectres ^{13}C et ^1H des dérivés à groupements hydroxylés libres. (i) R.m.n.- ^1H . Le spectre r.m.n.- ^1H du mélange à l'équilibre des anomères du gentiobiose a totalement été analysé par De Bruyn *et al.*¹⁸; si l'on compare les spectres r.m.n.- ^1H des α,β -gentiobiose (**9**), α,β -gentiotriose (**14**), α,β -gentiotétraose (**20**) et α,β -gentiohexaose (**22**) avec celui du polysaccharide **26**, on constate d'une part la présence de signaux à intensité décroissante, qui correspondent à*: δ 4,31, H-1 α ; 3,83, H-1 β ; 3,18, H-5 α ;

*Pour l'unité terminale non réductrice, le signal est suivie de la lettre t (terminal); les δ sont exprimés en p.p.m. par rapport à Me_4Si en tube capillaire comme référence externe.

TABLEAU II

DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DES ^{13}C DES DI-, TRI-, TÉTRA-, HEXA- ET POLYSACCHARIDES FORMÉS D'UNITÉS PERACÉTYLÉES DU D-GLUCOSE LIÉES β -(1 \rightarrow 6)

Composé	Déplacements chimiques ^a			
	C-1 [*]	C-2	C-3 ^b et C-5 ^b	C-4 ^b et C-6 ^b
3	91,71 (1)	70,40 (2)	72,02 (5')	61,95 (6')
	100,69 (1')	71,05 (2')	72,85 (3')	67,55 (6)
			72,94 (3)	68,53 (4')
			73,99 (5)	68,57 (4)
10	91,78 (1)	70,47 (2)	72,05 (5')	61,95 (6')
	100,57 (1')	71,10 (2')	72,82 (3') ^c	67,48 (6) ^c
	100,79 (1')	71,22 (2')	72,90	68,16 (6') ^c
			72,99	68,45
			73,38 (5') ^c	68,55
			73,74 (5) ^c	69,18
15	91,73 (1)	70,49 (2)	72,12 (5'')	62,09 (6'')
	100,37 (1')	71,07 (2')	72,77	67,39
	100,59 (1')	71,15 (2'')	72,87 [3 C]	68,13
	101,00 (1'')	71,29 (2')	73,19 [2 C]	68,38
			73,65	68,60
				68,67
				69,13
				69,18
21	91,73 (1)	70,49 (2)	72,19 (5''')	62,09 (6''')
	100,54	71,12 [2 C]	72,80	67,43
	100,64	71,20 [2 C]	72,92 [7 C]	68,26
	100,76	71,32	73,19 [2 C]	68,43
	100,88		73,72	68,48
	101,10			68,57 [3 C]
				69,25 [4 C]
25	101	71,16	72,94 [2 C]	68,55 (6)
				69,33 (4)
23	99,94	74,93	72,86 (5)	66,60 (4)
			73,16 (3)	71,09 (6)
24	100,50	71,00	73,02 (3)	67,09 (6)
			73,99 (5)	68,70 (4)

^aEn p.p.m. par rapport à Me₄Si en réf. interne dans le chloroforme-*d*. Le symbole prime (') se rapporte à l'unité voisine de l'unité terminale réductrice, le symbole seconde (") à l'unité suivante, et ainsi de suite. Les chiffres entre parenthèses correspondent à la numérotation des atomes de carbone; les chiffres entre crochets suivis de la lettre C à leur nombre (déterminé d'après l'intensité relative des signaux). ^bIl est impossible de différencier de façon non ambiguë tous les signaux; cependant certaines attributions par analogie ont été discutées (voir le texte). ^cCe sont les couplages $^2J_{^{13}\text{C}-1, ^{13}\text{C}-3}$, $^2J_{^{13}\text{C}-1, ^{13}\text{C}-6}$, $^3J_{^{13}\text{C}-1, ^{13}\text{C}-6}$ et $^3J_{^{13}\text{C}-1, ^{13}\text{C}-5}$, qui permettent d'attribuer les signaux des carbones C-3', C-6', C-6'' et C-5'.

