

UTILISATION DE LA R.M.N. A HAUT CHAMP POUR LA DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE DE GLUCOSIDES SYNTHÉTISÉS PAR *Mucor hiemalis**

PIERRE GRANGER,

Laboratoire de Chimie, I.U.T. de Rouen, B.P. 47, 76130 Mont-Saint-Aignan (France)

RÉGINE HERBER, JEAN-BAPTISTE VILLOUTREIX,

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, B.P. 403, 54001 Nancy (France)

GORDANA HAJDUKOVIC

Laboratoire de Chimie Physique, Institut "Boris Kidric", B.P. 522, Belgrade (Yougoslavie)

ET YVES CHAPLEUR

Laboratoire de Chimie Organique II, Université de Nancy I, Case Officielle 140, 54037 Nancy (France)

(Reçu le 5 décembre 1977, accepte après modification le 14 juin 1978)

ABSTRACT

When added to cultures of *Mucor hiemalis*, various phenolic compounds are transformed into D-glucosides, the configuration of which was impossible to determine by enzymic hydrolysis. By ^1H - (250-MHz) and ^{13}C -n.m.r. high-resolution spectroscopy it was established that all the glucosides studied have the β -D configuration and the all-OH-equatorial $^4\text{C}_1(\text{D})$ conformation.

SOMMAIRE

Différents phénols introduits dans des cultures de *Mucor hiemalis* sont transformés en D-glucosides dont la configuration n'a pas pu être déterminée par hydrolyse enzymatique. En revanche, l'analyse des spectres de r.m.n. à 250 MHz a permis, grâce à la détermination de l'ensemble des paramètres proton et ^{13}C , de montrer que tous les glucosides étudiés sont tous de configuration β -D et de conformation all-OH-équatoriale $^4\text{C}_1(\text{D})$.

INTRODUCTION

Au cours de travaux antérieurs, nous avons montré que certains phénols, en particulier le 2-hydroxybiphényle, inhibent la biosynthèse des caroténoïdes chez

*Présente lors des Journées de Chimie et Biochimie des Glucides à Pont-a-Mousson en Octobre 1977. Ce travail a été effectué dans le cadre de l'Équipe de Recherche Associée au C.N.R.S. N° 159 et de la R.C.P. N° 467.

différents microorganismes^{1,2} Chez *Mucor hiemalis*, le 2-hydroxybiphényle ainsi que le thymol et le carvacrol se sont en revanche révélés totalement inactifs³ Cette constatation nous a donc conduits à rechercher si l'inactivité était due aux phénols eux-mêmes ou à leurs métabolites éventuels.

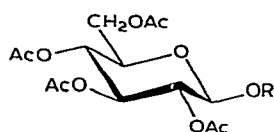
Dans le cas de *Mucor hiemalis*, l'origine de ce phénomène ne repose cependant pas, comme on pourrait le supposer, sur la dégradation oxydative des phénols que l'on constate souvent chez de nombreux microorganismes⁴ En effet, si l'on isole du milieu de culture de ce champignon les quinols correspondant aux phénols introduits, les quantités récupérées témoignent d'un taux de transformation ne dépassant pas 5 à 10%; ce qui est beaucoup trop faible pour rendre compte de l'absence totale d'action sur la caroténogénèse En revanche, 60 à 70% en moyenne de la quantité initiale d'inhibiteur est retrouvée sous forme de glucoside qui ne présente, ainsi que nous l'avons ultérieurement vérifié, aucune action anticaroténogène⁵

À la suite de différents essais, nous avons purifié plusieurs glucosides synthétisés par *Mucor hiemalis* et si leur identification n'a pas présenté de difficulté par ailleurs, la configuration de la liaison osidique n'a pas pu être cependant établie par voie enzymatique Pour obtenir ce résultat, nous avons dû faire appel à la r m n à haut champ du proton et du ¹³C La présence de noyaux aromatiques dans les molécules étudiées perturbe plus ou moins les spectres, en particulier du proton, et rend impossible leur analyse au premier ordre Un calcul de spectre a donc été effectué afin de tirer les paramètres essentiels pour l'étude structurale des aryl-glucosides

