

## DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE D'UN ACIDE TRI-D-XYLO-4-O-MÉTHYL-D-GLUCURONIQUE PAR R.M.N. À DEUX DIMENSIONS\*

G. EXCOFFIER, R. NARDIN<sup>†</sup> ET M. R. VIGNON<sup>‡</sup>

Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, C.N.R.S., B.P. No. 68, E-38402 Saint-Martin d'Hères (France)

(Reçu le 16 octobre 1985; accepté sous forme modifiée le 24 janvier 1986)

### ABSTRACT

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-n.m.r. spectra of a tri-D-xylo-4-O-methyl-D-glucuronic acid, obtained from autohydrolyzed poplar wood, have been unambiguously assigned by a combination of one- and two-dimensional methods and indicated the structure *O*-(4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic acid)-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[( $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylopyranose.

### SOMMAIRE

Les spectres de r.m.n.-<sup>1</sup>H et -<sup>13</sup>C de l'acide tri-D-xylo-4-O-méthyl-D-glucuronique, obtenus à partir d'échantillons de bois de peuplier autohydrolysé par traitement à la vapeur, ont été analysés par des expériences de r.m.n. à deux dimensions et ont permis la structure 2-*O*-(acide 4-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic)-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[( $\beta$ -D-xylopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylopyranose.

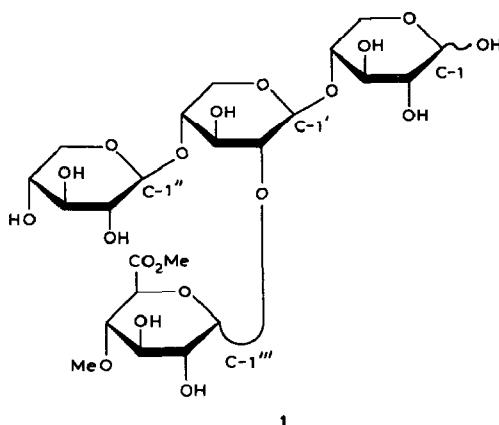
### INTRODUCTION

La détermination de la structure primaire d'oligosaccharides complexes est aujourd'hui plus aisée grâce à l'avènement ces dix dernières années de la spectroscopie de r.m.n. par transformée de Fourier, ce qui a rendu possible en particulier l'enregistrement de spectres de r.m.n.-<sup>13</sup>C en abondance naturelle pour une faible quantité de produit. Avec l'arrivée des spectromètres à haut champ (9,4 Tesla et plus), équipés de calculateurs qui permettent la mise en oeuvre de

\*Présenté au Troisième Symposium Européen sur les Glucides, Grenoble, septembre 16-20, 1985.

<sup>†</sup>Détaché par le Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (C.E.R.M.A.V.) au Centre Grenoblois de Résonance Magnétique, Département de Recherche Fondamentale, Centre d'Études Nucléaires de Grenoble.

<sup>‡</sup>À qui doit être adressée la correspondance.



séquences d'impulsions complexes, l'acquisition et le traitement d'expériences à deux dimensions<sup>1</sup> peuvent ainsi s'effectuer de façon presque routinière.

Dans cet article, nous montrons l'intérêt des techniques de r.m.n.-2D corrélées, *via* les couplages scalaires homonucléaires <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (COSY) (réfs. 1-6) ou hétéronucléaires <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (réfs. 7-12), qui font apparaître des corrélations entre les protons directement couplés (COSY) ou entre un atome de carbone et le ou les protons directement liés. C'est ainsi qu'à partir des protons anomériques, les protons de chacune des quatre unités ont pu être corrélés entre eux. La séquence et le site de ramifications de l'acide 4-*O*-méthyl- $\alpha$ -D-glucuronique ont été déterminés par des expériences d'effet Overhauser nucléaire à travers la liaison glycosidique.