2,92, H-6b(t); 2,91, H-3 α ; 2,73, H-2 α ; 2,45, H-2 β . D'autre part, on constate la présence de signaux complexes d'intensité croissante qui correspondent aux six régions du polysaccharide, qui a lui-même été analysé par double irradiation (voir Fig. 3): δ 3,71, H-1; 3,50, H-6a; 3,16, H-6b; 2,91, H-5; 2,81, H-3; 2,74, H-4; 2,63, H-2

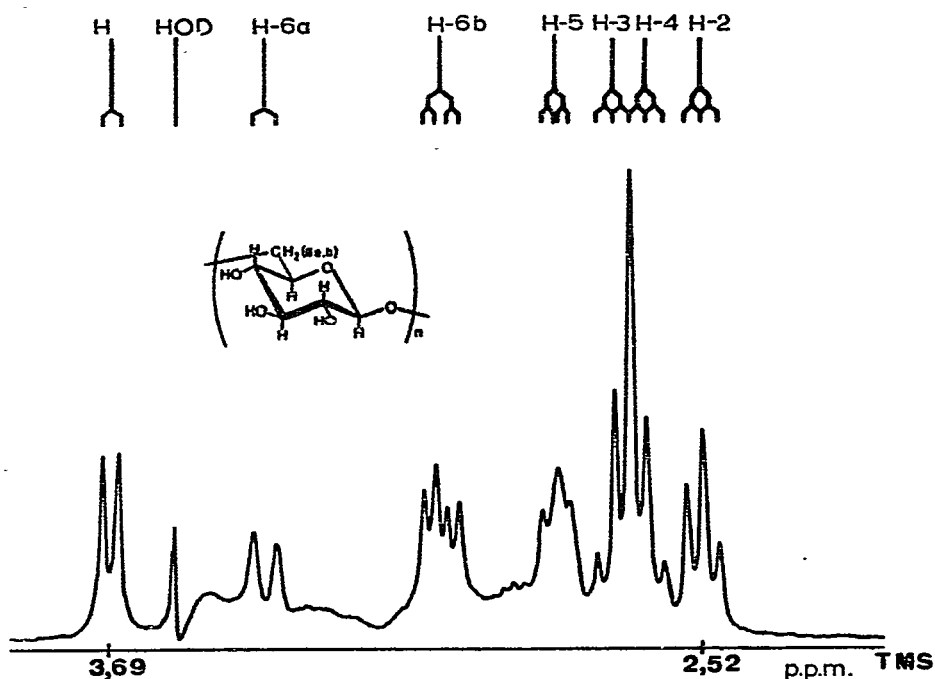


Fig. 3. Spectre r.m.n.- ^1H à 250 MHz en transformée de Fourier du (1 \rightarrow 6)- β -D-glucane (pustulane) dans D_2O .

Nous avons déterminé le pourcentage à l'équilibre des anomères α et β dans la série des gentiodextrines (en solution dans l'oxyde de deutérium) en comparant les surfaces relatives aux protons H-1 α et H-1 β de l'unité terminale réductrice; on trouve un rapport de α à β de 9:16 indépendant du D.P. de l'oligosaccharide ($n = 2,3,4,6$) et ce rapport est identique à celui trouvé par Lemieux *et al.*¹⁷ pour le D-glucopyranose.

(ii) R.m.n.- ^{13}C . Les spectres r.m.n.- ^{13}C du gentiobiose et du gentiotriose ont été interprétés par Usui *et al.*²⁰. Nous avons reporté dans le Tableau III les déplacements chimiques des signaux ^{13}C des dérivés étudiés à groupements hydroxyles libres; on peut constater d'après ce tableau que chaque unité conserve beaucoup moins longtemps son individualité que dans le cas des dérivés acétylés; en effet, si on compare le spectre du gentiotriose avec celui du gentiobiose, on s'aperçoit que beaucoup de signaux se superposent (C-1', C-2', C-3', C-5' et C-6). Si l'on compare maintenant le spectre du gentiotriose avec celui du polysaccharide correspondant, on peut constater que les signaux des atomes de carbone de l'unité centrale du gentiotriose coïncident avec ceux du polysaccharide; donc, pour l'étude par r.m.n.- ^{13}C , l'unité centrale du gentiotriose hydroxylé (14) constitue un bon modèle du (1 \rightarrow 6)- β -D-glucane.

D'après les résultats reportés dans ce mémoire il faut souligner (a) le danger des analogies trop poussées et donc l'utilité du marquage; (b) que les signaux des atomes de carbone des dérivés acétylés restent très longtemps distincts contrairement