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Au cours d'essais préliminaires destinés à déterminer l'influence sur la croissance de *Mucor hiemalis* des différents phénols, nous avons établi que ceux-ci pouvaient être incorporés, dès l'ensemencement, à la dose de 50 mg par litre de milieu sans que le rendement cellulaire ne soit trop affecté L'extraction du milieu de culture par différents solvants fournit dans chaque cas, après évaporation de ces derniers, un résidu qui est chromatographié sur couches minces de gel de silice Pour chaque phénol étudié nous avons pu ainsi séparer la quinone (R_F 0,95), le diphénol (R_F 0,35) correspondant et un composé beaucoup plus polaire (R_F 0,10) qui n'a été obtenu à l'état cristallisé qu'après acétylation

Les spectres ultraviolets de ces acétates ne montrent pas de modification sensible par rapport à ceux des phénols dont ils proviennent, on note seulement un déplacement hypsochromique des maxima d'absorption de l'ordre de 4 à 6 nm Les spectres de masse de ces composés présentent également une très grande analogie car, si l'on excepte l'ion moléculaire d'intensité toujours extrêmement faible, ils se caractérisent surtout par la présence d'un ion très intense à m/e 331 accompagné d'ions à m/e 271 (331—60), à m/e 211 (331—60—60) provenant de la perte d'une ou deux molécules d'acide acétique ainsi que des ions à m/e 229 (271—42) et 169 (211—42) par perte de cétène Ce type de fragmentation très caractéristique correspond à la présence dans la molécule étudiée d'un tétra-*O*-acétylaldohexopyranose



- 1 R = 2-biphénylyl
- 2 R = 2-isopropyl-5-méthylphényl
- 3 R = 5-isopropyl-2-méthylphényl
- 4 R = 4-acétoxyphényl

L'hydrolyse des trois hexosides par l'acide chlorhydrique suivie d'une chromatographie sur papier montre sans difficulté que dans chaque cas l'ose libéré est identique au glucose. En revanche, la détermination de la configuration des glucosides par hydrolyse enzymatique à l'aide de l' α -D- et la β -D-glucosidases du commerce n'a pas pu être obtenue de façon satisfaisante bien que les essais aient toujours été effectués sur les glucosides non acetyles. En effet, si l' α -D-glucosidase s'est toujours montrée inactive, quel que soit le temps d'incubation, la β -D-glucosidase n'a permis de mettre en évidence, même après des temps d'incubation supérieurs à 24 h, que des quantités de phenols situées à la limite de la détection de la méthode utilisée.

Differentes causes pouvant être à l'origine de l'inactivité des glucosidases, nous avons donc entrepris l'étude par r m n des glucosides biosynthetises par *Mucor hiemalis* à partir du 2-hydroxybiphényle (1), du thymol (2) et du carvacrol (3), après acétylation de ceux-ci. De plus nous avons synthetisé à titre de substance de reference le 2-biphénylyl- β -D-glucopyranoside selon la methode classique de Koenigs-Knorr⁶. L'isomère de configuration β -D a été obtenu avec une tres haute spécificité aux dépens du rendement dont nous n'avons pas recherché l'optimisation. Enfin l'arbutine ou (4-acétoxyphényl)- β -D-glucopyranoside (4, Fluka, Buchs, St Gall, Suisse) a été également choisie comme substance de reference à cause du faible encombrement sterique que présente l'aglycone par rapport au noyau biphényle.

Tous les glucosides etudies par r m n ont été au préalable peracetyles. Si certains de ces composés étaient déjà connus, à notre connaissance leurs spectres r m n ^1H et ^{13}C n'ont jamais été étudiés. Cette technique est le seul moyen qui nous ait permis de définir exactement la structure de ces glucosides. Les spectres du composé 1 d'origine naturelle et de synthèse sont identiques et ceci confirme l'ensemble des résultats.