TABLEAU I

DONNÉES<sup>a</sup> DE R.M.N.-<sup>1</sup>H ( $\delta$ ) DES PROTONS DU COMPOSÉ 1

Atome	Anomère		Atome	
	$\beta$	$\alpha$		
H-1	4.54	5.14	H-1''	4.43
H-2	3.23	3.50	H-2''	3.26
H-3	3.53	3.72	H-3''	3.40
H-4	3.73	3.73	H-4''	3.59
H-5'a	3.38	3.53	H-5a''	3.27
H-5'e	4.07	3.83	H-5e''	3.96
H-1'	4.608	4.613		
H-2'	3.39	3.39	H-2'''	3.56
H-3'	3.63	3.63	H-3'''	3.79
H-4'	3.77	3.77	H-4'''	3.33
H-5'a	3.35	3.35	H-5'''	4.68
H-5'e	4.09	4.09	OCH <sub>3</sub> -4''	3.44
H-1'''	5.23	5.26	OCOCH <sub>3</sub> -6''	3.82

<sup>a</sup>Les déplacements chimiques sont donnés par rapport au signal du groupement méthyle de l'acide 4-*O*-méthyl-D-glucuronique pris comme référence à  $\delta$  3.44 p.p.m.

Nous avons par ailleurs mesuré les temps de relaxation des atomes de carbone, et ils apparaissent comme un paramètre intéressant dans l'étude des oligosaccharides complexes, en particulier quand ils sont ramifiés.

#### RÉSULTATS ET DISCUSSION

La difficulté principale pour déterminer la structure chimique d'un oligosaccharide par r.m.n. consiste à attribuer de façon non équivoque tous les signaux. Cavagna *et al.*<sup>13</sup> ont déterminé par r.m.n. la structure de l'acide D-xylo-4-*O*-méthyl-

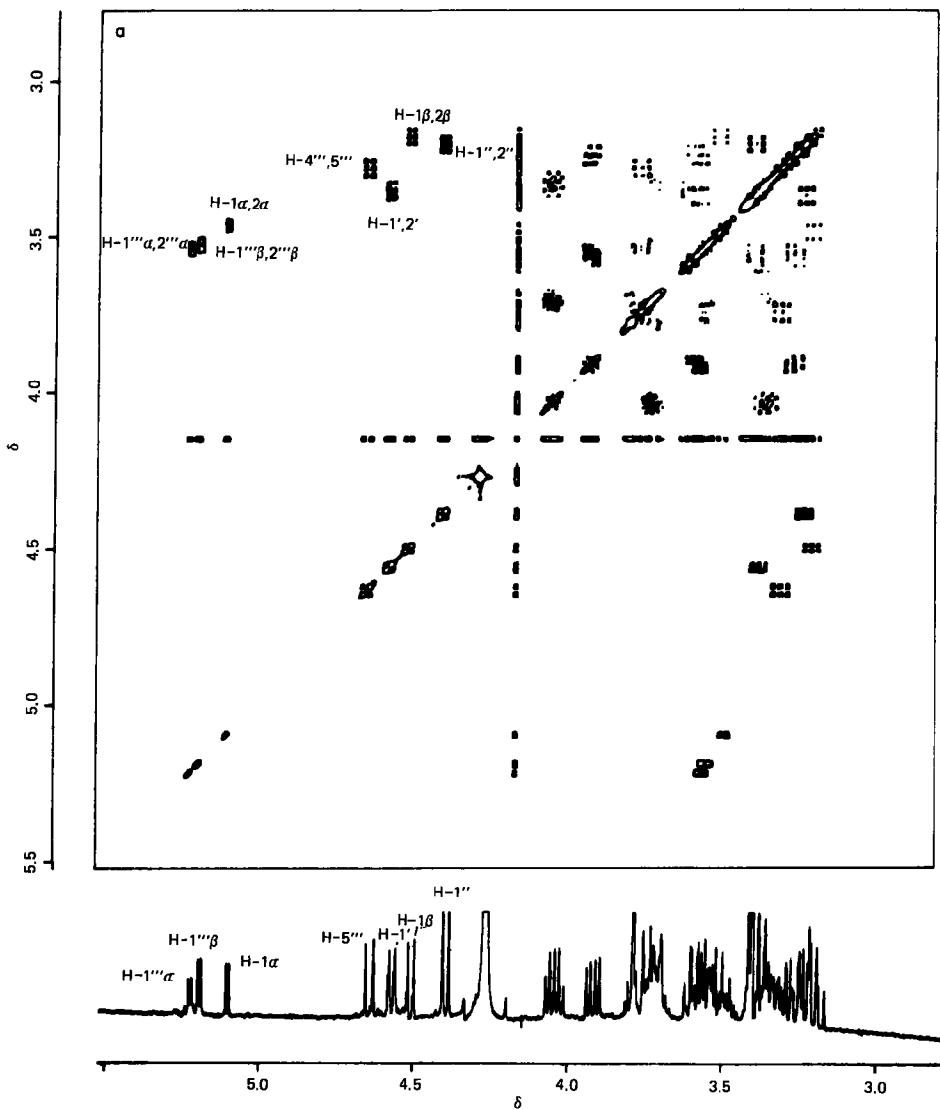


Fig. 1a. Spectra 2D-COSY du composé 1; Courbes de niveaux (contour plot).