à ceux des dérivés à groupements hydroxyles libres, ce qui démontre que les extrémités des chaînes prennent plus rapidement une conformation stable dans le cas des dérivés à groupements hydroxyles libres que dans le cas des dérivés acétylés; (c) que le dérivé cyclique $n = 4$ apparaît comme un modèle satisfaisant du (1 \rightarrow 6)- β -D-glucane, du point de vue r.m.n.- ^1H ou ^{13}C ; cependant les déplacements chimiques sont parfois différents, c'est pourquoi un composé de D.P. supérieur, par exemple l'hexamère, serait préférable.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthodes générales. — Le D-glucose enrichi à 86 % en ^{13}C sur C-1 est fabriqué par le service des molécules marquées, Commissariat à l'Énergie Atomique (C.E.A.), Saclay, France. Les points de fusion (non corrigés) ont été mesurés sur appareil Buchi-Tottoli ou platine Leitz. Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés sur polarimètre « Quick » Roussel-Jouan. Les chromatographies ont été réalisées sur colonnes de silice « Kieselgel 60 », 0,063–0,2 mm (Merck, Darmstadt); sur couches (0,25 mm pour la c.c.m. analytique ou 2 mm pour la c.c.m. préparative) de « Kieselgel G » ou de « Kieselgel F₂₅₄ » en plaques finies éluées par benzène-acétone (3:1). Les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre MS-30 (AEI). Les analyses ont été effectuées par le Service Central de Microanalyse du C.N.R.S.

Les spectres r.m.n.- ^1H (100 mg dans 0,5 ml) ont été enregistrés sur un spectromètre Cameca 250 MHz; les déplacements chimiques δ , mesurés sur des solutions dans le chloroforme- d sont exprimés en p.p.m. à partir du signal de Me_4Si ; sur des solutions dans D_2O , ils sont donnés par rapport à Me_4Si en tube capillaire comme référence externe.

Les spectres r.m.n.- ^{13}C , pour lesquels on effectue un découplage par bruit des protons, ont été obtenus à 62,84 MHz sur un spectromètre Cameca en transformée de Fourier (mémoire 16 K, bande spectrale 12 500 Hz, résolution digitale 1,5 Hz). Ils sont réalisés en tube de 5 mm (100 mg dans 0,5 ml) dans le chloroforme- d (Me_4Si en référence interne) ou D_2O (Me_4Si en tube capillaire comme référence externe). La durée de l'impulsion est de 10 μs ($\sim 70^\circ$) et l'intervalle entre les impulsions de 0,6 s (ce qui correspond au temps d'acquisition).

Undécaacétate du β -gentiotriose (12). — Il est préparé selon le mode opératoire décrit par ailleurs¹⁰, p.f. 217° , $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 7^\circ$ (c 1 chloroforme); litt.⁹: p.f. $221\text{--}223^\circ$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 7,4^\circ$ (chloroforme); litt.¹⁵: p.f. $211\text{--}211,5^\circ$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 7,0^\circ$ (c 2, chloroforme); litt.²¹: p.f. $214\text{--}215^\circ$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 9,4^\circ$ (chloroforme).

O-(2,3,4-Tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-O-(2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-1,2,3,4-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranose (décaacétate du β -gentiotriose) (13). — Il est obtenu par libération de l'ester trichloroacétique par le mélange pyridine-méthanol sur le dérivé¹⁰ 11 (rdt. 91 %), p.f. 201° , $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 5^\circ$ (c 1, chloroforme); litt.⁹: p.f. $123\text{--}125^\circ$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 5,2^\circ$ (c 1, chloroforme).

Tétradécaacétate du β -gentiotétraose (17) et (18). — Ils sont préparés selon le mode opératoire décrit par ailleurs¹⁰; le tétramère 17 à partir de 6 et 8 (rdt. 63 %),

le tétramère **18** à partir de **1** et **4** (rdt. 67 %). Les point de fusion et pouvoir rotatoire sont conformes aux données de la littérature; litt.⁹: point de ramollissement 134–136°, p.f. 212–213°, $[\alpha]_D^{20} -10,7^\circ$ (chloroforme); litt.¹⁵: p.f. 134–135°, $[\alpha]_D^{20} -10,9^\circ$ (c 2, chloroforme); litt.²¹: p.f. 134–135°, $[\alpha]_D^{20} -12,0^\circ$ (chloroforme).

Tridécaacétate du β -gentiotétraose (19). — On dissout **16** (1,6 g, 1,18 mmol) dans un mélange anhydre de chloroforme (10 ml), de pyridine (1 ml) et de méthanol (1 ml); après 2 h à température ambiante la solution est diluée par du toluène anhydre et évaporée à sec dans des conditions anhydres; après cristallisation dans chloroforme-éther éthylique on récupère 1,3 g (91 %) de **19**, p.f. 132–133°, $[\alpha]_D^{20} -3^\circ$ (c 1, chloroforme).

Anal. Calc. pour $C_{50}H_{68}O_{34}$: C, 49,51; H, 5,65. Trouvé: C, 48,43; H, 5,60.