L'attribution des différentes résonances a été obtenue par découplages successifs en partant du groupe méthylénique. Les paramètres des spectres du proton à 250 MHz ont été calculés en utilisant nos programmes habituels^{7,8} et les résultats sont rassemblés dans le Tableau I. Les faibles constantes de couplage toutes inférieures à 0,2 Hz ne sont pas indiquées. En ce qui concerne le dérivé du 2-hydroxybiphényle, les H-3 et H-4 du cycle pyranique forment un massif complexe difficile à analyser, les déplacements chimiques de ces protons ne sont donnés qu'approximativement. En ce qui concerne la partie aglycone, 4 donne une raie fine à 7,00 p p m, ce qui s'explique aisément comme limite d'un système AA'BB' avec deux substituants jouant des rôles très voisins. Le composé 1 donne un ensemble de raies situées entre 7,1 et 7,5 p p m dont l'analyse est impossible. Les groupes méthyles des groupes acétyle du groupe D-glucopyranosyle donnent des résonances distinctes aux alentours de 2 p p m.

Nous avons tracé les spectres r m n du ^{13}C découplés et non découplés du ^1H .

TABLEAU I

DEPLACEMENTS CHIMIQUES^a DES PROTONS ET CONSTANTES DE COUPLAGE^b DU CYCLE PYRANNIQUE DE 1-4

Données	Composés			
	1	2	3	4
Déplacements chimiques				
H-1	4,978	5,064	5,046	5,060
H-2	≈ 5,2	5,348	5,346	5,261
H-3	≈ 5,2	5,310	5,316	5,300
H-4	≈ 5,1	5,166	5,168	5,164
H-5	3,856	3,923	3,901	3,864
H-6	4,206	4,232	4,217	4,169
H-6'	4,294	4,280	4,254	4,300
Constantes de couplage				
J _{1,2}	7,5	7,6	7,5	7,3
J _{2,3}	?	9,5	9,5	9,3
J _{3,4}	?	8,8	9,0	8,6
J _{4,5}	9,5	10,0	10,0	9,5
J _{5,6}	2,3	2,8	3,0	2,2
J _{5,6}	5,2	5,5	5,1	5,2
J _{6,6}	-12,0	-12,4	-12,4	-12,2

^aExprimés en p p m à partir du pic du tetramethylsilane ^bExprimées en Hz

TABLEAU II

DEPLACEMENTS CHIMIQUES^a DES ATOMES DE CARBONES ET CONSTANTES DE COUPLAGE DIRECT ¹³C-x, H-x^b DU CYCLE PYRANNIQUE DE 1-4

Atome	Composés ^c			
	1	2	3	4
C-1	100,09	99,62	99,5	99,47
	167	165	157	160
C-2	70,97	71,70	71,00	71,17 ^d
	154	153	161	153
C-3	72,92	73,26	72,90	72,73 ^d
	149	161	155	145
C-4	68,37	69,03	68,50	68,31
	152	159	151	155
C-5	72,14	72,29	72,20	72,04
	145	150	141	145
C-6	62,13	62,53	62,69	61,94
	149	151	147	147

^aExprimées en p p m à partir du pic du tetramethylsilane ^bExprimées en Hz. ^cValeur supérieure = déplacement chimique, valeur inférieure = constante de couplage ¹³C-H ^dL'attribution peut être inversée

Ceci nous a permis de mesurer les déplacements chimiques et les constantes de couplage direct $^{13}\text{C}-\text{H}$. L'attribution des différentes résonances du cycle pyranique a été faite en utilisant les données de la littérature, les spectres non découplés, le découplage sélectif du proton et la méthode de Bidsall et Feeney⁹. Les résultats concernant le cycle pyranique sont présentés dans le Tableau II.

Les groupes $\text{C}=\text{O}$ des groupes acétyles du groupe D-glucopyranosyle sont situés entre 169 et 171 p p m et présentent toujours quatre résonances distinctes, les groupements méthyles donnent des résonances vers 20,5 p p m en général sous forme d'un massif. Les valeurs des constantes de couplage direct $J_{^{13}\text{C}-\text{H}}$ ont été calculées et non mesurées directement. Les écarts entre les valeurs réelles et les valeurs mesurées directement sur le spectre sont toujours inférieures à 0,6 Hz ce qui est plus petit que l'erreur de mesure. Nous remarquons cependant que des mesures précises de $J_{^{13}\text{C}-\text{H}}$ nécessitent un calcul de spectre.