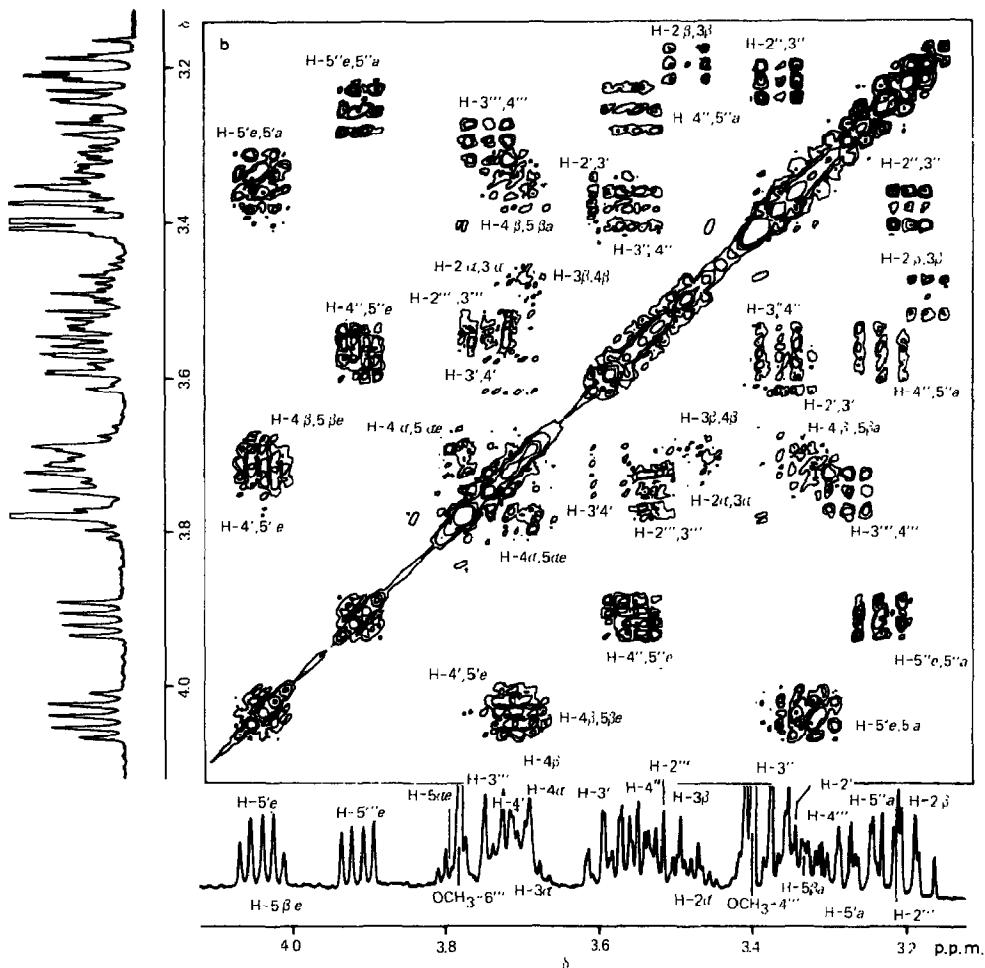


Fig. 1b. Spectre 2D-COSY du composé **1**. Courbes de niveaux (contour plot) de l agrandissement de la région à haut champ.

D-glucuronique. Dans le cas de l'acide D-xylo-4-O-méthyl-D-glucuronique (1) se pose le problème du site de ramifications de l'acide 4-O-méthyl-D-glucuronique, qui peut être lié sur l'une des unités *xylo* réductrice, intermédiaire ou terminale non réductrice.

Nous avons effectué l'analyse du spectre de r.m.n.-<sup>1</sup>H par une expérience 2D-COSY; dans un spectre 2D-COSY, on retrouve le spectre 1D porté par la diagonale et les corrélations scalaires entre des protons couplés se retrouvent dans les régions hors diagonale.