Icosaacétate du β -gentiohexaose (21). — Il est préparé selon un mode opératoire précédemment décrit¹⁰, par condensation du tétramère **19** (1,21 g, 1 mmol) avec le bromure **5** (0,91 g, 1,3 mmol) ajouté en deux fois en présence de $Hg(CN)_2$ (190 mg, 0,75 mmol) et de $HgBr_2$ (15 mg) dans le 1,2-dichloroéthane; le mélange brut est chromatographié sur colonne de silice; on récupère 690 mg d'une fraction d'où cristallise **21** (600 mg, 32,8 %) de chloroforme-éthanol, p.f. 120°, $[\alpha]_D^{20} -4^\circ$ (c 1, chloroforme); r.m.n.-¹H et -¹³C: voir Tableaux I et II.

Anal. Calc. pour $C_{76}H_{102}O_{51}$: C, 49,84; H, 5,61. Trouvé: C, 49,45; H, 5,78.

Gentiohexaose (22). — Le dérivé **21** est désacétylé dans un milieu méthanol-triéthylamine-eau (10:1:1, 15 ml) pendant 12 h à température ambiante. Après évaporation des solvants, on récupère **22** (poudre amorphe) avec un rendement quantitatif, $[\alpha]_D^{20} -21^\circ$ (c 1, eau, 24 h); litt.⁹: $[\alpha]_D^{20} -12,0^\circ$ (c 2,51, eau, 24 h); litt.²¹: $[\alpha]_D^{20} -28,0^\circ$ (eau).

Anal. Calc. pour $C_{36}H_{62}O_{31} \cdot 4H_2O$: C, 40,68; H, 6,64. Trouvé: C, 40,47; H, 6,48.

2,3,4,2',3',4'-Hexa-O-acétyl-di- β -D-glucopyranosyl-1,6'-6,1'-dianhydride (23) et 2,3,4,2',3',4',2'',3'',4'',2''',3''',4''',4''''-dodéca-O-acétyl-tétra- β -D-glucopyranosyl-1,6'''-6,1'''-tétraanhydride (24). — La polycondensation du bromure de 2,3,4-tri-O-acétyl-6-O-(2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranosyle (**7**, 1,05 g, 1,6 mmol) a été récemment décrite¹³; à côté des oligosaccharides linéaires **25**, on a réussi à cristalliser dans l'éthanol à partir du mélange brut **24** (55 mg, 6 %), p.f. 212°, $[\alpha]_D^{20} -24^\circ$ (c 1, chloroforme); r.m.n.-¹H et -¹³C: voir Tableaux I et II; la masse a été déterminée par tonométrie (calc.: 1154; trouvé 1200); s.m.: pas de M^+ , m/e 1093 ($M^+ - AcO\cdot$).

Anal. Calc. pour $C_{48}H_{64}O_{32}$: C, 50,00; H, 5,59. Trouvé: C, 49,82; H, 5,83.

Les eaux de cristallisation sont évaporées et chromatographiées sur colonne de silice (benzène-éther éthylique, 13:7). On récupère le composé¹⁴ **23** après cristallisation dans chloroforme-éther éthylique (117 mg, 12,7 %), p.f. 165°, $[\alpha]_D^{20} +85^\circ$ (c 5,1, chloroforme); r.m.n.-¹H et -¹³C: voir Tableaux I et II; s.m.: pas de M^+ , m/e 487 [$M^+ - (AcOH + CH_2O)\cdot$], caractéristique des dérivés^{22,23} (1→6).

(1→6)- β -D-Glucane (**26**) et dérivé acétylé **25**. — Par synthèse d'après le mode opératoire décrit récemment¹³, on obtient le polysaccharide **25** qui est ensuite

désacétylé (méthode de Zemplén *et al.*¹⁶) pour donner le D-glucane 26. Les spectres r.m.n. de ce glucane sont identiques à ceux du polysaccharide isolé: (a) du lichen *Umbilicaria pustulata* selon le mode opératoire décrit par Lindberg et McPherson¹⁵; (b) du lichen *Gyrophora esculenta* par Shibata²⁴. On peut acétyler l'échantillon naturel 26 en 25 selon le procédé de Carson et Maclay²⁵; on obtient alors des échantillons très insolubles qui donnent de très mauvais spectres r.m.n.- ^{13}C ; les valeurs reportées dans le Tableau II pour le composé 25 correspondent uniquement à l'échantillon synthétique.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur le Professeur B. Lindberg qui nous a envoyé un échantillon de lichen *Umbilicaria pustulata* et Monsieur le Professeur S. Shibata pour un échantillon de (1 \rightarrow 6)- β -D-glucane, ainsi que le Dr. K. Bock pour une intéressante discussion concernant les spectres r.m.n. du dérivé 23. Nous remercions Monsieur C. Bosso pour la réalisation des spectres de masse, ainsi que le Laboratoire Grenoblois de Résonance Magnétique Nucléaire qui nous a donné libre accès au spectromètre Cameca.