Toutes les valeurs des constantes de couplage proton-proton sont caractéristiques d'un couplage vicinal axial-axial, ce qui définit la géométrie des glucosides. Cependant afin d'éviter le calcul des spectres du proton et l'utilisation de la résonance magnétique à haut champ, nous avons mesuré les constantes de couplage direct $^{13}\text{C}-\text{H}$. D'après Bock et Pedersen¹⁰, on pouvait espérer à l'aide de cette grandeur obtenir la configuration de C-1. Les résultats du Tableau II montrent qu'il est impossible de tirer des conclusions, J variant de 157 à 167 Hz. Les déplacements chimiques des protons et des atomes de carbone sont homogènes dans la série. On remarquera la valeur faible du déplacement chimique du proton anomère, qui se trouve rejeté vers les hauts champs et se place au milieu des autres raies, ce qui rend l'interprétation des spectres plus délicates.

Les constantes de couplage direct $\text{H}-^{13}\text{C}$ sont au contraire très différentes, en particulier pour le C-1, celles-ci variant de 157 à 167 Hz. Dans le cas de **4**, la valeur correspond à celle attendue pour un proton axial et à celles publiées par Bock et Pedersen^{10, 11}, pour une configuration β -D. C'est le cas du groupe D-glucosyle dont l'aglycone est le moins encombrant. Par contre, la valeur de $J_{\text{C}-1 \text{ H}-1}$ s'écarte beaucoup de la valeur moyenne de 160 Hz dans le cas de **1** dont l'encombrement stérique de la partie phénolique est plus important. Si on admet que la valeur de la constante de couplage direct $^{13}\text{C}-\text{H}$ est gouvernée par le caractère s de la liaison, on voit que le pourcentage de s varie, ce qui correspondrait à une modification angulaire de la liaison glycosidique plus ou moins prononcée. L'effet d'électronégativité dans la série pouvant être négligé en première approximation, la variation de ce couplage pour les autres atomes de carbone semble aussi importante sauf pour C-6. Ceci montre que cette déformation concerne tout le cycle. Il ne semble pas qu'il affecte beaucoup l'équilibre conformationnel, vu que les valeurs des constantes de couplage vicinal proton-proton sont pratiquement identiques pour toutes les molécules.

Seule l'analyse des spectres de r m n à haut champ a donc permis d'établir sans ambiguïté que les glucosides synthétisés par *Mucor hiemalis* sont de configuration β -D et de conformation all-équatoriale $^4\text{C}_1$ (D). L'utilisation du couplage direct $^{13}\text{C}-\text{H}$

de C-1 qui peut, dans certains cas, donner d'utiles renseignements doit cependant être employée avec prudence

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel — La souche de *Mucor* utilisée dans ce travail a été isolée en 1962 par l'un de nous à partir d'échantillons de sols halomorphes de Lorraine (France). Cette souche peut être considérée, selon le Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn, Pays-Bas), comme étant une forme intermédiaire entre *Mucor hiemalis* (Wehmer) et *Mucor luteus* (Linnemann). Les croisements effectués avec ces deux espèces montrent que la souche est de type sexuel (+) mais ne conduisent en aucun cas à la formation de zygotes parfaits.