Dans le cas d'un oligosaccharide hydroxylé, les signaux dus aux protons anomères sont facilement caractérisés à bas champ (Tableau I). Par ailleurs, les protons de l'extrémité réductrice sont affectés par l'équilibre de mutarotation. On peut ainsi aisément reconnaître les signaux de  $H-1\alpha$  et  $H-1\beta$  à partir desquels on

déduit l'attribution des protons de l'unité réductrice (Fig. 1). On trouve ainsi le signal de  $\text{H-2}\alpha$  à  $\delta$  3,50 et celui de  $\text{H-2}\beta$  à  $\delta$  3,23; ces protons sont couplés à  $\text{H-3}\alpha$  ( $\delta$  3,72) et  $\text{H-3}\beta$  ( $\delta$  3,53) respectivement. Le proton  $\text{H-4}$  ( $\delta$  3,73) est peu sensible au fait que le groupement hydroxyle de l'extrémité réductrice soit axial ou équatorial. Les protons  $\text{H-5}$  sont différents selon qu'ils sont axiaux ou équatoriaux, et ils sont affectés par l'équilibre de mutarotation ( $\text{H-5}\beta e$ ,  $\delta$  4,07;  $\text{H-5}\beta a$ ,  $\delta$  3,38;  $\text{H-5}\alpha e$ ,  $\delta$  3,83;  $\text{H-5}\alpha a$ ,  $\delta$  3,53).

Parmi les signaux dus aux protons anomères, on peut facilement identifier le proton  $\text{H-1}'''$  ( $\delta$  5,23, 5,26) car il présente, comme  $\text{H-1}\alpha$ , un couplage d'intensité moyenne avec  $\text{H-2}'''$  ( ${}^3J_{\text{H-1}'''-\text{H-2}''}$  4 Hz,  $\delta$  3,56) caractéristique d'une liaison  $\alpha$ . Les protons  $\text{H-1}''$  ( $\delta$  3,79),  $\text{H-4}'''$  ( $\delta$  3,33) et  $\text{H-5}'''$  ( $\delta$  4,68) sont aisément repérés.

Les protons restants des unités intermédiaire et terminale non réductrice sont attribués de la même manière à partir des protons anomères  $\text{H-1}'$  ( $\delta$  4,608 et 4,613) et  $\text{H-3}''$  ( $\delta$  4,43). Ces deux protons présentent un couplage ( ${}^3J_{1,2}$  7,7 Hz) caractéristique d'un arrangement *trans*-diaxial (liaison  $\beta$ ). Cependant il est difficile de préciser à quel cycle appartient l'un de ces protons, sans préciser l'enchaînement de ces quatre résidues. Pour cela, nous avons réalisé deux expériences de "n.O.e. différence" avec saturation successive des protons  $\text{H-1}'''$  et  $\text{H-1}''$ . Nous obtenons un effet Overhauser homonucléaire à travers la liaison glycosidique, entre  $\text{H-1}'''$  et  $\text{H-2}'$  d'une part, entre  $\text{H-1}''$  et  $\text{H-4}'$  d'autre part (Fig. 2). Ceci démontre de façon irréversible que l'unité D-xylose intermédiaire porte, en  $\text{O-2}'$ , l'acide 4-*O*-méthyl- $\alpha$ -

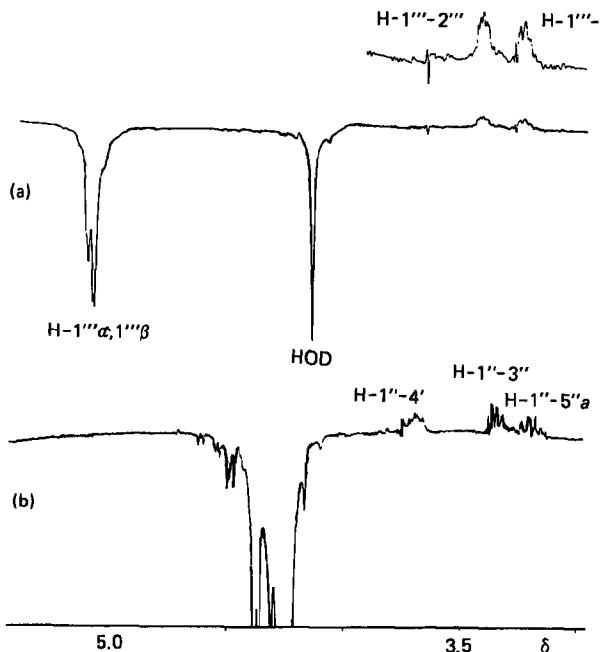


Fig. 2. Spectres n.O.e. différence: (a) Saturation de  $\text{H-1}'''$ ; (b) saturation de  $\text{H-1}''$ .