RÉFÉRENCES

- 1 D. E. DORMAN ET J. D. ROBERTS, *J. Am. Chem. Soc.*, 93 (1971) 4463-4472.
- 2 Y. TERUI, K. TORI ET N. TSUJI, *Tetrahedron Lett.*, (1976) 621-622.
- 3 M. R. VIGNON ET P. J. A. VOTTERO, *Tetrahedron Lett.*, (1976) 2445-2448; M. R. VIGNON ET P. J. A. VOTTERO, *Carbohydr. Res.*, 53 (1977) 197-207.
- 4 J. FEENEY, D. SHAW ET P. J. S. PAUWELS, *Chem. Commun.*, (1970) 554-555; B. BIRDSALL ET J. FEENEY, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, (1972) 1643-1649.
- 5 N. S. BHACCA, F. W. WEHRLI ET N. H. FISCHER, *J. Org. Chem.*, 38 (1973) 3618-3622.
- 6 D. Y. GAGNAIRE, F. R. TARAVEL ET M. R. VIGNON, *Carbohydr. Res.*, 51 (1976) 157-168.
- 7 P. A. J. GORIN, *Can. J. Chem.*, 52 (1974) 458-461; P. A. J. GORIN, *Carbohydr. Res.*, 39 (1975) 3-10.
- 8 A. S. PERLIN ET B. CASU, *Tetrahedron Lett.*, (1969) 2921-2924; J. A. SCHWARCZ ET A. S. PERLIN, *Can. J. Chem.*, 50 (1972) 3667-3676.
- 9 K. TAKIURA, S. HONDA, T. ENDO ET K. KAKEHI, *Chem. Pharm. Bull.*, 20 (1972) 438-442.
- 10 G. EXCOFFIER, D. Y. GAGNAIRE ET M. R. VIGNON, *Carbohydr. Res.*, 46 (1975) 201-213; G. EXCOFFIER, Thèse d'État (Grenoble, septembre 1974) inventoriée au C.N.R.S. sous le n° A.O. 8739.
- 11 R. L. WHISTLER, L. W. DONER ET M. KOSIK, *Methods Carbohydr. Chem.*, 6 (1972) 411-412.
- 12 B. HELFERICH ET J. ZIRNER, *Chem. Ber.*, 95 (1962) 2604-2611.
- 13 D. Y. GAGNAIRE ET M. R. VIGNON, *Carbohydr. Res.*, 51 (1976) 140-144.
- 14 D. Y. GAGNAIRE, V. TRAN ET M. VIGNON, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1 (1976) 6-7.
- 15 G. ZEMPLÉN, A. GERECS ET I. HADACSY, *Ber.*, 69 (1936) 1827-1829.
- 16 B. LINDBERG ET J. MCPHERSON, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 985-988.
- 17 R. U. LEMIEUX ET J. D. STEVENS, *Can. J. Chem.*, 44 (1966) 249-262.
- 18 A. DE BRUYN, M. ANTEUNIS ET G. VERHEGGE, *Bull. Soc. Chim. Belge*, 84 (1975) 721-734.
- 19 R. U. LEMIEUX ET J. D. STEVENS, *Can. J. Chem.*, 43 (1965) 2059-2070.
- 20 T. USUI, N. YAMAOKA, K. MATSUDA, K. TUZIMURA, H. SUGIYAMA ET S. SETO, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, (1973) 2425-2432.
- 21 S. HAQ ET W. J. WHELAN, *J. Chem. Soc.*, (1956) 4543-4549.
- 22 K. HEYNS ET H. SCHARMANN, *Carbohydr. Res.*, 1 (1966) 371-392.
- 23 N. K. KOCHETKOV, O. S. CHIZOV ET B. M. ZOLOTAREV, *Khim. Priir. Soedin.*, 2 (1966) 152-158.
- 24 Y. NISHIKAWA, M. TANAKA, S. SHIBATA ET F. FUKUOKA, *Chem. Pharm. Bull.*, 18 (1970) 1431-1434.
- 25 J. F. CARSON ET W. D. MACLAY, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (1946) 1015-1017.