Méthodes — Les spectres u v sont réalisés sur un spectrophotomètre Beckman DK 2S, les produits étant dissous dans l'éthanol, et les spectres i r sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 337. Les points de fusion ne sont pas corrigés. Les spectres de r m n ^1H sont enregistrés à 25° sur un appareil Cameca à 250 MHz, les substances étant en solution dans du CDCl_3 additionné de Me_4Si comme référence interne, alors que les spectres de r m n ^{13}C sont réalisés dans les mêmes conditions sur un appareil Bruker HFX 90 avec transformation de Fourier. Les spectres de masse sont tracés sur un spectromètre Thomson Houston THN 208 à introduction directe, la température de la source étant de 160° et la tension d'accélération de 70 eV. Les chromatographies en couche mince sont effectuées sur plaque de gel de silice G (Merck) dans le système solvants benzène-méthanol 19/1 (v/v) (A), benzène-méthanol 3/1 (v/v) (B) et acétate d'éthyle-butanol 19/1 (v/v) (C). Les chromatogrammes sont révélés par pulvérisation d'une solution aqueuse de chlorure ferrique à 5% puis d'une solution de ferricyanure de potassium à 5% dans le système A et la fraction la plus polaire est purifiée par chromatographie sur plaque dans les systèmes B et C.

Cultures de *Mucor hiemalis* en présence de phénols — Les cultures sont effectuées en ballons de 20 L contenant 15 L de milieu dont la composition est la suivante: D-glucose, 20 g, K_2HPO_4 , 1,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g, NH_4NO_3 , 1,5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g, leucine, 1,5 g, asparagine, 1,5 g, vitamine B₁, 0,25 mg pour 1 L. Les phénols sont introduits stérilement dans le ballon de culture au moment de l'ensemencement, à la concentration de 50 mg par L de milieu. Les cultures sont effectuées à la température ambiante et l'aération est assurée par un barbotage d'air. Après 6 jours de culture, le mycelium est éliminé par filtration et le milieu est extrait par 5 L d'éther, puis 2 L d'acétate d'éthyle. Les extraits sont réunis, séchés sur sulfate de soude et concentrés à sec. Le résidu est alors repris dans un très faible volume d'éther puis chromatographié sur plaque.

Identification des glucosides — Les glucosides sont hydrolysés par HCl 2M en tube scellé à 100° pendant 2 h, les oses libérés sont chromatographiés sur papier Whatman 3 MM dans le système 1-butanol-pyridine-eau 6/4/3 (v/v) en méthode descendante et révélés par AgNO_3 ammoniacal. Ils présentent un R_F identique à celui du D-glucose (R_{Gal} 1,22). Les essais d'hydrolyse enzymatique des glucosides

sont tentés avec l' α -D-glucosidase de levure (Sigma Chemical Co, St Louis, MO 63178, U S A) à pH 6,8 et la β -D-glucosidase d'amandes (Sigma) à pH 5,25 L'activité de ces deux enzymes est au préalable testée respectivement avec le *p*-nitrophényl- α -D-glucopyranoside et le (2-hydroxyméthylphényl)- β -D-glucopyranoside (salicine) L'hydrolyse enzymatique du glucoside est suivie en dosant par colorimétrie la quantité d'aglycone libérée¹² Les glucosides sont peracétylés par un mélange pyridine-anhydride acétique 1 1 (v/v) et les acétates, chromatographiés sur colonne de gel de silice 60 Merck, sont élués avec 2 % de méthanol dans le benzène

Les glucosides suivants ont été obtenus

(2-Biphényl)-2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranoside (1) — Le rendement en glucoside par rapport à la quantité de 2-hydroxybiphényle introduite dans le milieu de culture varie de 35 à 45 % suivant la durée de la culture (R_F 0,52, C) Après chromatographie sur colonne, le peracétate est cristallisé dans le mélange chloroforme-éthanol pour donner 1, p f 155–156°, $[\alpha]_D^{20}$ –64,7° (c 0,25, chloroforme), λ_{\max} 243 et 277 nm (ϵ 13 000, 3000), ν_{\max}^{KBr} 1760 (CO ester), 1205 (C-O-C), 1070 et 1045 cm^{-1} (étheroxyde), lit¹³ p f. 157°, $[\alpha]_D^{18}$ –71,2°