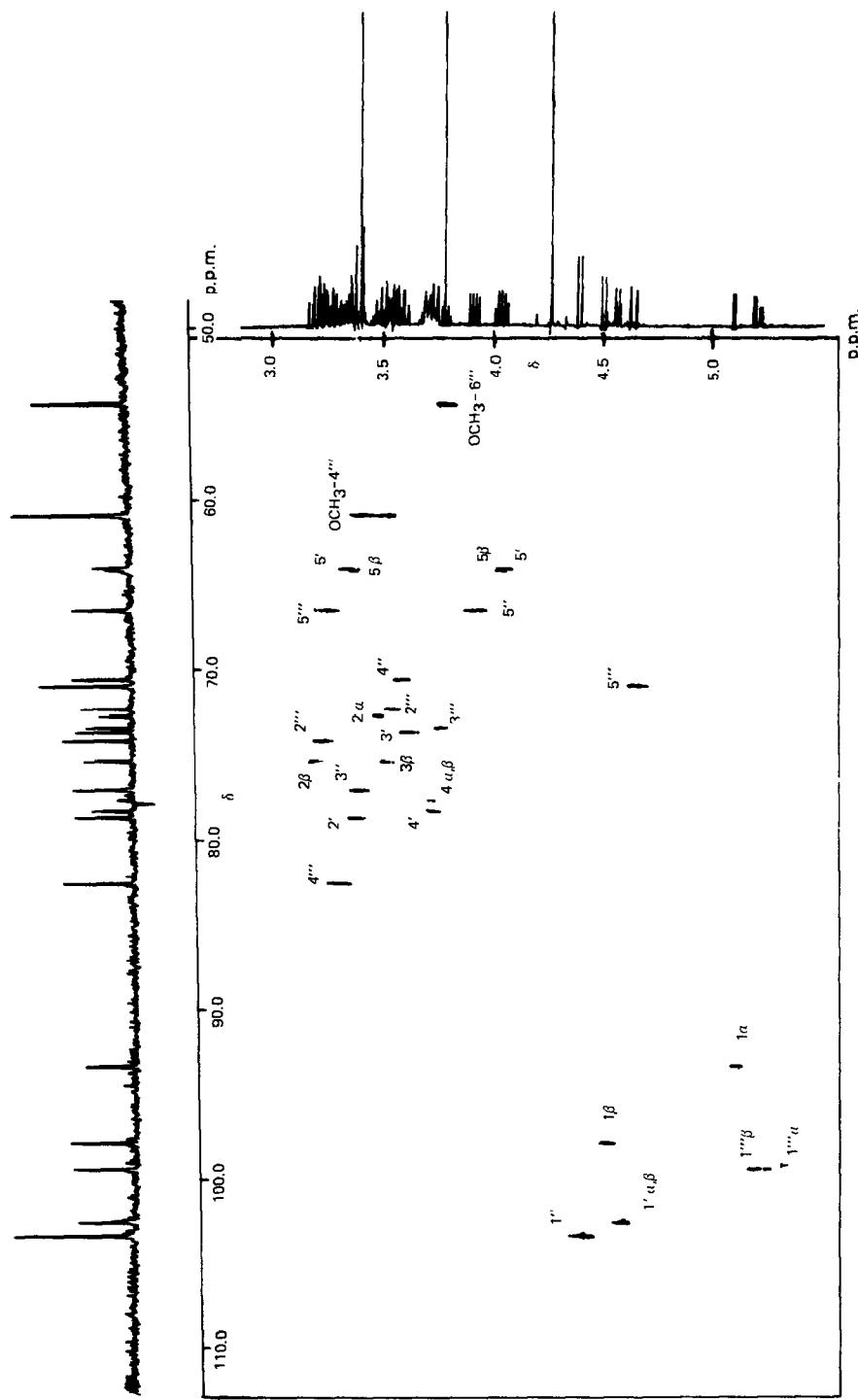


Fig. 3. Spectre 2D-hétéronucléaire de corrélation  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ .

D-glucuronique et en O-4' un résidu  $\beta$ -D-xylopyranosyle, et qu'elle est elle-même impliquée dans une liaison glycosidique  $\beta$  en O-4 du résidu de D-xylose réducteur.

Le spectre de r.m.n.-<sup>13</sup>C a été enregistré avec découplage protonique. Là encore, certains signaux sont affectés par l'équilibre de mutarotation, ce qui facilite leur identification. Tous les signaux ont été attribués au cours d'une expérience de r.m.n.-2D hétéronucléaire corrélée *via* les couplages scalaires (Fig. 3). Dans ce type d'expérience, on détecte les signaux des atomes de carbone, après transfert de polarisation pendant le temps  $t_2$  en les découplant totalement des protons et on échantillonne le spectre proton pendant  $t_1$ . On retrouvera donc sur la projection, suivant l'axe  $F_2$ , le spectre de r.m.n.-<sup>13</sup>C découpé des protons et, suivant l'axe  $F_1$ , le spectre de r.m.n.-<sup>1</sup>H. Sur le spectre de niveau ("contour plot") et uniquement dans le cas de couplage, on trouvera une tache de corrélation aux coordonnées H et C, ce qui signifie que H et C sont couplés entre eux. Les délais fixés dans la dernière partie de l'expérience ne permettent qu'un transfert de polarisation entre spins couplés avec une valeur de  $J$  de l'ordre de  $^1J_{^{13}\text{C}-^1\text{H}}$ , ce qui permet de dire que l'on ne fera apparaître que des corrélations entre protons et atomes de <sup>13</sup>C directement liés (couplés à travers une seule liaison). Ainsi, pour chaque paire proton-atome de carbone impliquée dans une liaison covalente, une tache unique apparaît dans le spectre de niveau, dont les coordonnées correspondent aux déplacements chimiques des différentes raies du ou des protons et au déplacement chimique de l'atome de carbone avec lequel il ou ils sont liés.

Par exemple, dans le cas où un atome de carbone porte deux protons non équivalents, on obtient deux taches de corrélation au lieu d'une, ce qui se produit dans le cas des protons axiaux et équatoriaux portés par C-5 d'une unité D-xylose. Le tracé des résultats peut se faire: (a) par projection sur les axes de fréquence  $F_1$  et  $F_2$ ; (b) en sections caractéristiques d'un déplacement chimique précis; (c) en perspective ou en courbe de niveau ("contour plot"). Dans le cas particulier des sections caractéristiques, on peut individualiser des protons qui se chevauchent, à condition que les atomes de carbone auxquels ils sont directement liés soient individualisés, ce qui est souvent le cas étant donné la très grande plage de déplacement chimique des atomes de carbone.

Nous avons par ailleurs mesuré les temps de relaxation longitudinaux spin-réseau  $T_1$  des vecteurs <sup>13</sup>C-H et leurs valeurs sont reportées entre parenthèses dans le Tableau II. On retrouve les résultats décrits dans la littérature<sup>14-17</sup> dans le cas d'un oligosaccharide, à savoir que les atomes de carbone qui appartiennent à la même unité ont des temps de relaxation comparables.

Les atomes de carbone des unités D-xylose terminales réductrice et non réductrice ont des temps de relaxation de l'ordre de 0,6 s (0,3 s dans le cas de C-5 car ils portent deux protons), alors que ceux de l'unité D-xylose intermédiaire et de l'unité acide D-glucuronique ont des temps de relaxation beaucoup plus court ( $T_1$  de 0,4 s). Ceci traduit une plus grande mobilité des premières unités par rapport aux secondes.