(2-Isopropyl-5-méthylphényl)-2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranoside (2) — Dans le cas des cultures effectuées en présence de thymol, le rendement en glucoside atteint 60 % dans nos conditions de culture (R_F 0,12, B) L'acétylation permet d'obtenir 2 qui cristallise dans le mélange chloroforme-éther de pétrole, p f 113–114°, λ_{\max} 270 et 277 nm (ϵ 1200, 1150), ν_{\max}^{KBr} 1770 et 1758 (CO ester), 1245 et 1235 (C-O-C) et 1048 cm^{-1} (étheroxyde), lit¹⁴ p f 115°, $[\alpha]_D^{20}$ –18,70° (c 0,4, chloroforme), lit¹³ $[\alpha]_D^{21}$ –14,1°

(5-Isopropyl-2-méthylphényl)-2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranoside (3) — Le rendement en glucoside synthétisé à partir de carvacrol varie de 34 à 53 % (R_F 0,11, A) L'acétylation conduit à 3 p f 98–100° (éther-éther de pétrole), $[\alpha]_D^{20}$ –8,7° (c 0,27, chloroforme), λ_{\max} 270 et 277 nm (ϵ 1200, 1100), ν_{\max}^{KBr} 1760 (CO ester), 1230 (C-O-C) et 1045 cm^{-1} (étheroxyde)

Synthèse du (2-biphényl)-2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranoside (1) — A une solution de bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyle (1 g) dans l'acétone (15 mL) est ajoutée une solution aqueuse de phénate de sodium obtenue en dissolvant le 2-hydroxybiphényle (700 mg) dans l'eau (15 mL) où a été préalablement dissoute 200 mg de NaOH Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante Le solvant est évaporé sous pression réduite, l'eau étant éliminée trois fois par évaporations successives avec de l'éthanol Le résidu dissous dans la pyridine anhydre (25 mL) est soumis à l'action de l'anhydride acétique (1 g) durant 24 h Après hydrolyse, la phase organique est extraite à l'éther, lavée par une solution de HCl à 15 %, puis par une solution de NaOH à 15 % et enfin à l'eau Après séchage (MgSO_4), on évapore le solvant Le résidu, chromatographié sur colonne de silice, est élué par un mélange éther-éther de pétrole 2 3 (v/v) Le glucoside est isolé avec un rendement de 13 % (167 mg), p f 155–156°, $[\alpha]_D^{20}$ –64,35° (c 0,3, chloroforme), λ_{\max} 243 et 277 nm (ϵ 13 000 et 2800), lit¹³ p f 157°, $[\alpha]_D^{18}$ –71,2°

RÉFÉRENCES

- 1 B. MAUDINAS, R. HERBER, J. VILLOUTREIX ET P. GRANGER, *Biochimie*, 54 (1972) 1085-1088
- 2 J VILLOUTREIX, *Biochim Biophys Acta*, 40 (1960) 434-441
- 3 R HERBER, B. MAUDINAS ET J VILLOUTREIX, *Phytochemistry*, 11 (1972) 3461-3464
- 4 D LUNT ET W C EVANS, *Biochem J*, 118 (1970) 54p-55p
- 5 R HERBER, M LÉPAGE, M PIERFITTE ET J VILLOUTREIX, *C R Soc Biol*, 166 (1972) 1087-1090
- 6 M SEIDMAN ET K P LINK, *J Am Chem. Soc*, 72 (1950) 4324
- 7 D CANET ET P GRANGER, *J Chim Phys*, 66 (1969) 1228-1231
- 8 D CANET ET R PRICE, *J Magn Reson*, 9 (1973) 35-39
- 9 B BIRDSALL, N J M BIRDSALL ET J FEENEY, *Chem Commun*, (1972) 316-317
- 10 K BOCK ET C PEDERSEN, *J Chem Soc, Perkin Trans 2*, (1974) 293-297
- 11 K BOCK, I. LUNDT ET C PEDERSEN, *Tetrahedron Lett*, (1973) 1037-1040
- 12 E EMERSON, *J Org. Chem*, 8 (1943) 417-428
- 13 K W ROSENMUND ET E GUSSOW, *Arch Pharm (Weinheim, Ger)*, 287 (1954) 38-45
- 14 T KARIYONE, M TAKAHASHI ET K TAKAISHI, *J Pharm Soc Jpn*, 72 (1952) 13-16