Nous venons de montrer que, dans le cas d'un tétrasaccharide complexe, la

TABLEAU II

DONNÉES<sup>a</sup> DE R.M.N. <sup>13</sup>C ( $\delta$ ) DES ATOMES DE CARBONE DU COMPOSÉ I

Atome	Anomère		Atome	
	$\beta$	$\alpha$		
C-1	97.35(0.68)	92.8(0.45)	C-1"	102.80(0.55)
C-2	74.80(0.58)	71.85	C-2"	73.65(0.59)
C-3	74.80(0.58)	72.15	C-3"	76.45(0.60)
C-4	77.05(0.46)	77.10	C-4"	70.00(0.64)
C-5	63.60(0.30)	59.55	C-5"	66.00(0.31)
C-1'	102.05(0.38)	102.0	C-1'''	98.85(0.35)
C-2'	78.05(0.39)		C-2'''	71.70(0.39)
C-3'	73.15(0.39)		C-3'''	72.95(0.40)
C-4'	77.70(0.37)		C-4'''	82.05(0.38)
C-5'	63.60(0.19)		C-5'''	70.30(0.43)
			C-6'''	172.75
			OCH <sub>3</sub> -4'''	60.60
			OCOCH <sub>3</sub> -6'''	54.05

<sup>a</sup>Les déplacements chimiques des atomes de <sup>13</sup>C sont donnés par rapport au signal du 1,4-dioxane en référence interne ( $\delta$  67.4 p.p.m.). Entre parenthèses sont reportées les valeurs (en seconde) des temps de relaxation spin-réseau des <sup>13</sup>C ( $T_1$ ).

spectrographie de r.m.n. à une et à deux dimensions permet de déterminer sa structure primaire; nous avons mis en évidence l'intérêt tout particulier des expériences 2D-hétéronucléaires de corrélation scalaire. Dans le cas de molécules plus complexes, il peut arriver que des protons aient le même déplacement chimique; dans ce cas, on peut être amené à attribuer le spectre proton à partir du spectre r.m.n.-<sup>13</sup>C. C'est pour cette raison que les expériences 2D hétéronucléaires corrélées sont très performantes; d'autre part, la mesure des vitesses de relaxation des atomes de carbone, qui donne une information sur l'agitation de la molécule en solution, permet dans certains cas d'en déduire le site de branchement. Par ailleurs, il faut souligner que lorsque l'acide 4-*O*-méthyl- $\alpha$ -D-glucuronique est lié en O-2 de l'unité intermédiaire, son proton anomère est sensible à l'équilibre de mutarotation de l'unité *xylo* réductrice et donne deux signaux H-1" $\alpha$  et H-1" $\beta$ . Par contre, il ne donne qu'un seul signal<sup>18</sup> lorsque l'acide est lié à l'unité terminale non réductrice. Cette particularité peut être utilisée pour déterminer le site de ramification dans le cas d'un oligosaccharide complexe.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

**Produits.** — L'hydrolyse enzymatique (cellulases NOVO) d'un 4-*O*-méthyl glucuronoxylane partiellement préhydrolysé (lors de l'hydrolyse rapide par la vapeur de copeaux de bois de peuplier) conduit, entre autres, aux acides trixylo-, tétraxylo- et pentaxylo-uronique. Ces acides xylouroniques, après estérfication des

groupements carboxyliques par le diazométhane, ont été fractionnés par filtration sur Bio-Gel P2.

**Méthodes.** — Les spectres de r.m.n. ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AM 400 à 333°K, à partir d'une solution de composé (15 mg) dans l'eau lourde ( $D_2O$ , 0,5 mL), dans un tube de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques des protons sont donnés par rapport au signal du groupe méthyle de l'acide 4-*O*-méthyl-D-glucuronique pris comme référence ( $\delta$  3,44); la largeur spectrale d'enregistrement des spectres protons est de 1100 Hz et la valeur de l'impulsion à 90° de 6  $\mu$ s. Les déplacements chimiques des atomes de carbone sont donnés par rapport au signal du 1,4-dioxane en référence interne ( $\delta$  67,4 p.p.m.); la largeur spectrale d'enregistrement des spectres de  $^{13}C$  est de 7000 Hz et la valeur de l'impulsion à 90° de 14  $\mu$ s.

Les expériences 2D COSY ont été réalisées à l'aide de la séquence d'impulsions suivante [90°- $t_1$ -45°- $t_2$ -]. On a réalisé 256 expériences de 2048 points d'acquisition, pour une largeur spectrale de 1100 Hz dans les deux dimensions, soit une incrémentation de 0,834 ms de la valeur de  $t_1$  entre chaque expérience. Pour obtenir un bon rapport signal sur bruit, on réalise 128 accumulations par expérience avec un temps de recyclage de 3,3 sec. Une extension à 1024 points dans la dimension  $t_1$  est réalisée par la technique du "zero-filling" avant d'appliquer une fonction en "pseudo-écho" dans les deux dimensions et de réaliser l'interférogramme d'une taille de 2048 × 1024 points.

Les spectres hétéronucléaires  $^1H$ - $^{13}C$  de corrélation par couplage scalaire ont été réalisés avec la séquence d'impulsion décrite par Morris et Hall<sup>18</sup>, soit pour le spectre r.m.n.- $^1H$ , 90°- $t_{1/2}$ - $t_{1/2}$ - $\tau_1$ -90°- $\tau_2$ -BB et pour le spectre r.m.n.- $^{13}C$ ,  $t_{1/2}$ -180°- $t_{1/2}$ - $\tau_1$ -90°- $\tau_2$ -FID( $t_2$ ) 128 expériences de 980 accumulations sur 2048 points d'acquisition ont été réalisées en incrémentant la valeur de  $t_1$  de 0,333 ms entre chaque expérience. La largeur spectrale est de 7000 Hz pour le spectre r.m.n.- $^{13}C$  et de 750 Hz pour le spectre r.m.n.- $^1H$ . Ceci nous a permis de construire une matrice de 2048 × 1024 points en étendant la taille selon  $t_1$  à 1024 points par la méthode du "zero filling". Une fonction d'apodisation en pseudo-écho a été appliquée, avant transformée de Fourier, dans les deux domaines avec un facteur en  $t_2$  2 et en  $t_1$  12. Les impulsions 90° sont de 25  $\mu$ s pour le spectre de r.m.n.- $^1H$  et de 14  $\mu$ s pour le spectre de r.m.n.- $^{13}C$ . L'impulsion de l'atome de carbone est une impulsion composite<sup>19</sup> de la forme: (90°)<sub>x</sub>-(180°)<sub>y</sub>-(90°)<sub>x</sub>. Le délai de recyclage est de 1,1 sec.

L'acquisition ainsi que le traitement des données sont réalisés à l'aide du logiciel standard Bruker.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Centre Grenoblois de Résonance Magnétique Nucléaire de Grenoble pour l'accès au spectromètre Bruker AM 400.

## RÉFÉRENCES

- 1 A. BAX, *Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids*, Reidel Ed., Boston, 1982.
- 2 J. JEENER, *Ecole d'Été Internationale Ampère*, Basko Polje, Yougoslavie, 1971.
- 3 W. P. AUE, E. BARTHOLDI ET R. R. ERNST, *J. Chem. Phys.*, 64 (1976) 2229-2246.
- 4 K. NAGAYAMA, A. KUMAR, K. WUTHRICH ET R. R. ERNST, *J. Magn. Reson.*, 40 (1980) 321-334.
- 5 A. BAX ET R. FREEMAN, *J. Magn. Reson.*, 44 (1981) 542-561.
- 6 H. KESSLER, W. BERMEL, A. FRIEDRICH, G. KRACK ET W. E. HULL, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 6297-6304.
- 7 K. NAGAYAMA ET K. WUTHRICH, *Eur. J. Biochem.*, 114 (1981) 365-374.
- 8 G. A. MORRIS ET L. D. HALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 4703-4711.
- 9 J. JEENER, B. H. MEIER, P. BACHMANN ET R. R. ERNST, *J. Chem. Phys.*, 71 (1979) 4546-4553.
- 10 R. BENN ET M. GUNTHER, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 22 (1983) 350-380.
- 11 G. EICH, G. BODENHAUSEN ET R. R. ERNST, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 3731-3732.
- 12 A. BAX ET G. A. MORRIS, *J. Magn. Reson.*, 42 (1981) 501-505.
- 13 F. CAVAGNA, H. DEGER ET J. PULS, *Carbohydr. Res.*, 129 (1984) 1-8.
- 14 A. ALLERHAND ET D. DODDRELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 93 (1971) 2777-2779.
- 15 A. NESZMÉLYI, K. TORI ET G. LUKACS, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1977) 613-614.
- 16 P. A. J. GORIN ET M. MAZUREK, *Carbohydr. Res.*, 72 (1979) c1-c5.
- 17 K. BOCK, D. BUNDLE ET S. J. JOSEPHSON, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, (1982) 59-70.
- 18 M. VIGNON, résultats non publiés.
- 19 R. FREEMAN, S. P. KEMPSSELL ET H. LEVITT, *J. Magn. Reson.*, 38 (1980) 453-479.